T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİLERİN ANTİTÜMÖROJENİK AKTİVİTESİ

GAMZE ALTINTAŞ KAZAR

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. ECE ŞEN

EDİRNE-2017

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ece ŞEN
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Prof. Dr. Ece ŞEN (Danışman)	
Doç Dr. Dumrul GÜLEN	
Doç. Dr. Bilal BALKAN	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA	
Yrd. Doç. Dr. Mesut BOZ	

Tarih: 22/05/2017

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

01/05/2017



Gamze ALTINTAŞ KAZAR

Doktora
Bakterilerin Antitümörojenik Aktivitesi
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Kanser normal olmayan hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalması ve bazen bu hücrelerin diğer dokulara da yayılmasıdır. Moleküler düzeyde kanser, onkogenlerin aktive olması ve tümör baskılayıcı genlerin inaktive olmasını da içeren birçok basamaktan oluşmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan radyoterapi, ameliyat ve kemoterapi gibi geleneksel yöntemlerin yeterli düzeyde başarılı olamadığı durumlar bulunmaktadır. Tümörlerin tam hedeflenememesi, ilaçların yetersiz doku penetrasyonu, sınırlı terapötik indeks, ilaçlara karşı ortaya çıkan direnç ve mikrometastazların varlığı geleneksel tedavilerin en zayıf noktalarıdır.

Kanser tedavisinde kullanılması amaçlanan başarılı bir terapötik ajanın kanser hücrelerini seçici olarak hedeflemesi, kanserli dokuya kendiliğinden yönlenebilmesi, kanser mikroçevresini algılayabilmesi, dış sinyaller tarafından yönlendirilebilmesi ve kolaylıkla dışarıdan saptanabilmesi beklenir. Robot fabrikalar olarak adlandırılan bakterilerin bütün bu beklentileri karşılama potansiyeli bulunmaktadır. Genetik olarak modifiye edilmiş veya edilmemiş bakteriler ve onların metabolitlerinin kanserli hücrelerin çoğalmasını engellemek, kanseri tedavi etmek ya da metastazları önlemek için kullanılmasına bakteriyel kanser tedavisi adı verilmektedir. Kanser tedavisinde artan bir sıklıkla araştırılan bakteriler *Salmonella*, *Escherichia* ve *Bacillus* türleridir.

Bu çalışmanın amacı, *Escherichia coli* OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis (*ATCC 14028*)* serovar *typhimurium, Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila* suşlarının, fare embriyonik fibroblast hücre hattı MEF, insan aort beyaz kas hücresi TG HA-VSMEC üzerindeki etkilerini ve rahim kanseri hücre hattı HeLa, prostat kanseri hücre hattı DU145 ve meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerine antikanserojenik etkilerinin araştırılmasıdır. Bu

amaçla MEF, TG HA-VSMEC, MCF-7, DU145 ve HeLa hücre kültürleri, *Salmonella, E. coli, B. thuringiensis* ve S. *entomophila* suşları ile değişen enfeksiyon çarpanı (bakteri sayısı:hücre sayısı) oranlarında kokültive edilmiş; hücre canlılıkları kolorimetrik MTT sitotoksisite testi ile ölçülmüş; apoptoza giren hücre yüzdeleri görüntü tabanlı sitometre ile değerlendirilmiş ve Kaspaz-3 aktiviteleri kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Patojenik *S. telaviv* (A22) suşunun, patojen olmayan S. enteriditis (A17) ve *S. typhimurium* ATCC 14028 suşlarına göre apoptozu daha etkili bir biçimde tetiklediği saptanmıştır. Patojenik *S. telaviv* (A22) suşu tarafından indüklenen apoptoza giren tüm hücre tiplerinin ortalamaları için hücre yüzdesi %15 civarında olurken, patojen olmayan *S. enteriditis* (A17) ve *S. typhimurium* ATCC 14028 suşları için %5 civarında kalmıştır. Benzer şekilde, MEF, HeLa veDU145 hücreleri için kaspaz-3 aktivitesini gösteren ortalama OD405 değerleri, patojen olmayan *S. enteriditis* (A17) ve *S. typhimurium* ATCC 14028 suşları için 0.01 civarında kalırken, patojenik *S. telaviv* (A22) suşu için 0.02'ye yaklaşmış ve kontrol grubuna göre tüm hücre türlerin ortalaması iki kat artış göstermiştir. Hücreleri apoptoza sürekleyen en etkili bakteri ortalama bazında %21 ile *E. coli* OP50 suşu olarak bulunmuştur. Ancak *E. coli* suşu DU145 ve MEF hücrelerinde yüksek apoptoz etkisi gösterirken HeLa hücrelerinde beklenen etkiyi göstermeyerek kontrol değeri olan %4'ün altında kalmıştır. Ayrıca *S. entomophila,* DU145 hücrelerinde benzer bir etki yaparak apoptoza giren hücre yüzdesini %23'e yükseltmiştir ve *S. entomophila*'ya ait SCS (tüketilmiş kültür süpernatanı)'nin DU145, HeLa ve MEF hücre canlılıklarının ortalamasını besiyeri ile yarı yarıya karıştırıldığında %20 civarına kadar düşürdüğü açığa çıkarılmıştır. Çalışmamızın sonuçları, *S. telaviv* (A22) suşunun DU145, HeLa ve MEF hücrelerinde kaspaz-3 aktivitesini artırdığını, apoptozu tetiklediğini göstermesi ve *E. coli* (OP50) ile *S. entomophila* suşlarının DU145 hücreleri üzerinde seçici sitotoksisitesi olduğunun açığa çıkarılması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışma ile *Salmonella* sp.*, S. entomophila, E. coli* (OP50) suşlarının bakteriyel kanser tedavide etkili olma potansiyellerine sahip oldukları görülmektedir.

Ayrıca bu çalışmada Amber hastalığı ile biyolojik mücadele amacı ile kullanılan *S. entomophila*'nın insan kanser hücre hatları üzerinde apoptotik etkiye sahip olduğu ilk kez gösterilmiştir. GDO'lu gıdaların ortaya çıkartılmasında kullanılan *Bacillus*

thuringiensis bakterisinin MEF hücreleri üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkisi ilk kez ortaya konmuştur.

Yıl : 2017

Sayfa Sayısı : 98

Enteriditis Kelimeler : Bakteriyel kanser tedavisi, Antikanserojen, Antitümörojen, Apoptoz, MTT, Hücre canlılığı, Hücre kültürü, Kokültivasyon, *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Serratia entomophila*, *Salmonella* typhimurium, *Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv,* MEF, TG HA-VSMEC, HeLa, MCF-7, DU145

Doctoral Thesis
Antitumorigenic Activity of Bacteria
Trakya University Institute of Natural Sciences
Biology

ABSTRACT

Cancer is an uncontrolled division of abnormal cells and sometimes these cells can spread into other tissues. At the molecular level, cancer is the combination of many steps involving activation of oncogenes and inactivation of tumor supressor genes. There are cases where conventional techniques such as radiotherapy, surgery and chemotherapy used for the treatment of cancer are failed to succeed. Unable to target tumors selectively, insufficient tissue penetration of drugs, limited therapatic index, emergence of resistance to drugs and micrometastasis are the weakest points of the conventional therapies.

Succesful therapeutic drug should have some features possessing selective targeting of cancer cells, self propensity to cancerous tissue, detection of microenvironment, orientability by extrinsic signals and easy noninterventional detection. Bacteria which are called robotic factories have potential to provide all these features. The use of genetically modified or native bacteria and their metabolites with the aim of prevention of cancer propagation, the treatment of cancer and the halting of metastasis is called bacterial cancer therapy. Mostly, enteriditis on the bacterial cancer therapy is focused on *Salmonella* spp., *Escherichia spp.* and *Bacillus* spp..

The aim of this study was to investigate the antitumorigenic effects of *Escherichia coli* OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella typhimurium, Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila* strains on MEF, TG HA VSMEC, HeLa, MCF-7 and DU145 cell cultures. MEF (mouse embryonic fibroblasts), TG HA-VSMEC (normal aorta smooth muscle), MCF-7(human breast cancer) DU145 (human prostate cancer cells), and HeLa (human cervical cancer cells) cell lines were cocultivated with *Salmonella, E. coli, B. thuringiensis* ve S. *entomophila* strains of

varying multiplicity of infection (number of bacteria:number of cell) ratios. The cell viability was measured by MTT cytotoxicity assay, the percentage of apoptosis was assessed by image based cytometry and the caspase-3 activity was determined by colorimetric assay. It was shown that pathogenic *S. telaviv* (A22) strain induces apoptosis more effectively than non-pathogenic *S. enteriditis* (A17) and *S. typhimurium* ATCC 14028 strains. The percentage of apoptosis induced by pathogenic *S. telaviv* (A22) strain was approximately 15% while 5% for both non-pathogenic *S. enteriditis* (A17) and *S. typhimurium* ATCC 14028 strains. Similarly, average OD_{405} values of caspase-3 activity was shown as 0.01 for both non-pathogenic *S. enteriditis* (A17) and *S. typhimurium* ATCC 14028 strains whereas average OD405 value of caspase-3 activity for pathogenic *S. telaviv* (A22) strain was very close to 0.02 and it doubled the value of negative control. Our findings are important in terms of the demonstration of food-borne pathogenic *S. telaviv* (A22) strain which enhanced caspase-3 activity and induced apoptosis, and non-pathogenic *S. enteriditis* (A17) strain that showed selective cytotoxicity on DU145. The most effective bacteria strain that triggers cell apoptosis was found to be non-pathogenic *E. coli* OP50 with the average of 21%. However, *E. coli* strain showed higher apoptosis inducer effect on DU145 and MEF cells, it did not possess same effect on HeLa cells by having values enteriditis the control values of 4% . In addition, *S. entomophila* had the same apoptosis inducer effect on DU145 cells by increasing apoptosis to 23% and *S. entomophila* SCS diluted with cell culture medium in 1:1 mix decreased the cell viability of DU145 cells up to 20%. Results of the study have the importance of illuminating that pathogenic S. Telaviv (A22) strain increases Caspase-3 activity and induces apoptosis, in addition *E. coli* (OP50) and *S. entomophila* strains have selective cytotoxicity on DU145 cells. By the study, it is obvious that *Salmonella* sp., *S. entomophila, E. coli* (OP50) strains are potential candidates for effective cancer therapy.

In addition, the apoptotic effect of *S. entomophila* that is used as biopesticide against Amber disease is demonstrated on human cancer cell lines for the first time. It is also firstly shown that *Bacillus thuringiensis* bacteria used for the generation of GMO containing foods have cytotoxic and apoptotic effect on MEF cell lines.

Year : 2017
Number of Pages : 98
Keywords : Bacterial cancer therapy, Anti-cancerogenic, Anti-tumorigenic, Apoptoz, MTT, Cell viability, Cell culture, Co-culture, *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Serratia entomophila*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv,* MEF, TG HA-VSMEC, HeLa, MCF-7, DU145

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süesince bilgi birikimi, tecrübesi, açık görüşlülüğü ve şaşmaz bilimsel önsezileriyle her zaman yanımda olan çok kıymetli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ece ŞEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çok kıymetli ilkokul öğretmenim Sayın Naide ERSOY'a hayatta disiplin sahibi olmanın ve şevkini kaybetmeden çalışmanın her zaman fark yarattığını öğrettiği için, çok sevgili anabilim dalı başkanım Sayın Prof. Dr. Figen ERTAN'a sonsuz desteği ve hoşgörüsü için, TÜTAGEM Müdürü Sayın Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR'a bana bilimsel çalışmalara dahil olması çok zevkli bir alan yaratarak bu tez çalışmasının deneysel kısımlarının TÜTAGEM'de gerçekleşmesini ve MCF-7, TG HA-VSMEC, HeLa hücre hatlarını sağladıkları için, İstanbul Kültür Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hocası Sayın Doç. Dr. Elif Damla ARISAN'a nazik hediyeleri olan DU145 ve MEF hücre hatları için, tez izleme komitemde bulunan Sayın Prof. Dr. Feruzan DANE ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mesut BOZ'a kıymetli vakitlerini ayırıp bilimsel öngörü ve tecrübelerini tarafıma cömertçe sundukları için, çok değerli bölüm başkanım Sayın Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE'ye yönlendirmeleri sayesinde beni tez hocamla buluşturduğu ve çalışması zevkli bir eğitim öğretim ve araştırma ortamı sağladığı için, değerli çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Mitat AYDOĞDU'ya ve Dr. Aylin TÜRKSEVER TETİKER'e destekleri için, Uzman Sinem LEVENTER ve Pelin TÜRKER'e TÜTAGEM'de gerçekleştirdiğim tüm çalışmalarda yardımları için, Biyoloji Bölümü hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma sundukları güzel iş birliği ve iş arkadaşlığı için teşekkür ederim.

Ayrıca hayatımın her aşamasında yanımda olan ve benden desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen canım annem Sevdiye ALTINTAŞ'a, değerli babam Cevat ALTINTAŞ'a ve kıymetli kardeşim Gözde ALTINTAŞ'a, sevgili eşim Tuncay KAZAR'a ve biricik oğlum Sarp KAZAR'a teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na çok teşekkür ederim.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) biriminin mali desteğiyle gerçekleştirilmiştir (TÜBAP- 2014/65). Bu çalışmanın bir kısmı ve çalışmadan üretilen posterin sunumu Trakya Üniversitesi ÖYP Koordinatörlüğü tarafından sağlanan bütçe ile maddi olarak desteklenmiştir.

Edirne, 2017

Gamze ALTINTAŞ KAZAR

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....i
ABSTRACT.....iv
TEŞEKKÜR.....vii
İÇİNDEKİLER.....ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....xii
TABLOLAR DİZİNİ.....xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....xv
BÖLÜM 1 – GİRİŞ VE AMAÇ.....1
BÖLÜM 2 – GENEL BİLGİLER.....5
2.1. Kanser.....5
2.2. Bakteriyel Terapi.....6
2.3. Kanserin Bakteriyal Tedavisinde Kullanılan Bakteriler.....7
2.3.1. *Salmonella sp*.....8
2.3.2. *Listeria* sp.....11
2.3.3. *Eschericia* sp.....12
2.3.4. *Clostridium* sp.....14
2.3.5. *Bacillus thuringiensis*.....16
2.4. *Serratia entomophila*.....18
2.5. Bakteriler İle Yapılan Klinik Araştırmalar.....18
2.5.1. *S. typhimurium* VNP20009 25 denekli faz I çalışması.....20
2.5.2. *S. typhimurium* VNP20009 4 denekli faz I çalışması.....20
2.5.3. *S. typhimurium* VNP2009 TAPET-CD 3 denekli faz I çalışması.....22
2.5.4. *Pseudomonas* IL4-PE.....22
2.5.5. *Pseudomonas* IL13-PE.....23

2.5.6. Clostridium butyricum M-55 5 denekli faz I çalışması.....24
2.5.7. *Clostridium butyricum* M-55 49 denekli faz I çalışması.....25
2.5.8. *Difteria* Tf-CRM 107.....25
2.6. BAKTERİ VE APOPTOZ İLİŞKİSİ.....26
2.6.1. Apoptoz.....26
2.6.2. Bakterilerin tetiklediği hedef hücre apoptozunun başlıca mekanizmaları.....29
2.7. TEZDE KULLANILAN HÜCRE HATLARI.....33
2.7.1. Fare embriyonik Fibroblastları (MEF).....33
2.7.2. T/G HA-VSMEC.....34
2.7.3. HeLa.....34
2.7.4. DU145.....36
2.7.5. MCF-7.....36
BÖLÜM 3 – MATERYAL VE METOD.....38
3.1. Materyaller.....38
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....38
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler.....39
3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşlarının Temini.....40
3.1.4. Kullanılan Hücre Hatlarının Temini.....40
3.2. Metod.....41
3.2.1. Bakteri Sayılarının Optik Densite Karşılıklarının Bulunması 41
3.2.2. Optimal Kokültivasyon Süresinin Araştırılması 41
3.2.3. Optimal Bakteri – Hücre Enfeksiyon Çarpan Oranının Araştırılması.....42
3.2.4. Bakteri Tarafından Tüketilmiş Süpernatanın (SCS) Hücre Hatları Üzerindeki Etkili Yüzdesinin Bulunması.....43
3.2.5. Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Hücre Canlılık Yüzdelerinin TALI Canlılık Kiti ile Araştırılması.....44
3.2.6. Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Hücre Apoptoz Yüzdelerinin TALI Apoptoz Kiti ile Araştırılması.....45
3.2.7. Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi..46
3.2.8. Çalışmalarda Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizleri.....46
BÖLÜM 4 – SONUÇLAR.....47

4.1. Bakteri Sayılarının Optik Yoğunluk Karşılıkları.....47
4.2. Optimal Kokültivasyon Süresi.....49
4.3. Optimal EÇ (Bakteri Sayısı:Hücre Sayısı Enfeksiyon Çarpan Oranı) Değerinin Bulunması.....53
4.4. Bakteri Tarafından Tüketilmiş Süpernatanın (SCS) Hücre Hatları Üzerindeki Etkili Olduğu Maksimum Bakteri – Hücre Enfeksiyon Çarpan Oranının Bulunması.....57
4.5. Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Hücre Canlılık Yüzdelerinin TALI Canlılık Kiti ile Araştırılması.....61
4.6. Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Hücre Apoptoz Yüzdelerinin TALI Apoptoz Kiti ile Araştırılması.....64
4.7. Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi.....67
BÖLÜM 5 – TARTIŞMA.....71
KAYNAKLAR.....82
ÖZGEÇMİŞ.....97
TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER.....98

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

ANOVA : Varyans analizi

ATCC : Amerikan Tipi Kültür Kolleksiyonu

Bt : *Bacillus thuringiensis*

CFU : Koloni oluşturan birim

DEVD-pNA : N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide, Kaspaz-3 substratı

DMEM : Dulbecco Modifiye Eagle Besiyeri

DMSO : Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

DTT : Dithiothreitol

EÇ : Enfeksiyon çarpanı

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

FBS : Fetal bovin serumu

FCS : Fetal kalf serumu

γ : gamma

IL : İnterlökin

LB : Lizojen broth (Luria-Bertani)

LD_{50} : Yarı öldürücü doz

LPS : Lipopolisakkarit

µ : mikro

MRI : Manyetik rezonans görüntüleme

MTT : 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür

n : nano

NaOH	: Sodyum hidroksit
OD	: Optikal densite (Optik yoğunluk)
PBS	: Fosfat tampon tuzu
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PI	: Propidyum iyodür
RNA	: Ribonükleik Asit
R^2	: Korelasyon katsayıları karesi
SCS	: Tüketilmiş kültür süpernatanı
TNF	: Tümör nekroz faktör
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil tansferaz dUTP nik son işaretlemesi
T25	: Taban alanı 25 cm^2
5-FC	: 5-florositozin
5-FU	: 5-florourasil

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4. 1. *Escherichia coli* (OP50), *Bacillus thuringiensis*, *Serratia entomophila, Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *Salmonella enteriditis* (A17), *Salmonella telaviv* (A22) suşları için standard grafikten elde edilen formül ile OD=1 için hesaplanan CFU/ml ve R^2 değerleri.....49

Tablo 4.2. *Escherichia coli* (OP50), *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *Salmonella enteriditis* (A17), *Salmonella telaviv* (A22), *Serratia entomophila* bakterileri ile kokültive edilen MEF ve HeLa hücreleri için hesaplanan 0, 1, 2, 4, 8, 24 saat ortalama canlılık yüzdeleri.....52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 a. Robot fabrikalar....8
Şekil 2.1 b. Bakteri hücresi....8
Şekil 2.1 c. Kanser araştırmalarında kullanılan bakteriler hakkındaki yayınlar....8
Şekil 2.2. *Salmonella* sp. taramalı elektron mikroskobu görüntüsü....9
Şekil 2.3. *Listeria monocytogenes*....11
Şekil 2.4. *Escherichia coli* taramalı elektron mikroskop görüntüsü....13
Şekil 2.5. *Clostridium difficile*....14
Şekil 2.6. a. *Bacillus thuringiensis*....17
Şekil 2.6. b. Parasporal insektisit kristalleri....17
Şekil 2.7. *Serratia* sp. taramalı elektrom mikrografı....18
Şekil 2.8. Bakterilerin tümör tedavisinde kullanım yöntemleri....19
Şekil 2.9. Apoptozu tetikleyen dış, iç ve Perforin yolakları....27
Şekil 2.10. Bakterilerin tetiklediği hücre apoptozunun ana mekanizmaları....29
Şekil 2.11. Kaspaz aktivasyon yolakları ile *Salmonella* ve *Shigella* tarafından indüklenen Kaspaz-1 aktivasyonu....30
Şekil 2.12. a. İnsan fibroblast hücreleri 33
Şekil 2.12. b. Fare embriyonik fibroblastları....33
Şekil 2.13. TG-HA VSMEC hücreleri....34
Şekil 2.14. HeLa hücreleri....35
Şekil 2.15. DU145 hücreleri....36
Şekil 2.16. MCF-7 hücreleri....37

Şekil 4.1. *Escherichia coli* (OP50), *Bacillus thuringiensis*, *Serratia entomophila, Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *Salmonella enteriditis* (A17), *Salmonella telaviv* (A22) suşları için OD'nin 10^6 x CFU/ml karşılıklarını gösteren standard grafik.....48
Şekil 4.2. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705) **,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakteri ile EÇ 1:1 iken değişen kokültivasyon süreleri ile inkübe edilen MEF hücrelerinin canlılık yüzdesi grafiği.....50
Şekil 4.3. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705) **,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakteri ile EÇ 1:1 iken değişen kokültivasyon süreleri ile inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdesi grafiği.....51
Şekil 4.4. HeLa ve MEF hücreleri için 4 saat kokültivasyon süresi verileri ile yapılan Welch's t test (eşlenik olmayan data) grafiği ve $P<0.05$ için hesaplanan P değeri.....53
Şekil 4.5. *E. coli* (OP50) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği 54
Şekil 4.6. *S. typhimurium* (ATCC 14028) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....54
Şekil 4.7. *S. enteriditis* (A17) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....55
Şekil 4.8. *S. telaviv* (A22) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....55
Şekil 4.9. *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği 56
Şekil 4.10. *S. entomophila* (ATCC 43705) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....56
Şekil 4.11. *E. coli* (OP50) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....58
Şekil 4.12. *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....58

Şekil 4.13. *S. entomophila* (ATCC 43705) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....59
Şekil 4.14. *S. typhimurium* (ATCC 14028) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....59
Şekil 4.15. *S. enteriditis* (A17) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....60
Şekil 4.16. *S. telaviv* (A22) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği.....60
Şekil 4.17. MEF, TG HA-VSMEC HeLa, MCF-7 ve DU145 hücre hatları ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin hücre canlılık yüzdelerine etkisi.....61
Şekil 4.18. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranları ile inkübe edilen MEF, TG HA-VSMEC HeLa, MCF-7 ve DU145 hücre hatlarının canlılık yüzdelerindeki değişim.....62
Şekil 4.19 Bakteriler ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen hücrelerin hücre canlılık yüzdelerini gösteren ısı haritası.....63
Şekil 4.20. MEF, HeLa, ve DU145 hücre hatları ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin hücre apoptozuna etkisi.....64
Şekil 4.21. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranları ile inkübe edilen MEF, HeLa ve DU145 hücre hatlarında apoptoz yüzdelerindeki değişim.....65

Şekil 4.22 Bakteriler ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen hücrelerin hücre apoptoz yüzdelerini gösteren ısı haritası 66
Şekil 4.23. MEF, HeLa, ve DU145 hücre hatları ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin Kaspaz-3 aktivitesine etkisi.....67
Şekil 4.24. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranları ile inkübe edilen MEF, HeLa ve DU145 hücre hatlarında Kaspaz-3 aktivitesindeki değişim.....68
Şekil 4.25 Bakteriler ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen hücrelerin Kaspaz-3 aktivitelerini gösteren ısı haritası.....69
Şekil 4.26 Patojenik *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. telaviv* (A22) ve patojen olmayan *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. enteriditis* (A17) bakterileri ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen DU145, HeLa, MCF, TG HA-VSMEC, MCF-7 hücrelerinin hücre canlılık yüzdelerindeki azalmayı gösteren ısı haritası.....70

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser anormal hücrelerin hızla ortaya çıkması, sınırlarının dışına yayılması ve yakınlarındaki dokuları istila etmesidir. Birleşik Devletler'de 7 milyon kişiye kanser tanısı konulması beklenen 2016 yılında, 600,000 kişinin de kanser sebebiyle hayatını kaybedecek olması öngörülmektedir ve bu kanser yüzünden günlük 1,630 ölüme denk gelmektedir [1]. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'nün sınıflandırmasına göre standart kanser tedavileri ameliyat, kemoterapi, radyoterapi, transplantasyon ve hedeflenmiş terapileri kapsamaktadır. Radyoterapi, kemoterapi ve ameliyat gibi geleneksel tedavi yöntemleri modern teknikler ve teknolojiler ile hızlı bir biçimde ilerliyor olsa da tümör hücrelerinin ilaçlara direnç kazanması ve metastaza eğilimli hale gelmeleri, mikrometastazları tanımlama ve ortaya çıkmasını engellemedeki yetersizlik ve birçok tedavinin sınırlı terapötik indeksi, tümörlerin tam olarak hedeflenememesi, yetersiz doku penetrasyonu kanser tedavilerinde başarıyı kısıtlayıcı faktörlerdir ve birçok kanser tedavisi sağlıklı dokulara da zarar vermektedir [2, 3].

İdeal bir kanser tedavisinde kullanılan ajan kanser hücrelerine seçici bir biçimde sitotoksik olmalı, kanser hücrelerine kendiliğinden yönlenebilmeli, dış sinyaller tarafından yönlendirilebilmeli, kanser mikroçevresini algılayabilmeli ve dışarıdan saptanması kolay olmalıdır [4]. Canlı bakteriler, zayıflatılmış bakteriler, genetiği değiştirilmiş bakteriler ve onların ürünleri olan toksin, protein, ve ilaç türevlerinin kanserli hücrelerin çoğalmasını engellemek, kanseri tedavi etmek ya da metastazları önlemek için kullanılmasına bakteriyel kanser tedavisi adı verilir [5]. *Salmonella typhimurium* 'un tümörlü bir fareye sistemik olarak enjeksiyonu ile yapılan bir araştırmada bakterilerin tümör dokusunda diğer sağlıklı organ ve dokulara göre 10,000 kat daha fazla bulunduğu gösterilmiştir [6]. Bu araştırmanın sonucuna gore bakteriler,

kanser hücrelerine seçici bir biçimde ulaşabilmekte ve kendilerinden yönlenebilmektedirler. Ayrıca bakteriler kendilerinde bulunan kemotaktik reseptörler sayesinde tümör mikroçevresindeki değişimleri sezebilirler ve genetik olarak değiştirilmelerine imkan sağladıkları için dış sinyallere duyarlı ve/veya cevap verebilir hale getirilebilirler [7]. Böylece bakteriyel tedavi sırasında kullanılan bakteriler ideal bir kanser tedavi ajanı gibi davranabilirler.

1890 yılında William B. Coley tarafından farkedilen ve daha sonra Coley'nin toksini adını alan patojenik bakteri enfeksiyonu sonucu tümörlerde görülen küçülme bakteriyel kanser tedavisinin temelini oluşturmaktadır [8]. Bu bakteri spor oluşturan ve anaerobik olan *Clostiridia* sınıfına aittir ve tümörlerin etrafındaki hipoksik çevre bu bakterilerin tümörleri hedef alması için çok müsaittir. 1935 yılında ise Cornell *Clostridium histolyticum*'dan elde ettiği steril filtratların tümör regresyonuna sebep olduğunu bildirmiştir [9]. *Clostiridium oncolyticum* M55 sporlarının ise yapılan klinik çalışmalar ile glioblastomalarda onkolizize sebep olduğu gösterilmiştir [10]. *Clostridia* sınıfının patojen olmayan suşlarından *C. beijerinckii* NCIMB 8052, *C. beijerinckii* ATCC 17778, *C. limosum* DSM1400, *C. acetobutylicum* ATCC 824 and NI-4082 sporları fare ve sıçanlarda denenmiş ve sporların bakterilere dönüşerek sadece tümörlü dokularda biriktiği saptanmıştır [11]. C. *novyi*-NT sporları kullanılarak gerçekleştirilen DNA hasarı oluşturan ilaçlar, anti-vasküler ajanlar, mitomisin C ve dolastin-10 ile kombine bakteriyel tedavide ise tümör boyutlarında azalmada çok başarılı sonuçlar elde edilse de yüksek dozda toksisite görülmüştür [12].

Salmonella thyphimurium patojenik bir tür olup duvarında bulunan lipopolisakkaritler ve diğer virülans faktörleri sebebi ile güçlü immünolojik uyarılara sebep olmaktadır. Genetik olarak modifiye edilmiş *Salmonella spp*. suşları CD, TNFα , kolisin gibi birçok protein ve toksin üretecek şekilde tasarlanmış ve suşların tümör gelişimini gerilettikleri, metastazı önledikleri bulunmuştur [9]. *Salmonella choleraesuis* kullanılarak geliştirilen aşılar hem tek başlarına antikanser ajanı olarak hem de kombine tedavilerde fare deneylerinde başarılı olmuşlardır [13]. *S. typhimurium* A1 suşu ise insan prostat kanseri zenograftlarında tümör gerilemesini tetiklemiş [14], A1-R suşunun ise tümör gerilemesi, metastaz sayısında azalma ve denek hayvanlarının yaşam sürelerinde artmayı sağladığı fare modelleri yapılan akciğer metastazları , omurilik glioması , ve lenf düğümü metastazları için kanıtlanmıştır [15].

Serratia entomophila ise Enteriditis bakteri ailesinin entomopatojenik bir üyesidir. Kurtçuklarda amber hastalığı denilen bir hastalığa yol açar ve tarımda biyolojik mücadele amaçlı kullanılır. Fakültatif anaerobik olan *S. typhimurium* Enteriditis ailesine ait bir Gram-negatif bakteridir. Spor oluşturmayan, çubuksu şekilli bu bakteri kamçısı sayesinde hareketlidir. *Salmonella enteriditis* serovar *typhimurium* ishal, ateş, karın ağrısına sebep olan ve bir haftaya kadar sürebilen salmonelloz enfeksiyonuna sebep olan başlıca serovardır. Tez çalışmasında gıdalardan izole edilen patojen olan ve patojen olmayan *S. typhimurium* suşları kullanılmıştır. *Bacillus thuringiensis* gram-pozitif, toprakta yaşayan ve genellikle biyolojik pestisit olarak kullanılan bir bakteridir. Bu bakteriden izole edilen Cry toksini de pestisit olarak kullanılmakla birlikte, sporulasyon sırasında üretilen ve δ-endotoxins adı verilen kristal yapıdaki proteini de insektisit özelliğine sahiptir. Günümüzde ise genetiği değiştirilmiş tahıllarda biyolojik mücadele amacı ile Bt geni kullanılmaktadır.

Yapılan çalışma ile *Escherichia coli* OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis (*ATCC 14028*)* serovar *typhimurium, Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila* suşlarının, fare embriyonik fibroblast hücre hattı MEF, insan aort beyaz kas hücresi TG HA-VSMEC, rahim kanseri hücre hattı HeLa, prostat kanseri hücre hattı DU145 ve meme kanseri hücre hattı üzerine antikanserojenik etkileri araştırılacaktır.

Kullanılan bakterileriden *S. entomophila* ilk defa antikanser özellikleri bakımından araştırılmış olup literatürde bu bakterilere ait antikanserojenik etkisi hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Daha önce karaciğer kanseri hücre hattı HepG2 ve lösemi hücreleri üzerinde araştırılan *Bacillus thuringiensis* toksininin antikanserojenik etkisi ilk defa MCF-7, MEF, DU145, TG HA-VSMEC üzerinde araştırılmıştır [16]. Patojen olan ve ya olmayan *Salmonella enteriditis* ve *Salmonella telaviv* suşlarının hücre hatları üzerine antikanserojenik etkileri üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. *Salmonella typhimurium* suşları ile fare modelinde DU145 hücreleri [17] , genetik olarak değiştirilmiş *Salmonella typhimurium* suşları ile ise MCF-7 [18], nöroblastoma [19] ve 3T3 hücreleri çalışılmıştır [20]. Ancak DU145, MEF ve TG HA-VSMEC hücre hatları için yaptığımız çalışma ilk in vitro deney datalarını sağlamıştır ve genetiği değiştirilmemiş suşlar ile çalıştığımızdan MCF-7, MEF ve TG HA-VSMEC hücreleri

için, izole ettiğimiz suşların antikanserojenik aktivitesi hakkında yeni bilgiler elde edilmiştir. Böylece belirtilen bakteriler için literatüre ilk defa bilgiler sağlanmıştır.

Elde edilen bilgiler anılan bakterilerle ilgili ileriki çalışmalara baz oluşturacaktır ve hayvan deneylerine geçilmeden önceki ilk basamağı oluşturmaktadır. Deneysel olarak anlamlı bulunan sonuçların elde edildiği bakteriler ile in vivo deneyler yapılabilecektir ve bu bakteriler, bakteriyel kanser tedavisinde kullanılabilecek ajanlar olacaklardır. Genel anlamda kanser ilaçlarının geliştirilmesine ve kanser tedavilerinin çeşitlendirilmesine katkı sağlayacak bu çalışma, kanser ile mücadele eden hastaların yaşam kalitesinin düzelmesi ve yaşam süresinin uzatılmasında rol oynayacaktır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser kontrolsüz bölünme ve anormal hücrelerin yayılması ile karakterize edilen ve yayılım kontrol altına alınamazsa ölüm ile sonuçlanabilen hastalıklar topluluğudur. 2016 yılında Enteriditis Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı) tarafından yayınlanan rapora göre sadece 2016 yılı içerisinde 1,685,210 yeni kanser vakasının bildirilmesi öngörülürken 595,690 kişinin kanser tanısı ile hayatını kaybetmesi beklenmektedir ve kanser ile mücadele veren 14.5 milyon kişi bulunmaktadır [1]. Hücre fizyolojisindeki büyüme sinyallerine aşırı duyarlılık, büyüme kısıtlayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozun engellenmesi, sınırsız bölünme potansiyeli, aralıksız anjiyogenez, doku istilası ve metastaz olarak gruplandırılabilecek 6 değişiklik kötü huylu kanserleşmiş büyümeyi tanımlamaktadır [21]. Kansere neden olabilen etkenler kanser protoonkogenlerinin onkogenlere dönüşmesi ve tümör baskılayıcı genlerin etkinliğini yitirmesi gibi genetik faktörler ile belirlenebildiği gibi çevresel ve davranışsal sebepler aşırı kilo ve obezite, yetersiz meyve ve sebze tüketimi, kısıtlı fiziksel aktivite, sigara kullanımı, alkol kullanımı, korunmasız cinsel ilişki, hava kirliliği, fosil katı yakıt kullanımı ve sağlık hizmetleri sırasında hatalı kontamine enjeksiyonlar olmak üzere başlıca 9 ana kategoride toplanabilmektedir [22].

Amerikan Kanser Derneği'ne göre temel kanser tedavileri ameliyat, kemoterapi, radyoterapi, hedeflenmiş terapi ve immunoterapiden oluşmaktadır [23]. Ancak yaygın olarak kullanılan kemoterapi ve radyoterapi sağlıklı dokulara da toksik olabildiği gibi bütün kanser hücrelerini tamamı ile yok edemeyebilir. Bu durumun ana sebepleri

yetersiz tümör hedeflemesi, eksik doku penetrasyonu ve tüm kanser hücrelerine kısıtlı toksisitedir ve tedavinin etkinliğini azaltmakla birlikte ölüm oranlarında artışa sebep olmaktadır [24]. Temel tedavilerin yanı sıra kök hücre transferi, hipertermi, fotodinamik terapi, kan ürünleri transferi, lazer, moleküler terapi, tamamlayıcı ve destekleyici tedaviler gibi farklı prosedür ve teknikler de kanser tedavisinde kullanılmaktadır [23].

2.2 Bakteriyel Terapi

Bakterilerin genetik olarak değiştirilmesinin kolay olması ve bu sayede standart tedavilerin kısıtlı kaldığı alanlarda farklı tedavi olanakları sağlaması onların iyi birer kanser tedavi ajanı sayılabilmelerini sağlamaktadır. Her ne kadar son 15 yılda bakteriler ile kanser tedavisi alanında yapılan araştırmalar ve yayınlar artmış olsa da bakteriyal terapinin başlangıcı 2 yüzyıl geriye dayanmaktadır. İlk olarak 1813 yılında kanserli bir hastada *Clostridium* enfeksiyonu sonucu gözlemlenen tümör küçülmesi [25], 1868 yılında kanserli bir hastanın Alman doktor Busch tarafından tedavi amacı ile bakteri ile enfekte edilmesiyle devam etmiştir [26].

1908 yılında William Coley, ameliyat edilemeyen tümörlere sahip hastaları *Streptococcus pyogenes* ile enfekte ederek birçok hastanın tümörlerinin küçülmesini sağladı. Coley daha sonra *Streptococcus pyogenes* bakterisine *Serratia marcescens* bakterisi de ekleyerek Coley'nin toksini ya da Coley'nin aşısı adı verilen karışımı oluşturdu. Coley'nin toksini 1963 yılına kadar farklı kanser tiplerine karşı kullanıldı ve bu karışım ile birçok klinik araştırma gerçekleştirildi [27]. Ancak İngiliz Kanser Araştırmaları Enstitüsü'nün Coley'nin toksini hakkında verdiği kanseri tedavi edici ya da ortadan kaldırıcı olduğu konusunda yeterli bilimsel veriler olmadığı için kullanımı sonlandırıldı [28].

1935 yılında ise *Clostridium histolyticum*'a ait steril süzüntülerin tümörlerde gerilemeye sebep olduğu Cornell tarafından gözlemlenip 1947 yılında *Clostridium* enjeksiyonundan sonra tümör küçülmesine bir enzimin sebep olabileceğine dair ilk bilimsel yayın yapıldı [29]. 1967 yılında 3 araştırmacının Bacillus Calmette-Guérin (BCG) ile mesane kanserini başarılı bir şekilde tedavi ettiklerini duyurması bu alandaki çalışmaları hızlandırmıştır [30]. *Clostridium* sp., *Bifidobacterium* sp., *Salmonella* sp.,

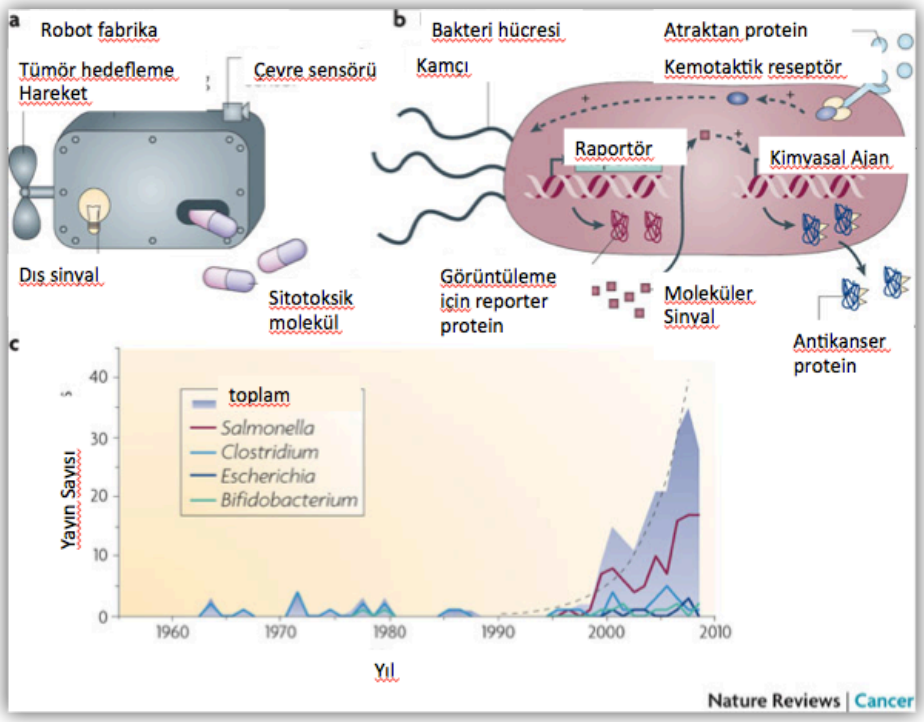
Mycobacterium sp., *Bacillus* sp. ve *Listeria* sp. bu alanda en çok araştırılan bakteriler olmuştur [31].

Bakterilerin kanser tedavisinde kullanımı uzun yıllara dayanıyor ve yenilikçi bir tedavi yaklaşımı olarak kabul ediliyor olsa da bakterilerin tümör hedeflenmesinde kullanılması potansiyel bakteriyal toksisite, azalmış hedeflenme, genetik kararsızlık ve diğer tedaviler ile etkileşimi nedeniyle sınırlıdır [32]. Etkili bir bakteriyal terapi sağlıklı dokulardan ziyade tümörü hedeflemeli, genetik olarak modifiye edilebilmeli, toksik olmamalı, tömürün diğer tedavilere cevap vermeyen kısımlarına ulaşabilmeli, etkili bir antikanser ajanı taşımalı ya da iletebilmelidir [33].

2.3 Kanserin Bakteriyal Tedavisinde Kullanılan Bakteriler

Bakteriler etkili bir kanser terapi ajanı olabilecek kapasiteye sahiptirler. Kamçı ile hareket sayesinde tümöre ulaşma ve kemotaktik alıcılar ile çevreyi hissetme kabiliyetine sahip birer robot fabrikalarıdırlar (Şekil 2.1.a ve b). Bu sayede tümör mikroçevresi etrafında bulunan moleküler sinyalleri algılayıp tümöre doğru kemotaksis hareketi gerçekleştirebilirler. Küçük moleküllere ya da radyasyona duyarlı gen promotörleri kullanılarak bakterilerin dışarıdan kontrolü sağlanabilir. Bakteriler ayrıca ışık, MRI ve PET ile ayırt edilebilirler. Apoptoz indükleyici faktörler, tümör antijenleri, sitokinler ve toksinler gibi tedavi edici moleküllerin genlerinin bakterilere transfeksiyonu ile seçici sitotoksisite sağlanabilir. Bakterilerin genetik olarak kolayca değiştirilebilmeleri onların tedavide büyük bir etkiye sahip olmalarını, kusursuz bir doz ayarlaması ve sınırsız kombinasyon imkanı da sunmaktadır [4].

Tümörler içerisinde seçici bir şekilde biriken bakterilerin birçok türü için çalışmalar yapılmış ve *Salmonella* sp. [34], *Listeria* sp. [35], *Escherichia* sp. [36], *Proteus* sp. [37], *Clostridium* sp. [38], *Bifidobacterium* sp. [39], *Streptococcus* sp. [40], ve *Caulobacter* sp. [41] gibi bakteri türlerinin antikanser kapasitesi araştırılmıştır (Şekil 2.1.c).



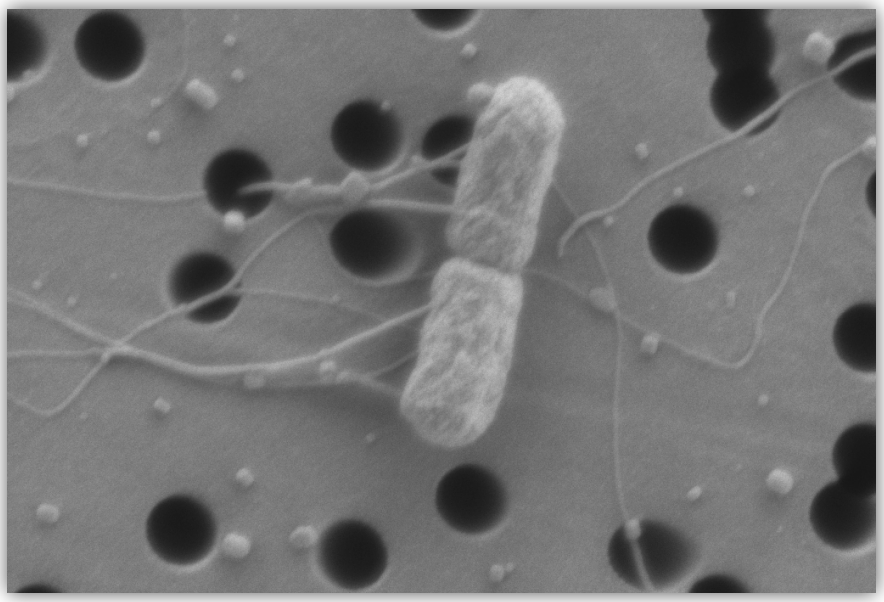
Şekil 2.1 a.Robot fabrikalar. **b.** Bakteri hücresi **c**. Kanser araştırmalarında kullanılan bakteriler hakkındaki yayınlar [42]

2.3.1 *Salmonella sp.*

Salmonella Gram-negatif, kamçılı, fakültatif anaerobik bir basildir (Şekil 2.2). Faz 1 ve Faz 2 formlarında olabilen H adı verilen kamçı antijeni, O antijeni adı verilen somatik antijeni ve Vi antijeni adı verilen bir kaç suşta varolan antijenler olmak üzere 3 ana antijene sahiptir. O antijeni dış membran yüzeyinde belirli şeker dizileri sayesinde oluşurken, Vi antijeni O antijeninin üzerini örten yüzeysel bir antijendir ve *S. Typhi* gibi bir kaç suşta bulunur. *Salmonella*'nın antijenik yapısının açığa çıkarılması organizmanın klinik olarak tanınmasını ve 9 serovar grubundan (A-I) birisine atfedilmesini sağlar.

Diğer Gram-negatif bakteriler gibi *Salmonella*'nın da hücre zarında kompleks lipopolisakkaritler (LPS) bulunur ve bu LPS'ler hücre lizizinde görev oynar. Ayrıca endotoksin olarak da görev yapan LPS'ler virülansın belirlenmesinde önemlidir. Endotoksin makromolekülü üç bileşenden oluşmaktadır: dışta O-polisakkarit kılıf, içte lipit A kılıf ve ortada R merkez. O-polisakkarit dizilerindeki tekrarlayan şeker birimleri

doğası gereği O-antijen spesisifikliğinden sorumludur ayrıca organizmanın virulanslığını belirlemeye yardımcı olur. Bütün bir O-şeker dizisine sahip olmayan *Salmonella*'lar pürüzlü olarak adlandırılırlar ve pürüzlü koloniler meydana getirirler ve tüm bir O-şeker dizisine sahip pürüzsüz suşlardan daha az virulansa sahiptirler ya da hiç virulansları yoktur. R merkezde bulunan ortak enteriditis antijenlerini hedef alan antikorlar yaygın Gram-negatif bakterilerin enfeksiyonundan ve bakterilerin ölümcül etkilerinden korurlar.



Şekil 2.2. *Salmonella* sp. taramalı elektron mikroskobu görüntüsü [43]

Endotoksinler ateş yükseltir, serum değerlerinde kinin ve pıhtılaşma faktörlerini arttırır, miyokardial fonksiyonu baskılar ve lenfosit fonksiyonlarını değiştirir. Kanda dolaşan endotoksin sistemik enfeksiyonlarda görülebilen septik şokun klinik olarak gösterilmesinde de kullanılırlar. Hücre duvarının endotoksin bileşenleri ise Gram-negatif bakterilerin enfeksiyonlarının klinik olarak belirlenmesinde işe yararlar [44].

Salmonelloz, gastroenterit, enteriditis ateş, septisemi gibi birçok sendroma sebep olur. Her bir serovar farklı sendromlar oluşturmaya meyillidir. *S. typhi*, *S*. paratyphi-A, ve *S. schottmuelleri enteriditis* ateşe sebep olurken; *S. choleraesuis* septisemi ve merkezi enfeksiyonlara, *S. typhimurium* ve *S. enteriditis* gastroenterite yol açmaktadır ancak herhangi bir serovar herhangi bir sendromu oluşturma kapasitesine sahip olabilir.

En ciddi enfeksiyonlar çocuklarda ve 50 yaşın üzerindeki yetişkinlerde ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır. [45].

Sistemik olarak enjekte edilen *Salmonella*'nın karaciğer ve dalak gibi dokulara kıyasla tümör içerisinde 1000 kat daha fazla biriktiğinin gösterilmesi bu bakteri türünün etkili bir antikanser ajanı olarak kullanımının araştırılmasını sağlamıştır [46]. Fakültatif anaerob olan *Salmonella*'nın başarılı bir şekilde tümörleri hedeflemesinde ve tümörler içerisinde seçici bir şekilde birikmesinde 5 farklı mekanizmanın etkili olduğu düşünülmektedir. Tümörlerin kılcal kan damarlarındaki karmaşık yapıda kapalı kalması, dokudaki inflamasyon sebebi ile tümörlere doğru yönlenmesi, tümörler tarafından üretilen bileşiklere kemotaksis yapması, tümör mikroçevresinde seçici bir şekilde çoğalması ve tümör içerisinde saklanarak bağışıklık sisteminden kaçması *Salmonella*'yı kanser tedavisinde kullanılmak üzere etkili bir aday yapmaktadır [4].

Son yıllarda yapılan çalışmalar *Salmonella*'nın doğal olarak sitotoksik olduğunu ve yalnız başına enjekte edilse bile tümörlerde gerilemeye sebep olduğunu göstermiştir [34]. Bağışıklık sistemini duyarlılaştıran *Salmonella choleraesuis*'in nötrofil infiltrasyonuna ve antitümör cevabına sebep olduğu gösterilirken [47], insanlarda yapılan klinik araştırmalarda modifiye edilmiş Lipid A molekülü taşıyan *Salmonella* VNP20009 suşu sağlıklı dokulara toksik özellik göstermemiş ve tümör içerisinde birikmiştir [48]. Yine aynı *Salmonella* suşunun köpekler ile yapılan çalışmasında bakterinin tümör kolonizasyonu sonucu 35 deneğin 4'ünde tümörün tamamen yok olduğu gözlenmiştir [49]. Ayrıca *Salmonella* ağız yoluyla da verildiğinde farelerde tümörde birikmiş ve sistemik enjeksiyona nazaran çok daha az toksisite gözlemlenmiştir [50].

Bakteriler ayrıca salgıladıkları sitotoksik ajanlar ile de kanser tedavisinde kullanılmaya aday olabilirler. Cytolysin A molekülü bir bakteriyel toksin olup memeli hücre membranlarında delikler açarak apoptoza sebep olmaktadır. Bu toksin bakteri yüzeyine gönderilmekte ve bir değişikliğe uğramadan bakteri tarafından çevreye verilmektedir. ClyA salgılayan *Salmonella typhimurium*'un da tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir [51]. Bağışıklıktan sorumlu olan kan hücrelerinin aktivitesini kontrol eden Enteriditis II de bakterilerin kanser tedavisinde kullanımı için sıklıkla çalışılan bir sitokindir. Genetik olarak değiştirilmiş *Salmonella* tarafından salgılanan IL-

2'nin isabetli bir şekilde vücut bağışıklık sistemini uyardığı ve tümör oluşumunu gerilettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [52].

Ayrıca *Salmonella* ile DNA transferi yapılabildiği ve böylece kanser hücrelerinin sitotoksik ya da immünolojik ajanları salgılamaları sağlanıp kendi kendilerini yok edebildikleri rapor edilmiştir [53]. *Salmonella* suşlarının prostat kanserinde RNA interferansı yapabildiği [54] ve insan meme ve kolon karsinomalarında pasif ilaç ajanını aktif ilaca döndürebildiği de yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [55]. Salmonella ile tedavisi denenen hücre hatları ve tümörler meme, kolon, pankreas, prostat kanserleri, hepataselülar karsinoma, melanoma, nöroblastoma, omurilik gliomasıdır [4].

2.3.2 *Listeria* sp.

Listeria monocytogenes fakültatif hücre içi bir bakteridir (Şekil 2.3). Aktif fagositoz ile yüzeyinde antijen bulunduran hücrelere girer ve güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturur. Oluşturduğu bu güçlü bağışıklık yanıtı *Listeria*'yı kanser tedavisinde kullanılmak için ideal bir aday yapmıştır. Ayrıca potansiyel bir aşı vektörüdür ve fare modelli çalışmalarında rekombinant *Listeria* ile tümörlü hücrelerin yüzeyinde birçok antijen oluşturarak tedavi edici bağışıklığın arttırılması sağlanmıştır [56].



Şekil 2.3. *Listeria monocytogenes* [57]

Listeria'nın taşıdığı antijenlerin bağışıklık sistemini CTL cevabı ile uyardığının 1992 yılında gösterilmesiyle birlikte *Listeria* üzerine araştırmalar hız kazanmıştır [58]. Yapılan çalışmalar ile PSA, Mage-b, HER-2/neu, tyrosinase and HPV-16 E7 gibi doğal tümör antijenleri ile influenza and LCMV nükleoprotein gibi viral proteinler melanom, prostat, meme, rahim ağzı, böbrek ve kolon kanserlerinin fare modellerinde denenmiş ve transgenik farelerde onkojenik tümör antijenleri başarılı bir şekilde tümör yüzeylerinde gösterilmiştir [59]. Her-2/neu kimerik *Listeria* aşısı ile meme kanserli fareleri aşılama varolan tümörlerin küçülmesine ve akciğer metastazının önlenmesine yardımcı olmuştur [60]. Yapılan başka bir çalışmada ise *L. monocytogenes*'in tümör hücrelerine plasmid cDNA'sı göndererek CD8+ T hücrelerini etkinleştirdiği ve *Listeria*'nın kanser tedavisinde DNA aşısı vektörü olarak kullanılabileceği de gösterilmiştir [61].

2.3.3 *Eschericia* sp.

Eschericia coli, *Eschericia* sp. içerisinde en çok bilinen türü olup Gram-negatif, fakültatif anaerop ve spor oluşturmayan bakteridir. Hücreler genellikle çubuksu ve 2.0 μm uzunluğunda ve 0.25–1.0 μm çapında, ve 0.6–0.7 μm^3 hacmindedirler (Şekil 2.4) [62]. Genellikle sıcak kanlı hayvanların bağırsağında bulunurlar ve bir çok suşu zararsızken, bazı serovarları gıda kontaminasyonları sonucu ciddi gıda zehirlenmelerine sebep olurlar. Zararsız türleri bağırsaklarda normal floranın bir bileşenidir ve K2 vitamini üreterek fayda sağlarken bağırsaklarda patojenik bakterilerin kolonize olmalarını engellerler [63, 64]. *E. coli* bakteri hücreleri vücut dışında belirli bir süre yaşayabildikleri için fekal-oral bulaş patojen *E. Coli* türlerinin hastalığı oluşturmadaki başlıca yoludur.

Salmonella gibi fakültatif anaerob olan *Escherichia coli* yine *Salmonella* ile benzer tümör hedefleme mekanizmalarını kullanır. Genetik mühendisliğinde standart bir organizma olan *E. coli* ile hızlı ve basit genetik manipülasyonlar yapılabilmektedir. Son 10 yılda yapılan araştırmalar *E.coli*'nin tümörler içerisinde biriktiğini göstermiştir [65]. *E. coli* K12 suşunun sıçan 4T1 meme karsinomuna sahip farelere enjekte

edilmesinin anti-tümör cevabını stimüle ettiği ve solunum sistemi metastazlarını azalttığı gösterilmiştir [66].



Şekil 2.4. *Escherichia coli* taramalı elektron mikroskop görüntüsü [67]

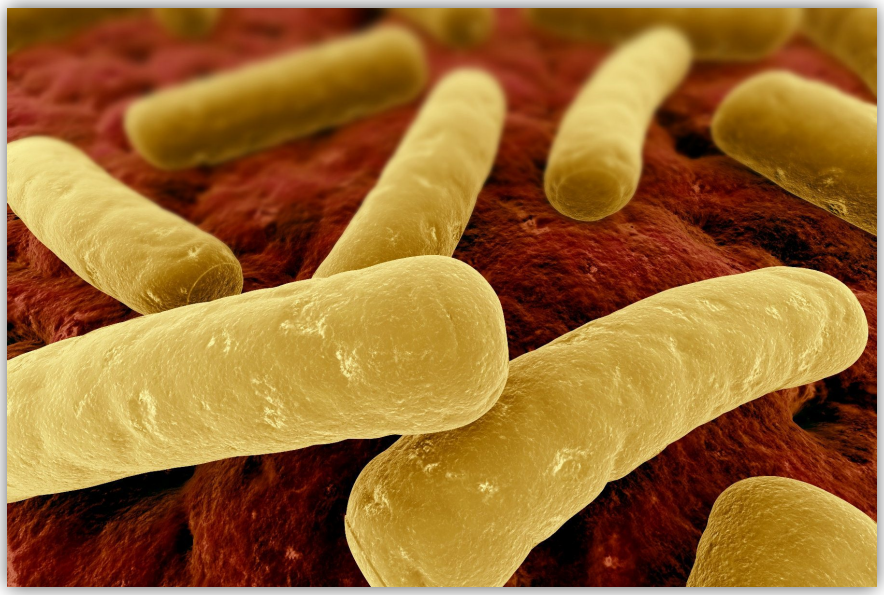
Ayrıca *Escherichia coli* sağlıklı dokulardansa kanserli dokuları özellikle hedef almaktadır. Stritzker ve ark. tarafından yapılan çalışmalar *E. Coli* suşlarının dalak ve karaciğerde tümör dokularına göre daha az biriktiğini göstermiştir. *E. coli*'nin bu hedeflenmiş kolonizasyonu, *Salmonella* gibi fakültatif anaerob olmasındandır. Aynı çalışmada probiyotik olan *Escherichia coli* Nissle 1917 suşunun L-arabinoz indüklenebilir gen promotörleri ile seçici bir şekilde tümörlü bölgeye protein taşıyabildiği gösterilmiştir [68]. Yine aynı grup tarafından yapılan çalışmada *E. coli* suşunun tümör mikroçevresini değiştirerek tümörün sitotoksik ilaçlara daha açık hale gelmesini sağladığı ispatlanmıştır [69]. *E. coli*'nin K12 suşu kullanılarak bir sitotoksik protein üretmesi sağlanmış ve bakteriyel tedavi radyoterapi ile birlikte uygulandığında tümör baskılanması ve metastaz azalması gösterilmiştir [11].

2010 yılında yayınlanan bir araştırmada ise *Escherichia coli* DH5α'nın canlı hayvanlarda yapılan deneylerinde tümör ve metastazlarda seçici olarak çoğaldığı ancak tümör içerisine girmeyip çözünebilir TRAIL için iyi bir vektör olduğu gösterilmiştir. TRAIL tümör hücrelerinin apoptozunu hücre yüzeyi ölüm reseptörlerini aktive ederek gerçekleştirmektedir. sTRAIL eksprese eden *Escherichia coli* DH5α suşunun

intratümör ve intravenöz enjeksiyonlarının tümörü hedef alan biyolojik moleküller sentezlemesi sonucu tümör büyüme oranlarında hızlı bir düşüş ve tümörlü farelerde yaşam süresinde artış gözlemlenmiştir. Ayrıca bakteriyel terapi uygulanan farelerde toksisite tespit edilmemesi sebebi ile *Escherichia coli* DH5α ile sTRAIL sentezinin tümör tedavisinde etkili ve uygulanabilir bir yöntem olabileceği öne sürülmüştür [70].

2.3.4 *Clostridium* sp.

Gram-pozitif , zorunlu anaerop ve endospor oluşturan bir bakteri cinsi olan *Clostridium,* bünyesinde bir çok insan patojeni türü barındırmaktadır (Şekil 2.5). Normal vejetatif formdaki *Clostridium* bakterileri çubuk şeklinde iken, *Clostridium* endosporları yumurtamsı, diğer bakteri endosporlarından ayırt edici biçimde lobut biçimindedirler. *Clostridium* türleri toprakta, hayvanların ve insanların bağırsaklarında ve kadınların genital sistemlerinin alt bölümlerinde yaşarlar [71].



Şekil 2.5. *Clostridium difficile* [72]

Clostridium botulinum özellikle konserve gibi yiyeceklerde ve açık yaralarda botulinum toksinleri oluşturarak botilizme sebep olurken aynı toksin Botox olarak bilinen ve yüz kaslarının paralize edilmesi olan estetik cerrahi uygulamalarında da

kullanılır. *Clostridium perfringens* gıda zehirlenmesinden gazlı gangrene kadar bir çok semptoma sebep olurken, *Clostridium tetani* tetanoza sebep olmaktadır. Antibiyotik tedavileri sonucu normal florasını kaybeden bağırsaklarda kolonize olan *Clostridium difficile* ise ciddi enfeksiyonlara ve kalın bağırsağı nekrotize ederek ölümcül psöydomembranöz kolite sebep olur [73].

Bakterileri kanser tedavisinde kullanmanın en büyük avantajı tümörlerin seçici bir şekilde hedeflenebilmesidir. Bakterilerin tümörler içerisinde birikme mekanizmaları oksijen toleranslarına göre değişmektedir. *Clostridium* sp. ve *Bifidobacterium* sp. gibi zorunlu anaeroblar oksijenli ortamda yaşayamazlar ve enjekte edilen sporlar sadece tümörlerin oksijensiz ortamlarında çoğalmaktadırlar [11]. Tamamen oksijensiz doku ortamları tümörlere özgüdür ve vücudun başka herhangi bir yerinde bulunmazlar. Bu yüzden zorunlu anaerob olan bakteriler tümörlerde birikmede oldukça başarılıdırlar [12]. *Clostridium* enjekte edilen fareler arasında sadece tümörlü farelerin enfeksiyondan öldüğü görülünce, canlı bakterilerin kanser tedavisinde kullanılabileceği 20. yüzyılın ortalarına doğru daha da ilgi çekmeye başlamıştır [74]. Antibiyotiklerin varlığının ve kullanımının artması ve tümörlerin oksijensiz kısımlar içerdiğinin gösterilmesi *Clostridium* gibi zorunlu anaerob bakterilerin tümörleri küçültebileceği olasılığını arttırmıştır [75]. Ayrıca *Clostridium butyricum* ile yapılan küçük ölçekli bir klinik araştırmada 5 hastanın 3'ünde tümörlerde onkolizis gözlemlenmiştir [76].

Bakterilerin tümörleri hedeflemesinde en iyi anlaşılmış mekanizmalardan birisi hipoksik çoğalmadır ve bakteri sporları damar yolu ile enjekte edildiklerinde zorunlu anaerob olanlar sadece oldukça sınırlı oksijenli ortamda yaşayabildikleri için tümörlerin hipoksik alanlarında kolonize olurlar. *Clostridium* anti-kanser ajanı olarak ilk çalışılan zorunlu anaerobdur ve 1960'lı yıllara birçok araştırma *Clostridium*'un farelerde [74] ve insanlardaki tümörlerin nekrotik alanlarında biriktiğini göstermiştir [76].

Clostridium novyi-NT sporlarının redoks proteinleri için mRNA içerdikleri ve üremeye geçtiklerinde lipazlar üreterek tümörlerin çevresinde içerisinde çok iyi büyüdükleri ve çoğaldıkları gösterilmiştir [77] Patojenik olmayan *Clostridium acetobutylicm*'un sporları tümörlerdeki kan damarlarını hedef alan combretastatin A-4 fosfat ile tümörlü sıçanlara uygulanmış ve bakterilerin tümör içerisinde etkili bir biçimde üredikleri görülmüştür. Böylece *Clostridium* bakterisinin anti-vaskular ajanlar

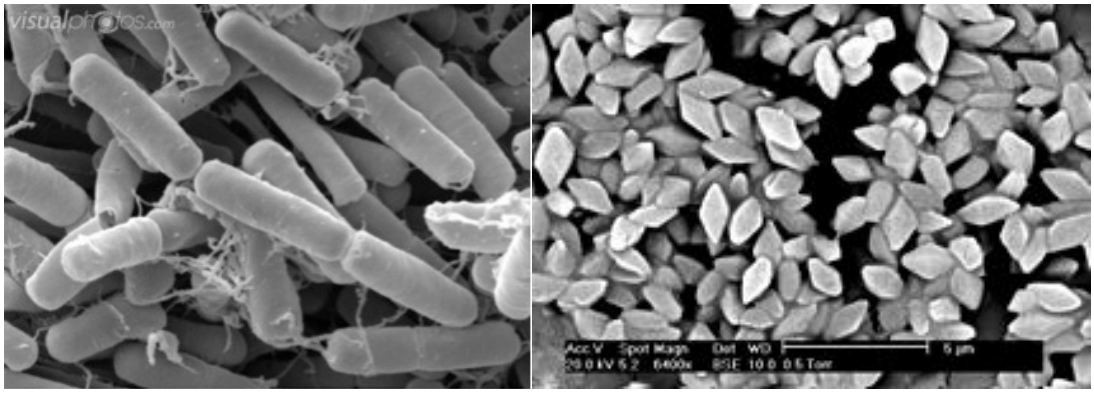
ile birlikte kullanılmasının tümörlerdeki hipoksik alanları hedeflemede başarılı olabileceği gösterilmiştir [78]. *C. novyi* NT sporlarının farelerin avaskular ve nekrotik tümör dokularında birikip kemoterapatik ve anti-vaskular ilaçlar ile birlikte kullanıldıklarında tümörlerde fark edilir bir küçülme yarattıkları gösterilmiştir [79]. Ayrıca radyoterapi ile birlikte uygulanmaları tümörlerdeki küçülmeyi daha da arttırmıştır [80].

Bakterilerin kanser tedavisinde kullanımında farklı bir yaklaşım ise pasif ilaçların bakterilerin ürettikleri enzimler sayesinde aktif ilaçlara çevrilmesidir. *Salmonella* sp. ve *Clostridium* sp. bakterileri ile sentezlenen sitozin deaminaz 5-fluorositozini 5-fluorourasile çevirmiş ve klinik araştırmalarda kullanılmıştır [81]. Ayrıca nitroredüktaz sentezleyen *Clostridium* sp. tümörün çevresinde pasif bir ilacı 1000 kat daha toksik bir ilaca çevirerek tümörün fark edilir bir şekilde küçülmesini sağlamıştır [82]. Farklı bir strateji olarak ise bakteriler fizyolojik cevap oluşturmak amacı ile biyolojik olarak aktif molekülleri tümör çevresine taşıyabilirler. Yapılan in vitro çalışmalarda *Clostridium* sp.'nin enteriditis-2'ye benzer bir molekül üreterek T-hücreleri tarafından gerçekleştirilen hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir [83].

2.3.5 *Bacillus thuringiensis*

Spor oluşturan Gram pozitif bir bakteri olan *Bacillus thuringiensis* (Bt) vejetatif ve spor halindeki formunda toksik proteinler salgılamaktadır (Şekil 2.6). *Bacillus thuringiensis*'in spor oluşturan formunda salgıladığı parasporal kristal yapıdaki Cry ve Cyt proteinlerini içeren toksinlerin bir çok böcek ve nematoda etki ettiği bilinmekte ve tırtıl, karasinek, sivrisinek gibi canlılarla biyolojik mücadelede etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Vejetatif formdaki Bt ise büyüme ortamına salınan toksik proteinler salgılamaktadır. Vip (vejetatif insektisidal protein) olarak bilinen bu proteinler ise lepidopter, koleopter ve homopterlere karşı etkilidir [84].

Bacillus thuringiensis parasporal proteinlerin anti kanser etkileri 1970'lerden biliniyor olmasına rağmen 1990'lara kadar pek fazla araştırma yapılmamıştır. Bt toksinlerinin doğada sıklıkla bulunmaları ve sağlıklı insan hücrelerinden ziyade insan kanser hücreleri üzerine seçici etkisinin olması onların özellikle Japonya ve Malezya'daki kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmalarını sağlamıştır [85].



Şekil 2.6. a. *Bacillus thuringiensis* **b**. Parasporal insektisit kristalleri [86]

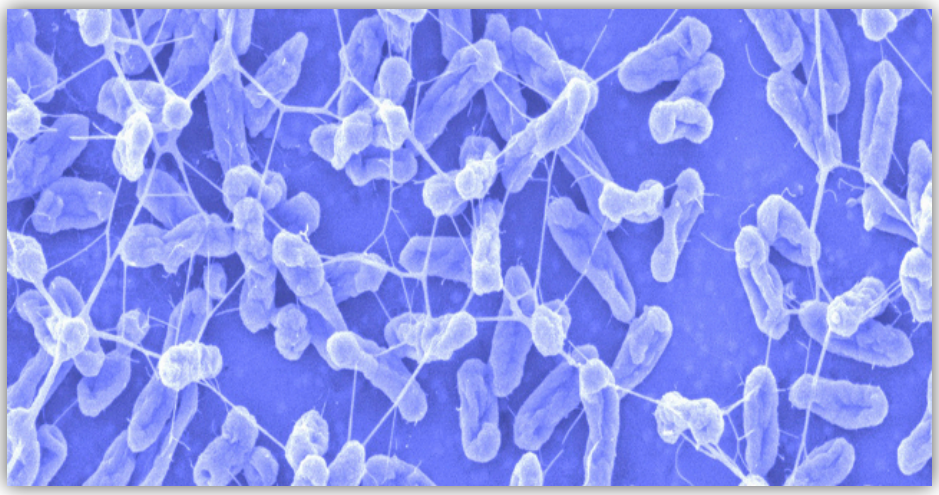
2005 yılında Yamashita ve arkadaşları tarafından yayınlanan 3 bölümlü Cry proteinlerinin miyeloid lösemi ve karaciğer kanser hücreleri üzerindeki seçici sitosidal etkilerinin gösterilmesi ile ilk bilimsel kanıtlar oluşturulmuş ve Bt konusundaki çalışmalar hızlanmıştır [87]. Daha sonra Bt 18 parasporal proteinin T lenfoblastik lösemi hücreleri üzerine etkisi gösterilmiştir [88]. Parasporin-1 proteininin ise kanser hücrelerinde protein sentezini inhibe ederken aynı zamanda Ca^{+2} seviyesini yükselterek hücre ölümüne sebep olduğu ve HeLa, Sawano, HepG2, HL-60 ve MOLT-4 kanser hücreleri üzerinde seçici sitotoksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir [89]. Pro-parasporin-2 toksininin ise proteinase-K etkisi ile aktifleşip hücrelerin plazma zarlarındaki yağlara bağlandığı ve HepG2 ile Jurkat insan kanser hücreleri üzerinde normal hepatositlere göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur [90]. Parasporin-3'ün ise kanser hücrelerinin plazma membranlarında delikler oluşturarak plazma membran geçirgenliğini arttırdığı ortaya çıkarılmıştır [87]. Parasporin-4 toksini ise CACO2, Sawano ve MOLT-4 kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahipken, hücrelerde büzüşme, parçalanma, çekirdekte parçalanma, hücre zarı patlaması ve sitoplazma içeriğinin dışarı boşalması ile hücre ölümlerine sebep olmaktadır [91]. İnsan hepatosit ve serviks kanser hücrelerinin ise Parasporin-5 ve 6'nın membran delikleri oluşturan proteinler ile seçici bir şekilde yok edildiği açığa çıkarılmıştır [92].

Bacillus thuringiensis parasporinleri vasıtası ile seçici olarak hücrelerdeki hedef reseptörlere bağlanmakta ve insan kanser hücrelerinde ölümü tetiklemektedir.

Sitotoksisite ise etki eden protein ve hedef hücre tipine göre değişmekle birlikte Bt kanser tedavilerinde kullanılabilecek potansiyel bir ajandır.

2.4 *Serratia entomophila*

Serratia entomophila Yeni Zelanda'da doğada bulunan bir toprak bakterisidir (Şekil 2.7). pADAP plasmidi içeren suşlarının Yeni Zelanda'da ot kurtçuklarında (*Costelytra zealandica*) amber hastalığı oluşturduğu bilinmektedir. Bakteri biyopestisit olarak ot kurtçuklarına karşı 25 yıldan uzun süredir kullanılmakta ve güvenlik testlerinden geçmiş bulunmaktadır. Yüksek dozlar küçük memelilerde test edilmiş ve ağız, periton içi, dermal ve göz temaslarında herhangi bir istenmeyen etkiye rastlanmamıştır [93].



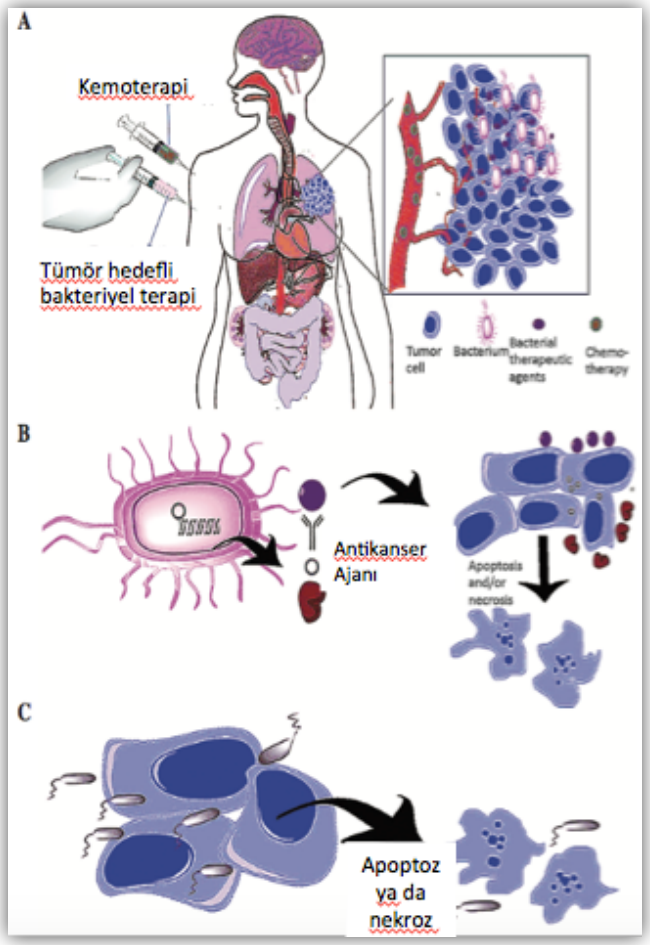
Şekil 2.7. *Serratia* sp. taramalı elektrom mikrografı [94].

Serratia entomophila ile biyopestisitlerin biyogüvenliği amaçlı yapılan toksisite testleri bulunmaktadır ancak kanser hücreleri ile bir çalışma yapılmamıştır [95]. Çalışmamızda bu konudaki ilk veriler sağlanmıştır.

2.5 Bakteriler İle Yapılan Klinik Araştırmalar

Bakterilerin kanser tedavisinde kullanım şekilleri ajan olarak kullanılan bakteriye ve hedef alınan kanser hücrelerinin duyarlılıklarına göre değişmektedir. Genel

bir sınıflandırma yapıldığında bakteriler ve ürünleri 5 farklı şekilde kullanılabilirler. Bakterinin kendisini tek başına ya da kemoterapi ile birlikte anti-kanser ajanı olarak (Şekil 2.8.a ve Şekil 2.8.c), bakterileri vektör olarak kullanarak ya da immünotörepatik ajan olarak (Şekil 2.8.b), bakterilerin toksinlerini ya da sporlarını kullanarak potansiyel olarak kanser tedavisi gerçekleştirilebilmektedir. Doğada varoldukları gibi, zayıflatılmış ya da genetik olarak modifiye edilmiş halde kanser tedavilerinde kullanılan bakteriler *Bifidobacterium*, *Caulobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Listeria*, *Proteus*, *Salmonella* ve *Streptococcus* iken, anti-kanser ajanı salgılamaları sağlanıp tedavide kullanılan bakteriler *Salmonella*, *Escherichia*; gen transferi, RNA interferansı ve inaktif ilaçların aktif hale getirilmesini sağlayanlar ise yine yapan *Salmonella*, *Escherichia* ve ek olarak *Clostridium*'dur [4].



Şekil 2.8. Bakterilerin tümör tedavisinde kullanım yöntemleri [96]. (a. tek başına ya da kemoterapi ile birlikte anti-kanser ajanı olarak b. vektör olarak kullanılarak ya da immünotörepatik ajan olarak c. Apoptoz ya da nekroz indükleyici olarak)

2.5.1. *S. typhimurium* VNP20009 25 denekli faz I çalışması

Salmonella typhimurium'un VNP20009 suşu purI ve msbB genlerinin kromozomlar üzerinden silinmesi ile zayıflatılmış ve tümörleri hedefleyip tümör büyümesini engellemesi amaçlanmıştır. Toso ve ark. tarafından Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'nde yapılan bu çalışmada 24 metastatik melanoma hastası ile 1 metastatik renal hücre hastası VNP20009'un damariçi enjeksiyonu ile Faz I çalışmasına katılmıştır [97]. 30 dakika boyunca 10^6'dan 10^9'a kadar farklı cfu/m^2'deki VNP20009 suşu hastalara damar için infüzyon şeklinde verilmiş ve hastalar doza bağlı toksisite, seçici tümör içi bakteri çoğalması ve antitümör etkisi göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Maksimum tolare edilen doz $3x10^8$ cfu/m^2 olarak saptanmış ve doz sınırlanarak toksisite 1 x 10^9 cfu/m^2'de görülmüş, bu dozda anemi, kalıcı bakteremi, trombositopeni, hiperbilirubinemi, ishal, kusma, baş dönmesi, hipofosfatemi oluşmuş ve kanda alkaline fosfat değerleri yükselmiştir.

VNP20009'un dozuna bağlı olarak kan dolaşımındaki interlökin (IL)-1beta, tümör nekroz faktörü alfa, IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatör sitokinlerin değerleri yükselmiştir. 1 x 10^9 cfu/m^2 doz alan 2 denekte ve $3x10^8$ cfu/m^2 doz alan 1 denekte tümör içi odaklanmış lokalizasyon gözlemlenmiştir. Bakterilerin tümör içine kolonize olduğu hastalar dahil hiçbir denekte ayırt edilebilecek şekilde tümör küçülmesi gözlemlenmemiştir. 25 denek ile yapılan ve zayıflatılmış *Salmonella typhimurium* VNP20009 suşunun güvenli bir şekilde hastalara verildiği bu çalışmada tümör kolonizasyonu gözlemlenirken en yüksek dozlarda bile tümör küçülmesi elde edilememiştir. Antitümör etkisi gözlemlenmemiş olmakla birlikte doza bağlı toksisiteyi azaltacak ve tümör içi bakteri lokalizasyonunu arttırmayı başaracak araştırmalar yapılması gerekmektedir [97].

2.5.2 *S. typhimurium* VNP20009 4 denekli faz I çalışması

2003 yılında 4 denek ile yapılan bu çalışmada Toso ve ark.'nın [97] 2002 yılında kullanmış oldukları patojenliği değiştirilmiş ve büyüyen tümör dokularında lokalizasyonu arttırılmış *Salmonella typhimurium* VNP20009 suşu kullanılmıştır. Yeni çalışmada bir önceki 30 dakikalık bakteri infüzyonu yerine 4 saatlik genetik olarak

modifiye edilmiş canlı VNP20009 suşu infüzyonu gerçekleştirilmiştir. Dolaşımdaki bakteri seviyesini yüksek tutmanın VNP20009 suşunun tümöre ulaşmasını ve tümör içi kolonizasyonu arttıracağı hipotezi ile bir önceki çalışmada maksimum tolere edilen doz olarak saptanan $3x10^8$ cfu/m^2 dozu kullanılmıştır. 4 saatlik infüzyonun kısa doz aralıklarına göre daha iyi tolere edilmesi beklenmiştir [98].

Bir önceki çalışmaya katılan 25 hasta ile aynı seçim kriterlerine uygun olan 40 ile 56 yaş arasında ve önceki tedavilere rağmen tümör büyüklükleri artan 4 hasta çalışmaya katılmıştır. 4 saatlik infüzyon iyi tolere edilmiş olup infüzyon sırasında yan etkiler geçici ateş, terleme ve kusma gibi basit belirtilerle kalmıştır. Bir hasta oksijen verilmesine sebep olan hipoksi ve hastane çıkışı migren ağrıları yaşamış olup bir diğer hastada 24 saat içerisinde düzelen hipofosfatemi görülmüştür. Ancak bu hastanın tedavi öncesinde ileri derecede hiperüremisi olduğu bilinmektedir.

Kandaki VNP20009 bakterilerinin tespiti için belirli aralıklarla kan örnekleri alınmış ve infüzyondan 6 saat sonrasında hiçbir hastanın kanında bakteriye rastlanmamıştır. Benzer olarak idrar ve dışkı tahlillerinde de bakteri gözlemlenmemiştir. Ayrıca bu testler 2 hafta ve 1 ay sonrasında da tekrarlanmış, bakteri varlığı görülmemiştir.

Bütün deneklere terapiden 2 hafta sonra tümör biyopsisi yapılmıştır. Biyopsiden önce sefazolin ile koruyucu antibiyotik tedavisi alan hastanın tümöründe 1 adet *Salmonella* kolonisine rastlanmıştır. Terapiden sonraki 1 aylık kontrollerde ise 2 hastanın tümörlerinde büyümenin devam etmesi sonucu başka kanser tedavilerine devam edilmiştir. Üçüncü hastanın biyopsisinde ise tümöre rastlanmamış ve 3 ay boyunca bir tümör gelişimi olmamıştır. Sonuncu hastada ise ilk başlarda tümör sayısında azalma ve tümör boyutlarında küçülme elde edilmiş olsa da 2 aylık takipte hastalığın geliştiği gözlemlenmiş ve farklı bir tedavi programına alınmıştır.

4 denek ile yapılan bu çalışmada özet olarak, *Salmonella typhimurium* VNP20009 suşunun hastalara hafif yan etkiler ile 4 saatlik bir periyotta $3x10^8$ cfu/m^2 dozu kullanılarak güvenle enjekte edilebileceği ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca tedavi başlangıcından 6 saat sonrasında kan, idrar ve dışkı örneklerinde bakteriye rastlanmamış, tümör içerisinde ise 2 haftadan sonra bakteri kolonizasyonu görülmemiştir. Bir hastanın tümörlerinin tamamen yok olmuş olmasına rağmen kullanılan bakterinin antitümör etkisi klinik olarak açıkça ortaya konamamıştır [98].

2.5.3. *S. typhimurium* VNP2009 TAPET-CD 3 denekli faz I çalışması

Nemunaitis ve ark. tarafından 2003 yılında yapılan çalışmada *E. coli* sitozin deaminaz geni sentezleyen zayıflatılmış bir *Salmonella* suşu olan TAPED-CD kullanılmıştır. İnatçı kanser öykülerine sahip adenokarsinoma ve skuamöz hücre karsinoması olan hastalara bakteriler tümör içi enjeksiyon vasıtası ile uygulanmıştır. Toplam 3 denekli olan bu çalışmada hastalara $3x10^6$ CFU/m^2 ile $3x10^7$ CFU/m^2 arasında değişen 3 farklı doz uygulanmış ve 28 gün boyunca hastalıkta ilerleme görüldükçe ya da toksisite gözlemlenmedikçe bakterilerin tümör içi enjeksiyonlarına devam edilmiştir. 28 günlük sürecin 4. ile 14. günü arasında hastalara ayrıca 100 mg/kg/gün olacak şekilde günde 3 kez 5-florositozin (5-FC) verilmiştir. Tedavi 6 kez tekrarlanmış olup TAPED-CD'ye bağlı herhangi bir yan etki gözlemlenmemiştir [99].

3 hastanın 2'sinde tümör içi TAPED-CD bakteri kolonizasyonu gözlemlenmiş ve ilk enjeksiyondan 15 gün sonraya kadar bu kolonizasyon devam etmiştir. Ayrıca 5-FC'nin aktif kanser ajanı olan 5-florourasil (5-FU)'ya sitozin deaminaz ekspresyonu ile çevrildiği bu 2 hastada gösterilmiştir. 5-FU'nun tümör içi bakteri kolonizasyonu görülen hastalarda tümör:plazma oranı 3 olarak bulunmuş ve böylece TAPED-CD'nin tümör içi kolonizasyonunun 5-FU kanser ilacı değerlerini istenilen biçimde tümör içerisinde yükselttiği ve bakterinin sistemik yayılımının önemli derecede olmadığı ispatlanmıştır. Bu bulguların aksine, tümör içerisinde TAPED-CD bakteri kolonizasyonu görülmeyen hastada 5-FU tümör:plazma oranı 1'den az bulunmuştur [99]. Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki *Salmonella* bakterisi sitozin deaminaz gen ürününün başarılı bir şekilde tümöre iletilmesini sağlayan bir araç olarak kullanılabilmekte ve bu gen ürünü ile $3x10^7$ CFU/m^2 bakteri dozlarının altında bile başarılı bir şekilde 5-FC aktif 5-FU'ya dönüştürülebilmektedir.

2.5.4. *Pseudomonas* IL4-PE

Her yıl sadece Amerika'da 10000 fazla kişiye kötü huylu astrositoma tanısı konmaktadır. Ameliyat, radyoterapi ve kemoterapiye rağmen pek fazla iyileşme gözlenememektedir. Yeni antijenler ve ya reseptörlerin açığa çıkarılmasına dayalı hedeflenmiş toksinler bu hastalığın tedavisinde umut verici yaklaşımlardır. 1999 yılında

Puri tarafından yapılan araştırmada kötü huylu astrositoma hücrelerinde enteriditis (IL-4) reseptörü (IL-4R) formunda bir yüzey proteini keşfedilmiştir [84]. Frontal korteks ve temporal lobdaki beyin dokuları normalde IL-4R sentezlememektedir. Tümörlerdeki IL-4R reseptörlerini hedeflemek amacı ile IL-4 ve *Pseudomonas* ekzotoksin (IL4-PE) içeren bir kimerik füzyon proteini oluşturulmuştur. Bu toksin IL-4R yüzey reseptörlerine sahip olan hücrelere fazlasıyla toksiktir. Maksimum tolere edilebilen dozun saptanması amacı ile klinik öncesi toksikoloji deneyleri fare, sıçan ve domuzlarda gerçekleştirilmiş olup maymunlarda beyin zarı içerisine enjeksiyonu sayesinde merkezi sinir sisteminde ya da herhangi bir sistemde anormalite oluşturmadan serebrospinal sıvıda yüksek toksin seviyelerini sağlamıştır.

IL4-PE sıçanların sağ frontal korteksine enjekte edildiğinde, 1000 μg/ml dozunda lokal tümör nekrozu görülürken aynı etki 100 μg/ml dozu için gözlemlenmemiştir. Kimerik toksinin damar yolundan verilmesinde ise maymunlarda yüksek hepatik enzim seviyeleri görülmüştür. Puri tarafından yapılan bu çalışma ile IL4-PE kimerik proteinin bölgesel olarak uygulanması ile sistemik toksik etki oluşmadığı ve astrositomada anlamlı bir tedavi sağlandığı kanıtlanmıştır [100]. Çıplak (nude) fare ile yapılan in vivo deneylerde IL4-PE'nin insan glioblastoma tümör modeline karşı anlamlı şekilde etkili bir antitümör aktivitesinin olduğu belirlenmiş ve IL4-PE'nin tümör içi uygulamasının kötü huylu astositoma tedavisinde kullanılmasının faz I klinik çalışması başlatılmıştır.

2.5.5. *Pseudomonas* IL13-PE

Mezotelioma ve yumurtalık kanseri gibi birçok kanser türünde glikofosfotidilinositol ile değişime uğramış bir glikoprotein olan mezotelin ekspresyonu artar. Kanser hastalarının kan örneklerinde ise mezotelinin membran bağlı tipi düşük seviyelerde gözlemlenmekte ve bu mezotelini kötü huylu glioma, glioblastoma multiform, anaplastik astositoma, anaplastik oligodendroglioma ve karışık oligoastrositoma gibi belirli kanser tiplerinin hedeflenmiş tedavileri için uygun bir aday yapmaktadır. Mezoteline yüksek bağlanma kapasitesine sahip (Kd = 0.7 nM) rekombinant immunotoksin SS1(dsFv)-PE38 üretmek amacı ile antimezotelin disülfit-

bağlı Fy (SS1 Fv) mutant *Pseudomonas* ekzotoksin A protein parçası ile birleştirilmiştir.

Fan ve ark. tarafından yapılan çalışmada SS1(dsFv)-PE38 rekombinant proteininin yüksek mezotelin üreten NCI-H226 insan küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerine, mezotelin üretmeyen insan akciğer adenokarsinoma PC14PE6 hücrelerinden daha fazla sitotoksik olduğu gösterilmiştir. 500 μg/kg toksik olmayan rekombinant protein dozu 7,9 ve 11. günlerde iki farklı insan akciğer kanser hücre hattına sahip çıplak (nude) fareye enjekte edildiğinde SS1(dsFv)-PE38, mezotelin üreten NCI-H226 hücrelerinin deneysel ortamda metastaz yapmalarına engel olmuştur [101]. Çalışmadan elde edilen veriler göstermiştir ki Pseudomonas IL13-PE toksini içeren immunotoksin mezotelin üreten skuamöz hücre karsinoması tedavisinde gelecek vaad eden bir antikanser ajanıdır.

2.5.6. *Clostridium butyricum* M-55 5 denekli faz I çalışması

*Clostridium butyricum'*un antineoplastik aktivitesi fare ve insan adenokarsinoma tümörlerinde gösterilmiş olup, klostridyal onkolizin destekleyicisi olarak antibiyotik, kortikosteroid ve elektrolit sıvı tedavisi verilen farelerde yaşam süresinin uzadığı kanıtlanmıştır. 5 denek ile yapılan faz I çalışmasında hastalar $1x10^{10}$ C. butyricum sporları ile tedavi edilmeye çalışılmışlardır. Kan kültürleri bu mikroorganizma için enjeksiyondan 4-9 gün sonrasında pozitiftir ve 3 hastanın boyutları büyük olan tümörlerinde onkoliziz meydana gelmiştir. Ancak küçük tümörlerde böyle bir etkiye rastlanmamıştır. Spor tedavisi bir denekte geçici iyi hal durumuna sebep olurken, bir denekte onkolizize sebep olmuştur. Üçüncü denekte ise onkoliziz gerçekleşmiş ama sebebi klinik olarak gösterilememiştir [102].

Hastaların bakteriyel antikor cevabını ölçmek için özel bir hemaglutinasyon testi uygulanmış ve hem sağlıklı hem de kanser hastası bireylerde düşük antikor seviyeleri gözlemlenirken sporlar ile tedavi edilen 5 hastada antikor seviyeleri belirgin düzeyde artış göstermiştir. Ayrıca bu antikor düzeyleri onkoliz gösteren 3 hastada, tümörlerinde liziz olmayan 2 hastaya göre daha yüksektir. Sporla tedavi sonucu oluşan Clostridyal onkolizizin büyük tümör kütlelerinde fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlar oluşturduğu açığa çıkarılmıştır [102].

2.5.7. *Clostridium butyricum* M-55 49 denekli faz I çalışması

Vaskular gliobalstoması olan 49 hasta ile yapılan çalışmada patojen olmayan *Clostridium butyricum* M 55 sporları kullanılmış ve tümörlerin eridiği gözlemlenmiştir. Sporlar şah damarı içerisine enjekte edilmiş ve onkoliz enjeksiyondan 1 hafta sonra tamamlanmıştır. Glioblastoma tümörleri beyin apsesi halini alıp daha sonra ameliyat ile uzaklaştırılmışlardır. Heppner ve Mose tarafından 49 hasta bu yolla tedavi edilmiş olsa da hastalığın nüksü araştırılmadan bırakılmıştır [10].

2.5.8. *Difteria* Tf-CRM 107

Tf-CRM107 nokta mutasyonu içeren difteri toksini ile transferrin konjuge proteinidir ve yüksek seviyelerde transferrin reseptörü sentezleyen hücreleri seçici bir şekilde öldürür. Kötü huylu beyin tümörüne sahip hastaların tümör içlerine Tf-CRM107'nin konjuge toksini enjekte edilmiştir. Uygulanan hastaların neredeyse yarısında tümör cevabı gözlemlenirken, yüksek dozda Tf-CRM107 alan hastalarda trombisis ve peteşiyal kanama gibi MR ile gözlenebilen toksisite oluşmuştur [103].

Klinik tablo ile uyumlu olarak toplamda 0,025 μg veya daha yüksek dozlarda Tf-CRM107 enjekte edilen sıçanlarda MR ve histolojik çalışmalar ile gösterilen beyin hasarları gözlemlenmiştir. Tf-CRM107 ile tedavi potansiyelinin devam edebilmesi amacı ile vaskular dokuda hasarı engelleme yolları denenmiştir. Tf-CRM107 beynin parankima kısmına enjeksiyonu sonucu vaskular dokunun tümöre göre daha iyi korunması amacı ile Tf-CRM107'nin bu bölgede kan-beyin bariyerinden geçişini bloke eden kimyasallar kullanılmıştır. Klorokin iyi bilinmekte olan bir sıtma tedavi ilacıdır ve difteri toksini ile Tf-CRM107 toksisitesini engellemektedir.

Klorokin ile bloke edilmiş Tf-CRM107'nin sıçanlara sistemik uygulanması sonucu beyin içi tolere edilebilen maksimum doz 0,2 μg'dan 0,3 μg'a yükselmiştir. Ek olarak, klorokin 0,05 μg Tf-CRM107'nin beyin içi infüzyonu sonucu oluşan beyin hasarını engellediği MR görüntüleri ile desteklenmiştir. U251 gliomaya sahip çıplak (nude) farelerde, klorokin uygulamasının Tf-CRM107'nin antitümör etkisini azaltmadığı bulunmuştur [103]. Böylece klorokin uygulaması ile birleştirilen difteri toksini içeren proteinin glioma tedavisinde öncü bir yeri olduğu açığa çıkarılmıştır.

2.6 BAKTERİ VE APOPTOZ İLİŞKİSİ

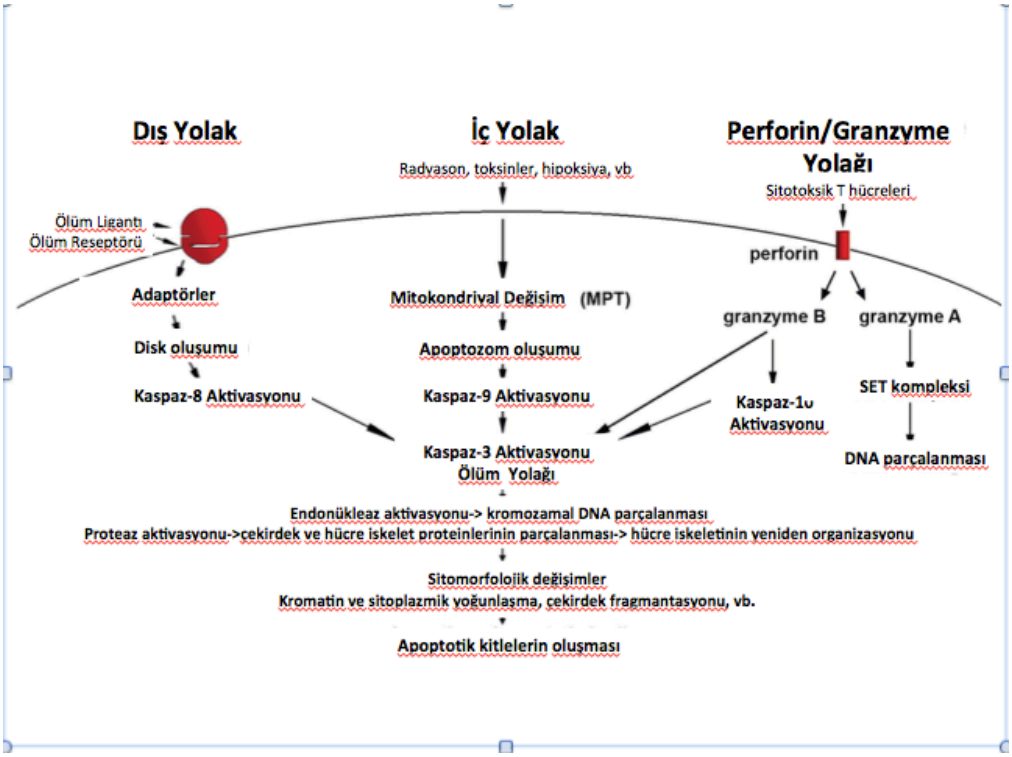
2.6.1. Apoptoz

Programlı hücre ölümü ya da apoptoz belirgin morfolojik özellikler ve enerji bağımlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize edilen hücresel bir süreçtir. Apoptoz normal hücre çevrimi, düzgün gelişim, etkin bağışıklık sistemi, hormon etkili atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal olarak tetiklenmiş hücre ölümü gibi çeşitli hayati süreçlerin bir araya gelmesi sonucu açığa çıkmaktadır [104]. Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Currie, Kerr ve Wyllie tarafından yayınlanan ve hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir türü olarak tanımlandığı makalede geçmektedir [105]. Ancak apoptozun memeli hücrelerinde oynadığı rolün detaylı bir şekilde ortaya çıkması 1999 yılında Horvitz tarafından *Caenorhabditis elegans* üzerinde yapılan araştırmalar ile açıklığa kavuşmuştur [106]. *Caenorhabditis elegans* ergin kurtçuğu oluşurken 1090 adet somatik hücre üretilir ancak bunların 131 tanesi apoptoz ya da programlı hücre ölümü ile yok edilir. Bu 131 hücre gelişimsel süreçte hep belli noktalarda yok edilmekte ve bu hücrelerin konumları kurtçuktan kurtçuğa değişmemektedir. Ortaya çıkartılan bu kararlı ve değişmez hücre ölümleri bu sistem üzerinde hatasızlık ve kontrol olduğunu göstermiştir.

Apoptoz hücrelerin ortadan kaldırılması amacı ile genetik olarak tanımlanmış farklı ve önemli bir hücre ölüm formu olarak tanınmış ve kabul edilmiş olsa da programlı hücre ölümlerinin aponekroz veya otofaji gibi başka formları da bulunur ya da keşfedilmemiş formları olabilir [104].

Apoptoz normalde büyüme, gelişim ve yaşlanma sırasında ortaya çıkan ve dokularda hücre popülasyonlarındaki hücre sayılarını dengeleyen bir mekanizmadır. Apoptoz ayrıca bağışıklık reaksiyonlarında hastalık sonucu ya da hasarlanma sonucu zarar gören hücreleri ortadan kaldırarak vücudun savunma mekanizmasında görev oynamaktadır [107]. Apoptozu tetikleyen gerek fizyolojik gerekse patolojik birçok uyaran ve durum olsa da bütün hücreler aynı uyarı ya da durum sonucu apoptoza girmemektedirler. Kanserin kemoterapi ile tedavisinde kullanılan ilaçlar ya da radyasyon bazı hücrelerde DNA hasarına ve p53 yolağı ile bu hücrelerin apoptozuna sebep olmaktadır. Kortikosteroid gibi bazı hormonlar bazı hücrelerde apoptotik ölüme

sebep olurken bazı hücreler hiç etkilenmemekte hatta uyarana cevap bile vermemektedir. Apoptoza sebep olan yolaklar özet halinde Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Apoptozu tetikleyen dış, iç ve Perforin yolakları [104]

Nörodejeneretif hastalıklar, iskemik zarar, otoimmun bozukluklar ve birçok kanser çeşidinde beklenmeyen apoptozlar görülmektedir. Hücrelerin canlı ya da ölü kalmasını apoptoz ile ayarlayabilme olasılığı tedavisel açıdan birçok olanak sunmaktadır. Bu yüzden hücre siklusunu donduran ve apoptozu başlatan sinyal yolaklarının ve hücre mekanizmalarının açığa çıkarılması ve detaylı bir şekilde aydınlatılması için araştırmalar devam etmektedir.

Memeli hücrelerinin patojenik bakteriler ile teması enfekte olmuş hücrede enteriditis, bakterinin fagositozu, sitokin salınımı, defensinlerin üretilmesi ve oksijen radikallerinin açığa çıkarılması gibi çok çeşitli reaksiyonlara sebep olur. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar bakterilerin konak hücrede apoptozu tetikleyebildiklerini ortaya çıkarmıştır. Enfeksiyonu takip eden apoptoz bakteriyel proteinlerin hücre proteinleri ile etkileşime girmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bakteriler birçok kaspazlar gibi birçok proapoptotik proteini aktive etmekte, NFκB ve MAP-kinaz gibi anti-

apoptotik proteinleri inaktif hale getirmekte, hücre yüzeyindeki reseptör ve ligand sistemlerini regüle etmektedir [108]. Bakteriyel enfeksiyon sonucu ortaya çıkan apoptoz, bakterilerin dokulara ulaşmasını sağlamakla birlikte bazen de memeli savunma sisteminin daha iyi aktive edilmesini sağlayarak konak-patojen ilişkisine farklı bir boyut getirmektedir.

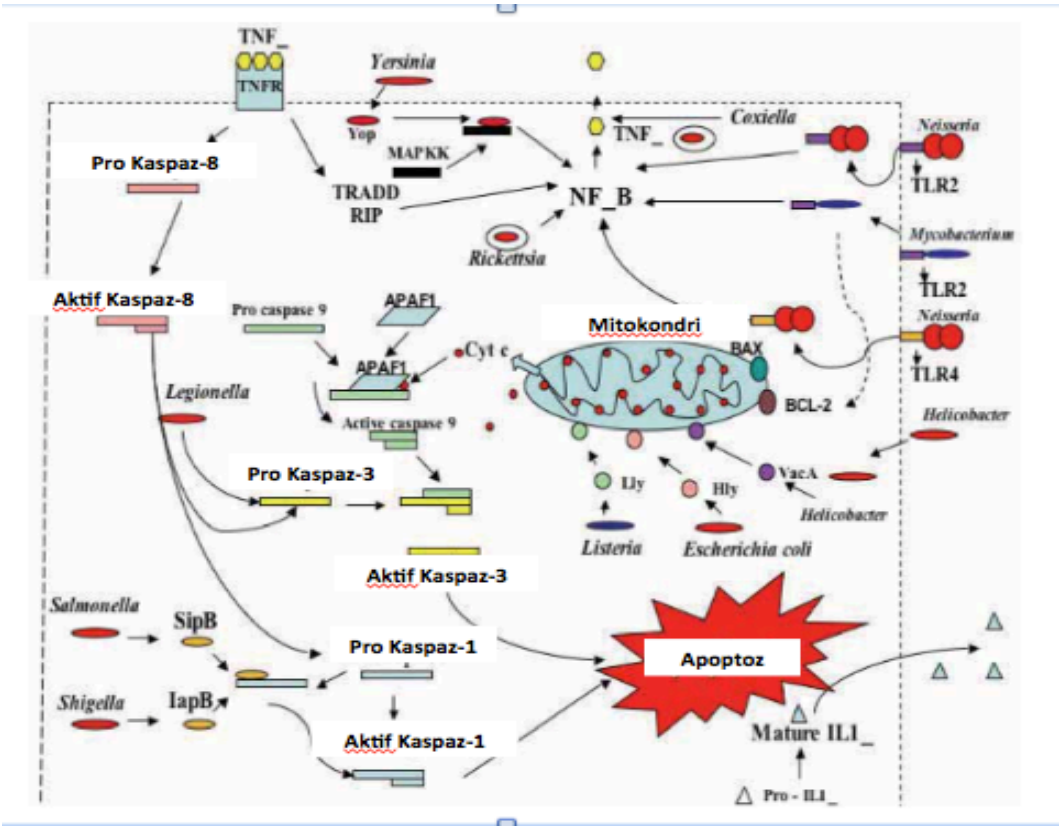
Apoptoz birçok enzim ve sinyal iletim mekanizmalarının birlikte görev alması sonucu açığa çıkmaktadır ve apoptoza katılan proteinler arasında bakteriler tarafından aktive ve inaktive edilen proteinlerden en bilinen ve en önemli olanı kaspaz 3 enzimidir [109]. DNA parçalanması, mitokondriyal değişimler ve hücre membran asimetrisinin değiştirilmesi gibi sonuçların ortaya çıkmasını sağlayan kaspaz 3 birçok hücresel proteini parçalayan bir proteazdır.

Apoptozda görev alan bir diğer yapı ise mitokondridir [110]. Apoptoz sırasında mitokondri depolarize olur, içeriye doğru çöker ve özellikle pro-apoptotik faktörlerin salınımında rol oynar. Bu pro-apoptotik faktörlerden en önemli olanları sitokrom C ve apoptoz indükleyici faktör (AİF)'dir. Sitokrom C, APAF-1 adı verilen iskelet protein ile bir araya gelince Kaspaz 3'ü aktive eder ve hücre ölümünü başlatmış olur. AIF nükleusa taşınarak ve DNA parçalanmasını başlatarak kaspazlardan bağımsız şekilde hücre ölümünü tetikleyebilir. Mitokondri stres kaynaklı apoptozun tetiklenmesinde önemli olarak bilinse de kaspazlar reseptör tabanlı apoptozlarda kilit rol oynarlar ve bir ''hücresel infazcı'' görevi görürler. CD95 ya da TNF reseptörü kaspaz 8'i aktive ederek mitokondrideki değişimleri sağlayıp kaspaz 3'ü aktive ederken, DNA parçalanmaları ve infazcı kaspazların aktivasyonu mitokondiriyel apoptozun birincil başlatıcısıdır [111].

Pro-apoptotik moleküller anti-apoptotik moleküller ile sürekli bir denge halindedirler ve hücreyi apoptoza götürme aşamasında kilit rol oynarlar. Önemli anti-apoptotik faktörler "Apoptoz İnhibitörleri" olarak bilinen IAP'ler ve Bcl-2 benzer proteinleridir [108]. IAP'ler Kaspaz 9'la direk olarak temasa geçmekte ve inhibe etmektedir ancak IAP'lerin bakteriyel faktörlerle regülasyonu halen çözülememiştir [112]. Bcl2 benzer proteinler ise pro ve anti apoptotik faktörler olma konusunda umut veren protein ailesidir. Bu yüzden Bcl-2, Bcl-xL ve diğer üyeler birçok uyaran vasıtası ile apoptozu önlerken, Bim, Bax, Bad ve protein ailesinin diğer üyeleri apoptozu tetikler [113]. Ancak Bcl-2 benzer proteinlerin görevi hala açıklığa kavuşturulamamıştır.

2.6.2. Bakterilerin tetiklediği hedef hücre apoptozunun başlıca mekanizmaları

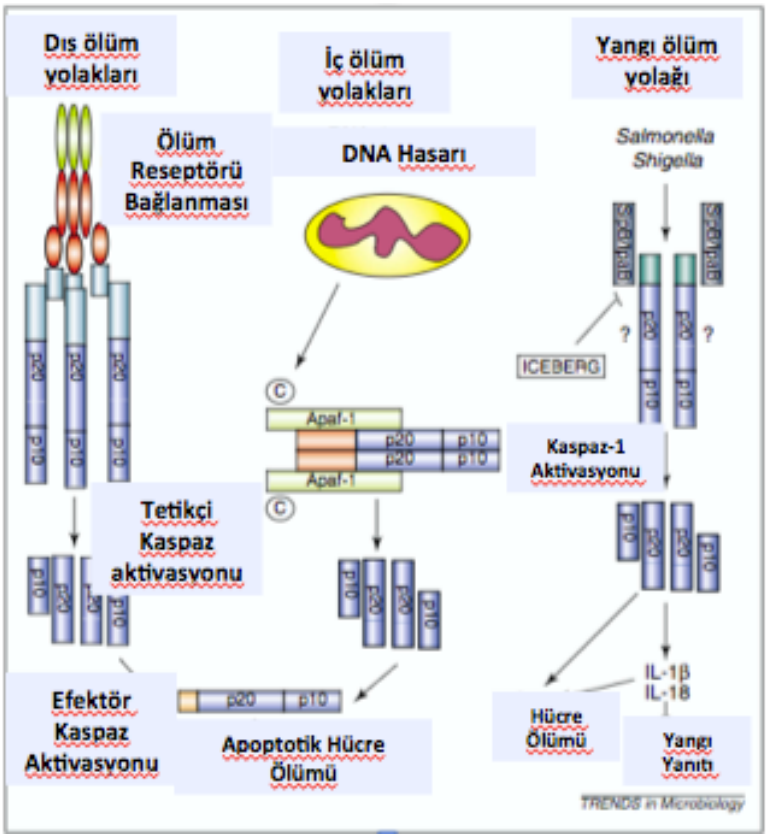
Apoptoz sırasında hedef alınan hücreler çevredeki dokulara minimum zarar ile ortadan kaldırılırlar ve bakteriyel enfeksiyonlar apoptozu tetiklemede önemli rol oynarlar. Apoptotik mekanizmalar kullanan bakteriler *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Neisseria gonorrhoeae, Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella* spp. ve *Neisseria meningitides* gibi fakültatif hücre içi bakterilerin yanı sıra *Helicobacter pylori* gibi tipik fakültatif hücre içi patojen kabul edilmeyen bakteriler ile *Rickettsia* sp. ve *Chlamydia* sp. gibi zorunlu hücre içi patojenlerdir ve her bir patojen kendisine özgü yollar ile apoptozu tetiklemektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Bakterilerin tetiklediği hücre apoptozunun ana mekanizmaları [108].

Salmonella typhi insanlardaki tifo ateşinin etiyolojik ajanı iken *S. typhimurium*'un farelerde tifo benzeri hastalık etkeni olduğu bilinmektedir. Bu organizmalar kontamine yiyecekler ile sindirim yoluna girerler ve alt gastrointestinal yola ulaştıklarında Payer plaklarında bulunan M hücreleri ile karşılaşırlar ve böylece

lenf nodülleri ve lamina propria'ya ulaşma şansı elde ederler. Böylece *Salmonella* bakterileri makrofajların içine girer ve vesiküllere yerleşir. Bu vesiküllerin içerisinde, bakteri makrofaj sitoplazmasına salınmak üzere tip III salgı sistemini kullanarak birçok farklı protein üretir [114]. Bu salgılanan proteinlerden SipB Kaspaz 1'e bağlanır ve onu aktive eder. Kaspaz 1 aktivasyonu IL-1β aktivasyonuna ve makrofajların ölümüne sebep olur [115]. SipB *Shigella* türlerindeki IpaB ile yakın akrabalık özelliğine sahip bir proteindir. SipB-Kaspaz 1 ilişkisi patojene dezavantaj olarak bağışıklık cevabına sebep olsa da *Salmonella* patogenezi için gereklidir. Son zamanlarda yayınlanan bir çalışma göstermiştir ki *S. typhimurium* için tek seferlik oral LD_{50} dozu, Kaspaz-1'e sahip olmayan farelere göre 1000 kat daha yüksektir [116]. Toksisitedeki bu fark Salmonella periton içerisine inoküle edildiğinde ise gözlemlenmemektedir. Araştırmaların devamı göstermiştir ki Salmonella Payer plaklarında kolonize olmaz ve bu bölgelerde apoptotik makrofajlar daha az bulunmaktadır. Şekil 2.11'de de gösterilen bu bilgiler *Shigella* ve *Salmonella* tarafından aktive edilmiş hücre ölümü için Kaspaz-1 aktivasyonu gerektiğini gösteren in vitro çalışmalar ile de uyumludur [115, 117].



Şekil 2.11. Kaspaz aktivasyon yolakları ile *Salmonella* ve *Shigella* tarafından indüklenen Kaspaz-1 aktivasyonu [118].

Bakteri tarafından tetiklenen makrofajların apoptozu hakkında yukarıda bahsedilen ve benzeri çalışmalar apoptozun paradoksal bir şekilde enflamasyonu da tetikleyen bir sistem olduğunu ortaya koymaktadır. Bakteriler tarafından indüklenen apoptoz, dokuların ve organların gelişiminde görev yapan programlı hücre ölümlerinden farklı bir amaca hizmet etmektedir. Ayrıca, *Salmonella* tarafından tetiklenen apoptoz, kaspazlara bağlı olması açısından nekrozdan farklıdır. Ayrıca *Salmonella*, apoptoza giren hücrelerde DNA kırıklarına sebep olmakta ve TUNEL uygulaması ile bu DNA kırıkları gösterilebilmektedir.

Temel olarak *Shigella* önceden dört patojenik türe ayrılıyordu. *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii* ve *S. sonnei*. Ancak yapılan DNA hibridizasyon çalışmaları göstermiştir ki *Shigella* cinsi *E. coli*'yi de kapsayan tek bir türden oluşmaktadır [119]. Önceleri *Shigella flexneri* olarak adlandırılan tür basilli dizanteri olarak da bilinen şigelloza sebep olmaktadır. Bu türün ise in vitro ve in vivo çalışmalarla makrofajlarda apoptozu tetiklediği gösterilmiştir [120, 121]. Patogeneze giden süreçte bakteri enteriditis sitozole doğru sızma izlemektedir. *S. flexneri* sitozolde tip-III sekresyon sistemi vasıtası ile IpaB adı verilen plasmid tarafından kodlanan bir invasyon antijeni sentezlemektedir. IpaB direkt olarak Kaspaz-1'e bağlanır ve onu aktive eder [122]. Shigella tarafından indüklenen apoptoz dokuya özgüdür ve epitel hücrelerinde apoptozu tetikleyememektedir [123].

Shigella enfeksiyonunun apoptozdaki rolü hakkında bir model öne sürülmüş olup bu modele göre Kaspaz-1, makrofajların programlı ölümünde ve akut enflamasyonda kilit rol oynamaktadır [124]. Kaspaz-1 aktivasyonu ve *Shigella* enfeksiyonu ile apoptoz sonucu makrofajların ölmesi, olgun interlökin IL-1'in salgılanmasına sebep olmaktadır [125]. Salgılanan IL-1 enfeksiyon bölgelerine polimorfonükleer lökositlerin (PMN) taşınmasına neden olmaktadır. PMN'ler intestinal epiteli geçerek epitel bariyerin bütünlüğünü bozmakta ve bu da bakterinin ikincil invazyonuna ve akut enflamasyona sebep olmaktadır [123]. Apoptozun rolü ve olgun IL-1'in salgılanmasının şigelloz patogenezinde oynadığı rol ex vivo olarak tavşanlarda gösterilmiştir [126]. Ek olarak, in vivo çalışmalar şigellozlu hastaların hücrelerinin sitokin üretimini göstermiş ve TNF-α üreten hücre sayısının arttığı açığa çıkarılmış ve TNF- α'nın Kaspaz-1'i aktive etmede ve apoptotik yolağın diğer basamaklarında da rol oynayabileceği öngörülmüştür [127]. Bakteriyel enfeksiyon patogenezinin apoptozda

oynadığı rolleri gösteren modeller *Salmonella* ve *Listeria* gibi hücre içi patojenlerin akut enfeksiyonların aydınlatılmasında kullanılabilir.

Listeria monocytogenes, apoptozu fagozomal membranı delip sitozola ulaşarak başlattığı hücre içi enfeksiyon ile tetiklemektedir. Bu mekanizma por oluşturan toksinlerin salgılanması ile başlar ve bu toksinler listeriolizin O (LlyO) olarak adlandırılırken *L. monocytogenes* tarafından tetiklenen apoptoz ise Lly-indüklü apoptoz olarak adlandırılır [128] ve hepatosit [129], lenfosit [130], dendritik hücreler [128] gibi bir çok hücrede apoptozu tetikler. LlyO'nun mitokondriyal membrana ulaşması ile birlikte sitokrom c salınımı başlar ve salınan sitokrom c kaspaz kaskadını aktive eder. Alternatif olarak, LlyO'nun mitokondriyal ve endoplazmik retikulum membranına ulaşması kalsiyum salınımına neden olur ki bu salınım kalsiyum-etkenli proteaz kalpain ve kaspaz aktivasyonunu sağlar [131]. Apoptozu tetikleyen bir çok hücre içi patojenin aksine *L. monocytogenes* makrofaj apoptozuna sebep olmaz ve makrofajlarda LlyO-indüklenmiş nekroza yol açar [132]. Makrofajlarda apoptoz ve olgun IL-1 salınımı olmamasına rağmen *Listeria* tarafından enfekte edilmiş hepatositler enfeksiyonun başlarında PMN kemo-atraktanları salgılarlar [128]. Bu kemo-atraktanlar, hepatositler arasında ölü hücrelerin fagositozunda görev alırlar ve hepatositlerdeki apoptoz *Listeria*'ya karşı ilk fizyolojik bariyer olan hepatik apselerin oluşmasına sebep olur [108].

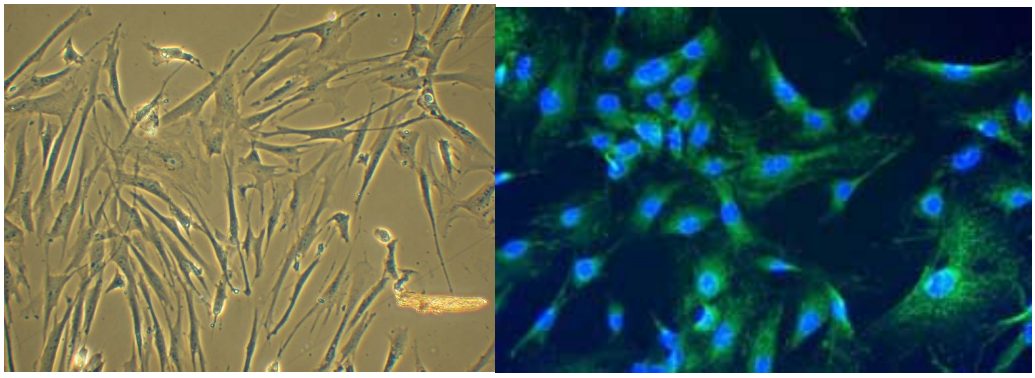
Eschericia coli'nin apoptozu indükleme becerisi, bazı *E. coli*'lerin (STEC) Shiga-benzer toksinler üretmesinden kaynaklanmaktadır. Apoptozu tetikleyen en bilindik suş O157:H7'dir. STEc tanım olarak intestinal epitele bağlanma kapasitesi bulunan ve Shiga-benzer toksinler üretebilen bakteriyel enteriditis. Bu patojenler insanlarda hemorajik kolit ve hemolitik-üremik sendrom sebepleridir [133]. İntestinal epitel hücrelerin apoptozu bariyer fonksiyonunu azaltır [134] ve Shiga-benzer toksinlerin kan dolaşımına katılmasına olanak sağlar [135]. Kaspazların diğer bakterilerin apoptozda oynadığı rol gibi Shiga-benzer toksinler de Kaspaz-8 vasıtası ile epitel hücrelerinin toksinler tarafından indüklenmiş apoptozuna sebep olmaktadırlar. Ancak, Kaspaz-8'in Shiga-benzeri toksin ile indüklenmiş apoptozunun direkt olarak gb3 bağlanması mı yoksa inaktif olarak ölüm reseptörlerinn ve ligandlarının aktive edilmesi sonucu mu olduğu bilinmemektedir [108]. Kaspaz-8'in aktivasyonu büyük ihtimalle mitokondrilerden sitokrom-c salınımına sebep olmakta ve prokaspaz-3 ile

aktivasyon Kaspaz-9'un aktivitesini ve mitokondrilerde ölüm yolaklarının aktifleşmesini sağlamaktadır [136]. Enteriditis *E. coli* enfeksiyonunun moleküler patogenezinin açığa çıkarılması hastalıkların ilerlemesini durduracak yeni tedavi stratejilerinin de geliştirilmesini sağlayacaktır. Kaspazlar apoptozun düzenlenmesine imkan sağlayan potansiyeli yüksek ve umut verici tedavi ajanları olacaklardır ve bu konuda yapılan çalışmalar artan hızla devam etmektedirler [137].

2.7 TEZDE KULLANILAN HÜCRE HATLARI

2.7.1 Fare embriyonik Fibroblastları (MEF)

Fibroblastlar bağ dokusunun ana hücreleridirler, hücreler arası matriks ve kolejen sentezinde görev alarak bağ dokunun bütünlüğünü sağlarlar. Fibroblastlar ve fibrositler olmak üzere iki farklı fazda bulunabilen hücrelerin ilki aktif ikincisi ise daha az aktif olan hücreler için kullanılmaktadır. Fibroblastlar bulundukları yer ve aktivitelerine göre morfolojik olarak farklı görünümlerde bulunabilirler (Şekil 2.12).



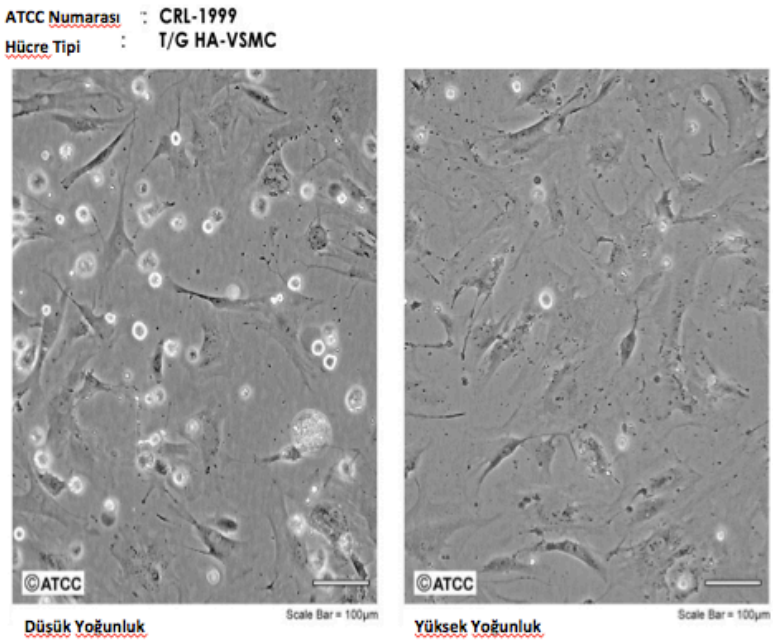
Şekil 2.12. a. İnsan fibroblast hücreleri [138] ve **b.**Fare embriyonik fibroblastları [139]

Mus musculus (fare) CF-1 (inbred olmayan non-agouti albino) türünün embriyonik dokusundan elde edilmiş olan fibroblastlar embriyo 14 günlükken toplanır ve uygun koşullarda çoğaltılır. Sağlıklı fibroblast hücre modellerinin çalışılması ve embriyonik kök hücrelerin (ES) çoğaltılmasında besleyici hat olarak kullanılırlar [140]. Fare mutantlarının homolog rekombinasyon ve blastosist seviyesinde gen transferi ile oluşturulmasında, embriyonik kök hücrelerin farklılaşmamış aşamada tutulabilmeleri

önemlidir. Birçok araştırmacı embriyonik kök hücrelerinin farklılaşmadan korumak amacı ile besleyici hat olarak bazı hücreleri kullanırlar. Mitotik olarak inaktif olan birincil fare embriyonik fibroblastları (MEF) bu amaçla en çok kullanılan hücre tipidir ve bu hücreler γ-ışınlanması vasıtası ile ya da mitomycin C uygulaması ile mitotik olarak inaktif hale getirilirler [141].

2.7.2 T/G HA-VSMEC

TG-HA VSMEC hücreleri insandan (*Homo sapiens*) elde edilmiş normal aort beyaz kas hücreleridirler (Şekil 2.13). Fibroblast görünümünde olan bu hücreler yapışkandırlar. 46, XX karyotipine sahip normal insan genotipine sahip bu hücrelerin % 0,8'inde poliploidi gözlemlenmektedir. Herhangi bir kromozom değişimleri yoktur ve iki X kromozomu da normaldir [142].

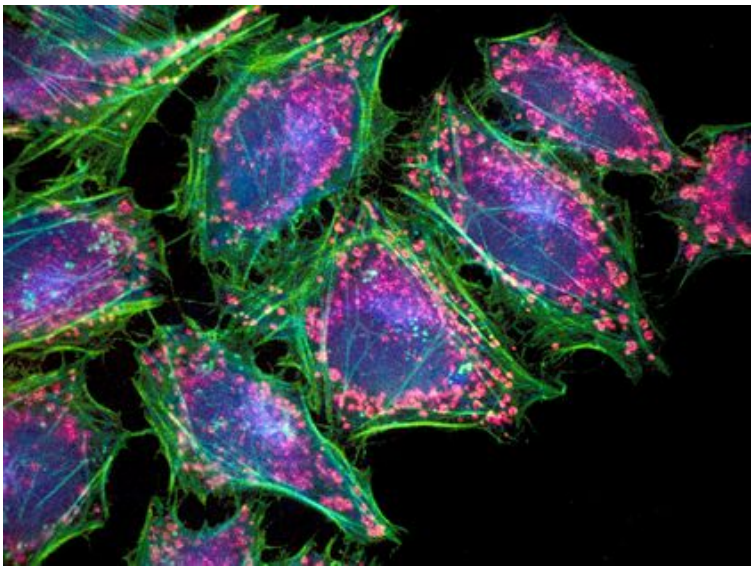


Şekil 2.13 TG-HA VSMEC hücreleri [143]

2.7.3 HeLa

Hela hücreleri bilimsel araştırmalarda kullanılan ölümsüz bir hücre soyu olup en eski ve en çok kullanılan hücre hattıdır. 1951 yılında Henrietta Lacks adlı bir serviks

kanseri hastasından elde edilmiş ve 1955 yılında ilk defa klonlanan insan hücreleri olmuşlardır [144]. İlk defa ölümsüz hale getirilen insan hücreleri oldukları için biyolojik ve tıbbi araştırmalarda en çok kullanılan hücre soylarıdır (Şekil 2.14). HeLa hücreleri için talep çok fazla olduğu için büyük ölçekli üretilmekte olup başlıca kanser, AIDS, radyasyon, genetik haritalama, toksisite çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Ayrıca kozmetiklere, yapıştırıcılara ve kimyasallara duyarlılık testlerinde kullanılmaktadırlar. Günümüze kadar bu hücrelerden yaklaşık 20 ton kadar üretilmiş olup HeLa hücreleri ile çalışılmış 11000 patent bulunmaktadır [145].

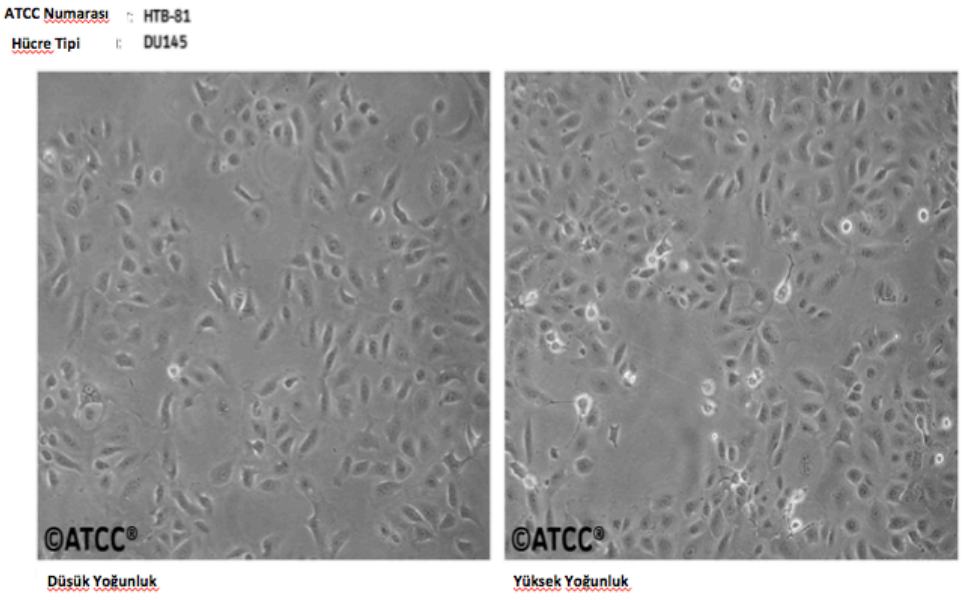


Şekil 2.14. HeLa hücreleri [146]

Servikse ait epitel hücreler olan HeLa yapışkandır ve insan papiloma virüsü içermektedir. Transfeksiyon amacı ile kullanımlarının yanı sıra *E. coli* türünün invazif potansiyelinin araştırılmasında da kullanılmaktadırlar [142]. HeLa hücreleri Jonas Salk tarafından çocuk felci aşısını test etmek amacı ile 1950'li yıllarda kullanılmıştır ve hücrelerin hızlı cevapları sayesinde bir yıldan az bir sürede Salk'ın aşısı klinik deneme aşamasına geçmiştir [147]. Bu hücreler kanser, AIDS, radyasyon, toksik maddelerin etkileri, gen haritalama gibi birçok alanda yapılan çalışmalarda kullanılmaktadırlar ve 2009 yılında basılan bir kitaba göre bu hücreler kullanılarak 60000'den fazla makale basılmış ve her ay 300 tane daha basılmaya devam edilmektedir [148].

2.7.4 DU145

DU145 hücre hattı insan prostatik kanser hücre hatlarından en çok kullanılanlardan birisidir ve prostat kanseri tedavilerinin araştırılmasında kullanılmaktadırlar. (Şekil 2.15). Ortalama bir metastaz potansiyeline sahip olan hücreler hormonlara duyarlı değildirler ve prostat-spesifik antijen salgılamazlar. İlk kez 1975 yılında 69 yaşında beyin metastazı yapmış prostat karsinomasına sahip olan bir bireyden elde edilmişlerdir [149]. Hipotriploid hücrelerden oluşmakta ve genellikle 61 ya da 62 kromozom içermektedirler. Y kromozomlarında ise segmentel olarak anormallikler bulunmaktadır [142].

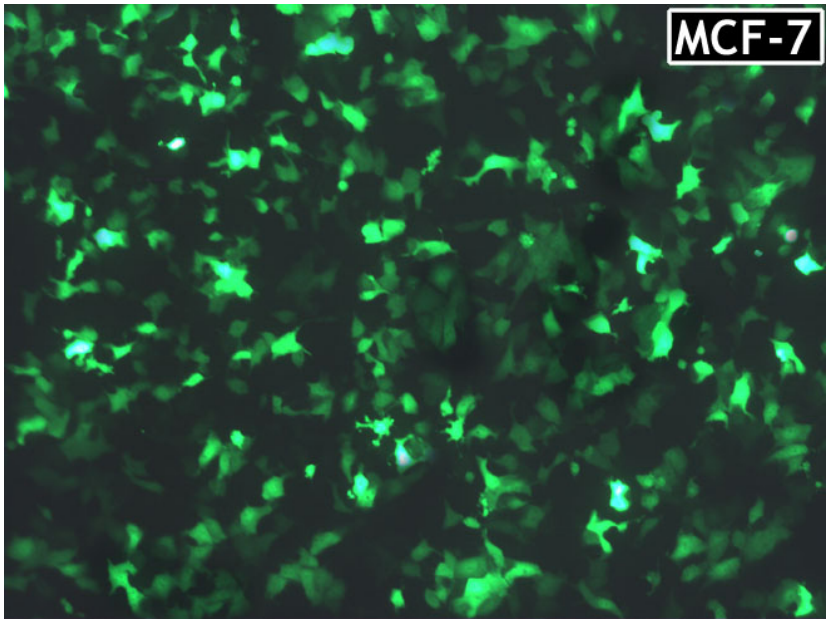


Şekil 2.15. DU145 hücreleri [150]

2.7.5. MCF-7

MCF-7 hücreleri 1970 yılında 69 yaşında bir kadından izole edilmiştir (Şekil 2.16). Michigan Kanser Fonu-7'nin baş harfleri ile adlandırılan hücre hattı ise bu hücreler vasıtası ile 1973 yılında oluşturulmuştur [151]. Farklılaşmış meme epiteli özelliklerini gösteren bu hücreler sitoplazmik östrojen reseptörleri sayesinde estradiollere duyarlıdırlar ve kubbe şeklinde morfolojik yapılar oluştururlar. Wnt7B onkogenini de sentezlemektedirler ve TNF-α ile çoğalmaları durdurulabilmektedir

[152]. MCF-7 hücre hattı oluşturulmadan önce araştırmacılar için bir kaç aydan daha uzun süre hayatta kalabilen insan meme hücreleri oluşturmak imkansızdı ve bu hücre hattı sayesinde bir çok meme kanseri araştırması hayata geçirilmiştir [153].



Şekil 2.16. MCF-7 hücreleri [154]

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan MEM Eagle Solüsyonu (EBSS içeren L-glutamin içermeyen), MEM Eagle Solüsyonu (EBSS içeren L-glutamin içermeyen), DPBS-1X (Ca ve Mg içeren), DPBS-1X (Ca, Mg ve Fenol Kırmızısı içermeyen), Pen/Strep Stok Solüsyonu 10K/10K,, Pen/Strep/Fungizone Stok Solüsyonu 10K/10K/25 µg, PBS-EDTA, Versene (EDTA) 0,02%, Tripsin-Versen Mix (1X), Glukoz 100 g/L (hücre kültürü için), Non Essential amino asit 10 mM 100X Stok Solüsyonu, HBSS (Phenol red içeren, Ca ve Mg içermeyen), Earle's BSS Lonza firmasından temin edildi.

Kullanılan L-glutamin 200 mM, Ham's F12, Tripsin 10X, DMSO (hücre kültürü için), Hücre Dondurma Sıvısı (Freezing Medium), CMRL 1066 sıvısı (L-glutamin ve fenol kırmızısı içermeyen), BME solusyonu (L-glutamin içermeyen) 50X Pan Biotech firmasından tedarik edildi.

DMEM/Ham's F-12 50/50 Mix, 1X (L-glutamin, fenol kırmızısı, sodyum piruvat içeren), DMEM/HAM'S F-12 50/50 karışımı 1X (L-glutamin içeren, fenol kırmızısı içermeyen), DMEM/HAM'S F-12 50/50 karışımı 1X (L-glutamin, sodium piruvat, 25mM hepes içeren fenol kırmızısı içermeyen), DMEM, 1X 1.0g/L glukoz (L-glutamin ve sodyum piruvat içeren), DMEM 1X 1.0g/L (glukoz, L-glutamin, ve sodyum piruvat içeren fenol kırmızısı içermeyen), RPMI 1640 1X (L-glutamin içeren), RPMI 1640 1X (L-glutamin içeren fenol kırmızısı içermeyen), PBS 1X pH 7.4 (kalsiyum ve magnezyum içermeyen), PBS 1X pH 7.4 (kalsiyum ve magnezyum içeren), D-PBS 1X

(kalsiyum ve magnezyum içeren), D-PBS 1X (kalsiyum ve magnezyum içermeyen), Sodyum bikarbonat, kloramfenikol, gentamisin 10 mg/ml (hücre kültürü için steril), tripsin 0.05%, L-lizin toz, FBS (yüksek kaliteli endotoksin<10, hemoglobin <40) Biowest firmasından elde edilmiştir.

Deneyler sırasında kullanılan FBS (Fetal Bovin Serum) Biowest; Kaspaz-3 Kalorimetrik Kit Novex; Trifan Mavisi Solüsyonu 0,4 % Gibco; MTT (3-4-5 Dimethylthiaz, TALI Apoptoz Kit Anneksin V Aleksa Flour 488 kiti ile TALI Canlılık Kiti-Ölü Hücre R kiti Molecular Probes; Fenol Kırmızısı İndikatörü Argos Organics; DMSO, kristal viyole, MTT ve gluteraldehit ise Biomatik firmalarından temin edildi.

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

25 cm^2 ve 75 cm^2 T-flask hücre kültürü için (plug kapaklı); TPP
Hücre kazıyıcı S, (L = 24 cm hücre kültürü için); TPP
Hücre kültürü test plağı 24 ve 96 kuyucuklu (Flat-düz dipli); TPP
Thoma lamı (Aynalı); Superior Marienfeld
Lamel (Thoma sayım lamı için); Superior Marienfeld
Kryo tüp (2 ml); Biosigma
Expell Plus pipet ucu 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl, (filtreli; steril); CAPP
Expel pipet ucu 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl, CAPP
6 kuyucuklu hücre kültürü test plağı (TC uygulanmış); NEST
Kimyasal Rezervuarı; NEST
Kryo Tüpler 1.8 ve 3.8 ml; NEST
CO_2'li inkübatör (NÜVE; EC160)
İnvert Mikroskop (Nikon)
Sınıf 2 Biyolojik Emniyet Kabini (Nüve ve ESCO)
Spektrofotometre (UV/VIS Cecil)
Multitarayıcılı Spektrofotometre (Thermo Scientific)
TALI Sitometre Hücre Analiz Cihazı (Invitrogen)

3.1.3. Kullanılan Bakteri Suşlarının Temini

Kullanılan bakteri suşlarından non-patojen *Salmonella enteriditis* (A17) ve patojenik *Salmonella telaviv* (A22) suşları Trakya Üniversitesi (T.Ü.) Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda saklanan suşlardır. Bu suşlar daha önceleri Prof. Dr. Ece Şen danışmanlığında yürütülen proje doğrultusunda Edirne ilinde satışa sunulan tavuk karkaslarından izole edilmiş ve yine Prof. Dr. Ece Şen'in danışmanlığını yaptığı doktora öğrencisi Dr. Deniz Aksoy tarafından geçekleştirilen doktora tez çalışmasında *C. elegans* nematod ve fare deney modellerinde patojenite statüleri, patojen olup olmadıkları belirlenmiştir [155]. Ayrıca standart *Salmonella* suşu olarak kullanılan *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşu ve *Escherichia coli* OP50 suşu ise T.Ü. Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda saklanmakta olan suşlardır.

Serratia entomophila ATCC 43705 ve *Bacillus thrungiensis* ATCC 10792 suşları ise bu çalışmada kullanılmak üzere ATCC'den temin edilmiş suşlardır.

Tüm suşlar Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri içerisinde 37°C'de 12 saat inkübasyondan sonra deneyler için kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Hücre Hatlarının Temini

Doktora tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarından HeLa ATCC CCL-2, TG-HA VSMEC ATCC CRL-1999 ve MCF-7 ATCC HTB-22 hücre hatları Trakya Üniversitesi (TÜ) Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından hücrü kültür koleksiyonu için ATCC'den temin edilmiştir. Bu suşlar Sayın Prof. Dr. Oğuzhan Doğanlar'ın doktora çalışmasında kullanılması amacı ile tarafımıza sağlamış olduğu değerli hediyeleridirler.

Ayrıca İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden Sayın Doç. Dr. Elif Damla Arısan'ın çok değerli izinleriyle temin edilen, ATCC'ye ait MEF ATCC SCRC-1040 (fare embriyonik fibroblast) ve DU145 ATCC HTB-81 hücre dizileri kullanılmıştır.

Tüm hücre kültürleri, T25 flasklarda, %10 fetal dana serumu (FCS), L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37°C'de %5 CO_2'li etüvde çoğaltıldı ve canlılıkları devam ettirildi.

3.2. Metod

3.2.1 Bakteri Sayılarının Optik Densite Karşılıklarının Bulunması

Bakteriyal gliserol stok içerisinde -20°C'de saklanmakta olan *Escherichia coli* OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis (*ATCC 14028*)* serovar *typhimurium ,Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila* bakterileri 2 ml'lik kryo tüplerden alınarak önceden Erlen şişelerine hazırlanıp steril edilmiş LB sıvı besiyerine aktarıldı ve bakterileri içeren sıvı besiyeri 37°C'lik çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi . Yeterli yoğunluğa ulaşan bakteri kültüründen alınan 1 ml bakteri süspansiyonu, test tüplerine hazırlanıp steril edilmiş 9 ml LB sıvı besiyerine eklenerek 37°C'de inkübatör içerisinde bir gece inkübe edildi. 12 saat inkübe edilen bakteriler yine sıvı besiyerinde 10^{-3}, 10^{-4},10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8} oranında seyreltilerek LB agar katı besiyerine yayma tekniği ile ekim yapıldı. Yine seyreltilen bakteri süspansiyonları sadece LB sıvı besiyeri içeren kontrole karşı OD_{600} değerleri spektrofotometre aracılığı ile ölçüldü. 24 saat sonra bakteri sayımı gerçekleştirildi. Standard grafik çizilerek sıvı besiyeri içerisindeki bakteri sayısı OD karşılığı olarak bulundu.

3.2.2 Optimal Kokültivasyon Süresinin Araştırılması

T25 flasklarda, %10 fetal dana serumu (FCS), L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37°C'de %5 CO_2'li etüvde çoğaltılan ve idame ettirilen sağlıklı hücre hatlarından MEF ve kanser hücre hatlarından HeLa hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştıkları zaman her bir kuyusunda 30000 hücre bulunacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültürü test plakalarına steril bir şekilde transfer edildi. 12 saat önce LB sıvı besiyerine inoküle edilmiş olan *Escherichia coli* OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis (*ATCC 14028*)* serovar *typhimurium ,*

Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila bakterilerinin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılarak daha önce her bir bakteri için oluşturulan standart grafiğe göre her bir süspansiyonda 30000 bakteri olacak kadar 1 ml FBS içermeyen DMEM-F12 besiyerine aktarıldı. Elde edilen 1:1 hücre:bakteri oranı ile 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 1, 2, 4, 8 ve 24 saat boyunca kokültivasyon gerçekleştirildi. Bakteriler ile birlikte 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 1, 2, 4, 8 ve 24 saat inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, 200 µl 1xPBS ile 3 kere yıkandı ve üzerlerine %1 penisilin-streptomisin (PS) içeren DMEM-F12 besiyeri eklendi ve 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 12 saat inkübasyona bırakıldı.

Her belirlenen zaman aralığının sonunda hücrelerin üzerindeki DMEM-F12 besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreleri içeren kuyucuklar 3 kere 1X PBS ile yıkandı ve PBS pipetleme ile uzaklaştırıldı. 1 ml'sinde 1 mg MTT ajanı içeren 0,22µ filtreden geçirilerek stok haline getirilmiş steril MTT solüsyonundan kuyucukların üzerine 50 µl eklendi. Her bir kuyucuğa 200 µl DMEM besiyeri de eklendikten sonra test plakaları 37°C'de %5 CO_2'li etüvde çalkalama tepsisi üzerine yerleştirildi. 4 saat boyunca MTT reaksiyonunun oluşması beklenip invert mikroskop altında MTT tuz kristallerinin oluştuğu da gözlemlendikten sonra hücrelerin üzerindeki MTT-DMEM solüsyonu pipetleme ile dikkatlice uzaklaştırıldı. 200 µl DMSO ve 25µl Sorenson glisin tamponu (glisin 0.1M, NaCl 0.1M, 0.1 NaOH ile ayarlanmış pH:10.5) eklenerek 5 dakika oda ısısında çalkalayıcı plaka üzerinde çözünme sağlandı. Test plakalar daha sonra hiç hücre ve bakteri içermeyip MTT testine dahil edilen kör örneğine karşı 570 nm boyuna 630 nm referans dalga boyu ile okundu. Elde edilen veriler ile değişen zamana göre bakterilerin hücreler üzerindeki etkisi grafiksel olarak çıkartıldı.

3.2.3 Optimal Bakteri – Hücre Enfeksiyon Çarpan Oranının Araştırılması

T25 flasklarda, %10 fetal dana serumu (FCS), L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37°C'de %5 CO_2'li etüvde çoğaltılan ve idame ettirilen sağlıklı hücre hatlarından MEF ve TG HA-VSMEC ile kanser hücre hatlarından HeLa, MCF-7 ve DU145 hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştıkları zaman her bir kuyusunda 5000 hücre bulunacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü test plakalarına steril bir şekilde transfer edildi. 12 saat önce LB sıvı besiyerine inoküle edilmiş olan *Escherichia coli*

OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis (*ATCC 14028*)* serovar *typhimurium, Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila* bakterilerinin spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılarak daha önce her bir bakteri için oluşturulan standart grafiğe göre her bir süspansiyonda $5x10^6$, $5x10^5$, $5x10^4$, $5x10^3$, $5x10^2$ bakteri olacak şekilde 0,2 ml FBS içermeyen DMEM-F12 besiyerine aktarıldı. Elde edilen 1000:1, 100:1, 10:1, 1:1, 0,1:1 bakteri:hücre oranı ile 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 4 saat boyunca kokültivasyon gerçekleştirildi. Bakteriler ile birlikte 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 4 saat inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, 200 µl 1xPBS ile 3 kere yıkandı ve üzerlerine %1 penisilin-streptomisin (PS) içeren DMEM-F12 besiyeri eklendi.

12 saat boyunca inkübe edilen hücreler, kokültivasyon süresinin tamamlanmasının ardından sonuçlar bölümünün 3.2.1 maddesinde anlatıldığı şekilde, MTT sitotoksisite testi gerçekleştirildi ve elde edilen veriler ile hiç bakteri ile temas etmeyen hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, her bir EÇ oranının hücre canlılığı üzerine etkisi yüzde şeklinde hesaplandı ve %50 öldürücü doz (LD_{50}) değerleri grafik haline getirildi.

3.2.4 Bakteri Tarafından Tüketilmiş Süpernatanın (SCS) Hücre Hatları Üzerindeki Etkili Yüzdesinin Bulunması

12 saat boyunca LB sıvı besiyerine inoküle edilmiş olan *Escherichia coli* OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis(*ATCC 14028*)* serovar *typhimurium, Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila* bakterilerini içeren 1'er ml'lik süspansiyon DMEM-F12 hücre besiyeri içeren test tüplerine aktarılarak 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Vortex ile homojen hale getirilen bakteri süspansiyonları 0.22µ şırınga ucu filtreden geçirilerek bakteriler ortamdan uzaklaştırıldı ve elde edilen süpernatan farklı konsantrasyonlar oluşturacak şekilde hücrelere uygulama yapmak için kullanıldı.

T25 flasklarda, %10 FBS, L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37°C'de %5 CO_2'li etüvde çoğaltılan ve idame ettirilen sağlıklı hücre hatlarından MEF ve TG HA-VSMEC ile kanser hücre hatlarından HeLa, MCF-7 ve DU145 hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştıkları zaman her bir kuyusunda 5000 hücre

bulunacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü test plakalarına steril bir şekilde transfer edildi. Hücrelerin üzerindeki FBS içeren besin ortamı uzaklaştırılıp hücreler 3 kez 1X PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Sadece DMEM içeren besiyerine aktarılmış olan bakterilerin SCS'si hücrelerin üzerine hücre besiyeri : SCS yüzdeleri %100, %50, %25, %12.5, %6.25 kombinasyonları olacak şekilde eklendi ve 4 saat süresince 37°C'de %5 CO2'li etüvde inkübasyon gerçekleştirildi ve sonuçlar bölümünün 3.2.1 maddesinde anlatıldığı şekilde MTT sitotoksisite testi gerçekleştirildi. Bakteri süpernatanı uygulanmamış hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, her bir yüzdenin hücre canlılığı üzerine etkisi yüzde şeklinde hesaplandı ve LD_{50} değerleri grafik haline çevrildi.

3.2.5 Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Hücre Canlılık Yüzdelerinin TALI Canlılık Kiti ile Araştırılması

12 saat süresince LB sıvı besiyerinde inoküle edilmiş olan *Escherichia coli* OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis (*ATCC 14028*)* serovar *typhimurium, Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila* bakterilerini içeren 1'er ml'lik süspansiyon DMEM-F12 hücre besiyeri içeren test tüplerine aktarılarak 12 saat süre ile 37°C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Vortex ile homojen hale getirilen bakteri süspansiyonları spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılarak daha önce her bir bakteri için oluşturulan standart grafiğe göre her bir süspansiyonda $5x10^5$ bakteri olacak şekilde 0.2 ml FBS içermeyen DMEM-F12 besiyerine aktarıldı.

T25 flasklarda, %10 FBS, L-glutamin ve fenol kırmızısı içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37°C'de %5 CO_2'li etüvde çoğaltılan ve idame ettirilen sağlıklı hücre hatlarından MEF ve TG HA-VSMEC ile kanser hücre hatlarından HeLa, MCF-7 ve DU145 hücreleri yeterli yoğunluğa ulaştıkları zaman her bir kuyusunda 5000 hücre bulunacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü test plakalarına steril bir şekilde transfer edildi. Hücrelerin üzerindeki FBS içeren besin ortamı uzaklaştırılıp hücreler 3 kez 1X PBS ile yıkandı ve PBS uzaklaştırıldı. Sadece DMEM içeren besiyerine aktarılmış olan bakteri 100:1 bakteri:hücre oranı ile 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 4 saat boyunca kokültivasyon gerçekleştirildi. Bakteriler ile birlikte 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 4 saat inkübasyondan sonra, hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, 200 µl 1xPBS ile 3

kere yıkandı ve üzerlerine %1 penisilin-streptomisin (PS) içeren DMEM-F12 besiyeri eklendi. 12 saat boyunca inkübe edilen hücreler TALI canlılık kiti ile değerlendirilmek amacı ile hazırlandı.

Hazırlık aşamasında üreticinin kit prosedürüne uygun olarak 96 kuyucuklu mikroplaklarda bulunan hücrelerin üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılıp 3 kez 1X PBS ile yıkandılar ve 20 µl tripsin-EDTA ile 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 3 dakika muamele edilen ve PBS ile yıkanan hücreler steril Eppendorf tüplerine aktarıldı. Vortekslenip, invert mikroskop altında Thoma lamı ile sayımı yapılan hücreler ml'de 10^5-10^7 hücre olacak şekilde seyreltildi. 100 µl hücre örneğine 1 µl TALI ölü hücre kırmızı ajanı eklenip vortekslendi. Mikroplakalar alüminyum folyo ile kaplanarak 37°C'de %5 CO_2'li etüvde çalkalama plakası üzerinde 5 dakika inkübe edildikten sonra hücre-boya karışımının 25 µl'si alınarak TALI analiz lamlarına pipet ucu 80° açı ile tutularak yüklendi. Bu esnada analiz lamlarında boşluk ve ya baloncuk olmaması sağlandı. TALI görüntü tabanlı sitometre analiz cihazına yüklenen analiz lamları hücre canlılık ekranı ile görüntülenip analiz edildi ve raporlandı.

3.2.6 Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Hücre Apoptoz Yüzdelerinin TALI Apoptoz Kiti ile Araştırılması

Bir önceki maddede bakteri:hücre kokültivasyonu sonrası hücre canlılık yüzdelerinin TALI canlılık kiti ile araştırılmasında gerçekleştirilen kokültivasyon bu aşamada da aynen gerçekleştirildikten sonra TALI Apoptoz kit prosedürüne uygun olarak 96 kuyucuklu mikroplaklarda bulunan hücrelerin üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılıp 3 kez 1X PBS ile yıkandılar ve 20 µl tripsin-EDTA ile 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 3 dakika muamele edilen ve PBS ile yıkanan hücreler steril Eppendorf tüplerine aktarıldı. Vortekslenip, invert mikroskop altında Thoma lamı ile sayımı yapılan hücreler ml'de 10^5-10^7 hücre olacak şekilde seyreltildi.

Konsantre (5x) Annexin bağlama tamponu (ABB) deiyonize su ile seyreltilerek 1x ABB hazırlandı ve 100 µl ABB içerisine yaklaşık $5x10^5$ ile $5x10^6$ hücre eklendi. Hücreler 25°C'de %5 CO_2'li etüvde ve karanlıkta 20 dakika boyunca 5 µl Annexin V Alexa Fluor 488 ajanı ile inkübe edildi ve daha sonra 800g'de 2 dakika santrifüj edilerek 100 µl ABB içerisinde süspanse edildi. Hücrelerin üzerine 1 µl PI (propidium

iodide) eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta çalkalama plakası üzerinde 5 dakika daha inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon örneğinden 25 µl alınarak TALI analiz lamlarına pipet ucu 80° açı ile tutularak analiz lamları oluşturuldu. TALI görüntü tabanlı sitometre analiz cihazına yüklenen analiz lamları apoptoz ekranı ile görüntülenip hücre durumları ölçülüp raporlandı.

3.2.7 Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

3.2.5 numaralı metodda bakteri:hücre kokültivasyonu sonrası hücre canlılık yüzdelerinin TALI canlılık kiti ile araştırılmasında gerçekleştirilen kokültivasyon bu aşamada da birebir gerçekleştirildikten sonra Kaspaz-3 aktivitesi kolorimetrik proteaz ApoTarget kit prosedürüne uygun olarak, 96 kuyucuklu mikroplaklarda bulunan hücrelerin üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılıp 3 kez 1X PBS ile yıkandılar ve 20 µl tripsin-EDTA ile 37°C'de %5 CO_2'li etüvde 3 dakika muamele edilen ve PBS ile yıkanan hücreler steril Eppendorf tüplerine aktarıldı. Vortekslenip, invert mikroskop altında Thoma lamı ile sayımı yapılan hücreler 50 µl hücre lizis tamponunda 3-5x10^6 hücre olacak şekilde süspanse edildi. Buz üzerinde 10 dakika bekletilen hücreler 10.000g'de 1 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi ve süpernatan toplanarak yeni bir tüpe alındı. Buz içerisinde muhafaza edilen süpernatan her 100 µl hücre lizis tamponunda, 100 µg protein lizatı bulunacak şekilde seyreltildi ve her bir hücre lizatının üzerine 50 µl reaksiyon tamponu [10 µM DTT (dithiothreitol) içeren] ve 5 µl DEVD-pNA (kaspaz-3 substratı) eklendi. Bu karışımın 37°C'de 3 saat boyunca inkübasyonu sağlandı. Her bir örnek spektrofotometrede (Multiskan FC, Thermo Scientific, ABD) 405 nm dalga boyunda kör hesabı yapılarak ölçüldü ve veriler raporlandı.

3.2.8 Çalışmalarda Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizleri

Çalışmalar sonucu elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi "Prism 6 for Mac OS X version 6.0h (Trial)" ve "Prism 7 for Mac OS X version 7.0h (Trial)" programı kullanılarak yapıldı ve deneylerden elde edilen tekerrürlü sonuçlara t-test $p=0.05$ ve iki yönlü ANOVA testi $\alpha= 0.05$ olarak uygulandı.

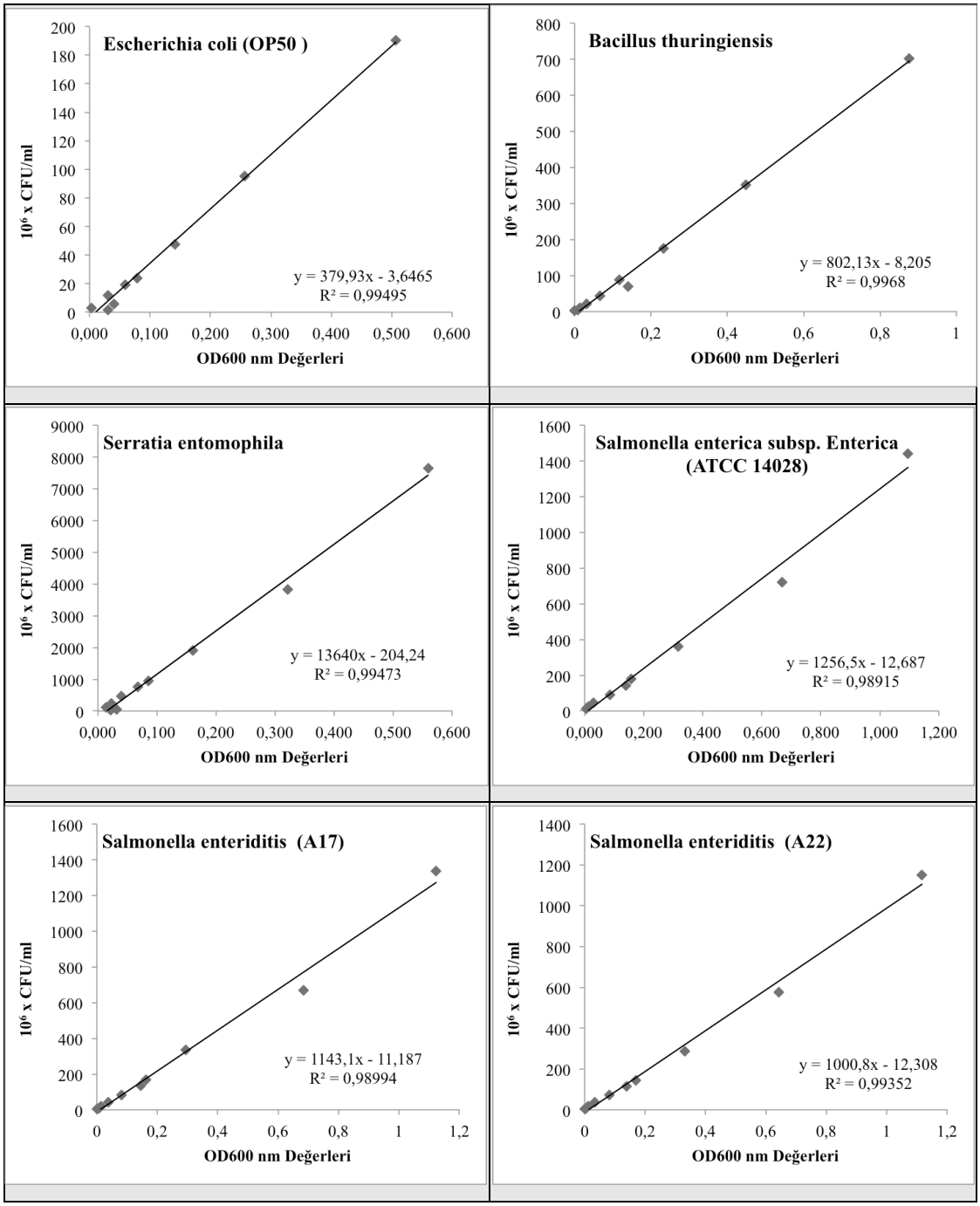
BÖLÜM 4

SONUÇLAR

4.1 Bakteri Sayılarının Optik Yoğunluk Karşılıkları

HeLa, MCF-7, DU145, MEF, TG HA-VSMEC hücrelerini kokültive etmek için kullanılacak olan *Escherichia coli* (OP50), *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *Salmonella enteriditis* (A17), *Salmonella telaviv* (A22), *Serratia entomophila* bakterilerinin CFU/ml değerlerinin OD karşılığının bulunması amacı ile seri olarak seyreltilen bakteri kültürleri LB agar plakalarına ekim yapılarak 24 saat sonra gözlenen koloni sayısı sayılmış ve bu koloni sayılarının spektrofotometre ile 600 nm dalga boyunda ölçülen OD_{600} karşılıkları bulunmuş, her bir bakteri için standart grafik haline getirilmiş, eğilim çizgisi çizilip, formül ve R^2 değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.1).

Hesaplanan formüllere göre her bir bakteri için OD=1 alınıp 10^6 x CFU/ml hesaplandığında *E. coli* (OP50) için 3.75 x 10^8, *B. thuringiensis* için 0.8x10^9, *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* için 1.32 x 10^9, *S. enteriditis* (A17) için 1.19 x 10^9, *S. telaviv* (A22) için 1.03 x 10^9, *S. entomophila* için 1.39 x 10^{10} CFU/ml bulunmuştur (Tablo 4.1).



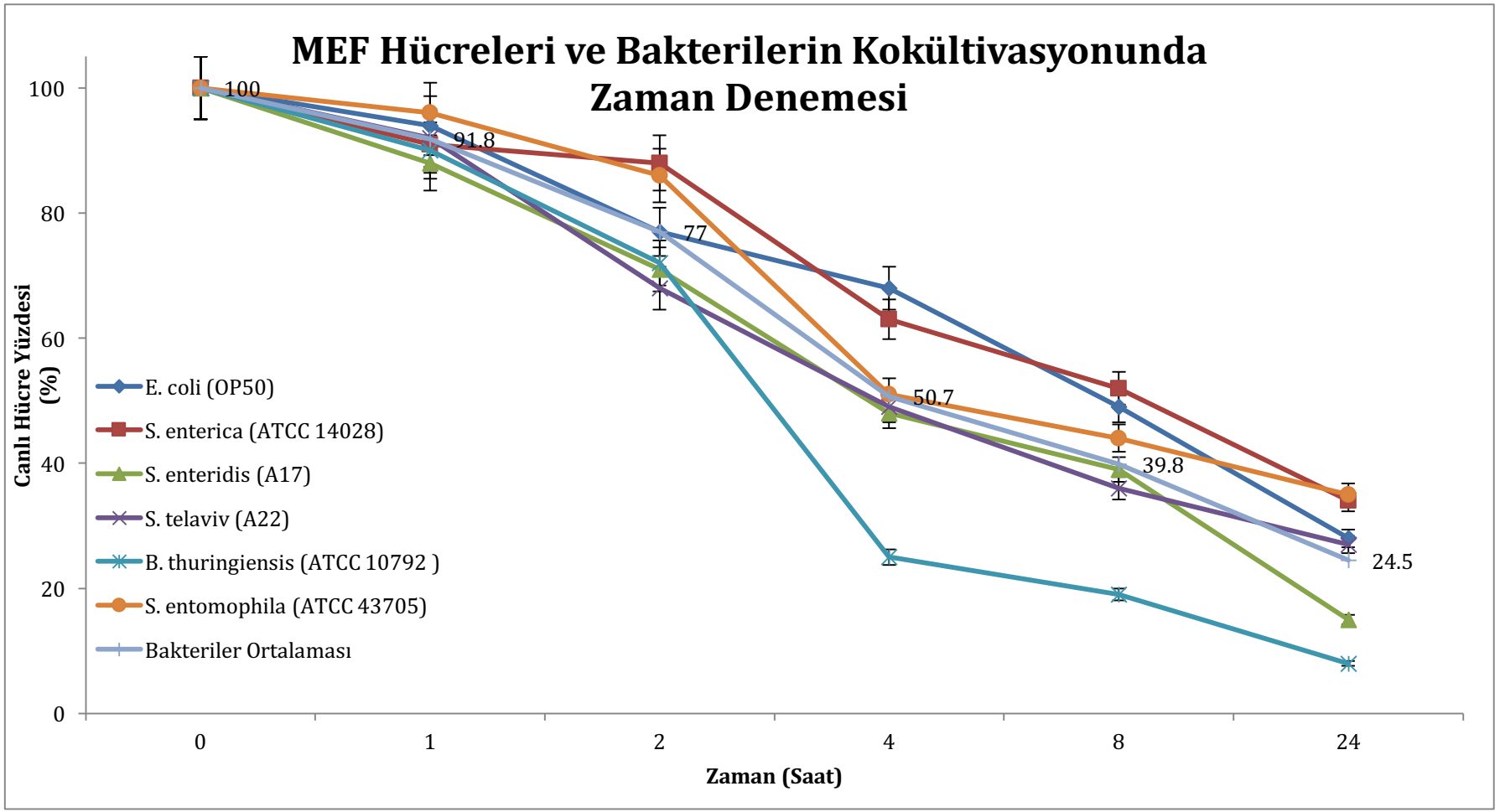
Şekil 4.1. *Escherichia coli* (OP50), *Bacillus thuringiensis*, *Serratia entomophila, Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *Salmonella enteriditis* (A17), *Salmonella telaviv* (A22) suşları için OD'nin 10^6 x CFU/ml karşılıklarını gösteren standard grafik

Tablo 4. 1 *Escherichia coli* (OP50), *Bacillus thuringiensis*, *Serratia entomophila, Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *Salmonella enteriditis* (A17), *Salmonella telaviv* (A22) suşları için standard grafikten elde edilen formül ile OD=1 için hesaplanan CFU/ml ve R^2 değerleri

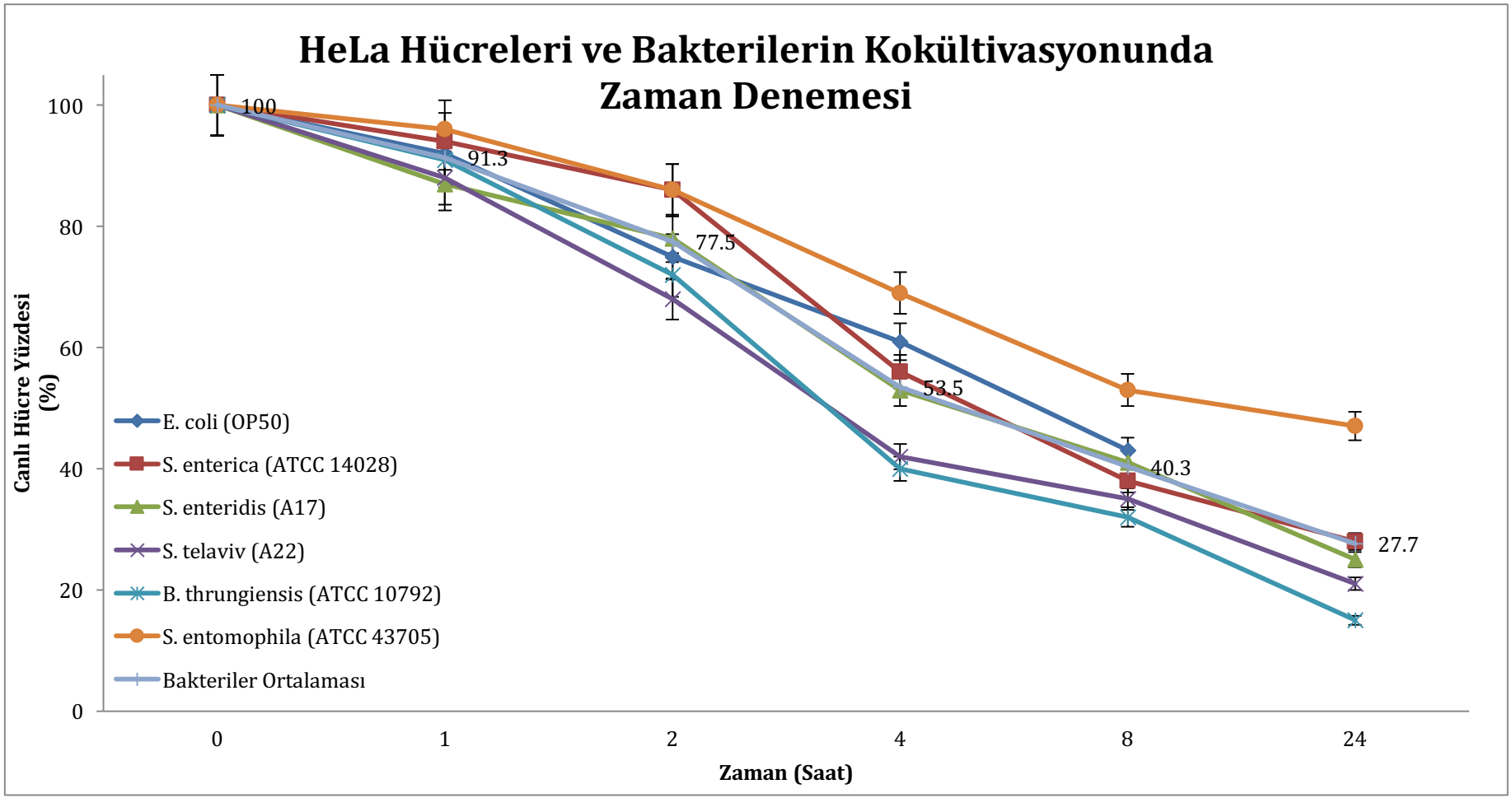
Bakteri Türü	Hesaplanan CFU/ml (OD=1)	R^2 Değeri
Escherichia coli (OP50)	3.75×10^8	0.99495
Bacillus thuringiensis (ATCC 10792)	0.8×10^9	0.9968
Serratia entomophila (ATCC 43705)	1.39×10^{10}	0.99473
Salmonella enteriditis subsp. *enteriditis* (ATCC 14028)	1.32×10^9	0.98915
Salmonella enteriditis (A17)	1.19×10^9	0.98994
Salmonella telaviv (A22)	1.03×10^9	0,99352

4.2 Optimal Kokültür Süresi

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin MEF ve HeLa hücreleri üzerindeki optimum etkisinin gözlemlenebildiği en uygun kokültivasyon süresinin bulunması amaçlanarak bir dizi MTT sitotoksisite deneyleri yapılmıştır. Bakteriler 1, 2, 4, 8 ve 24 saat boyunca hücreler ile 1:1 EÇ oranı ile bir arada tutulmuş ve daha sonra değişen zamana göre bakterilerin hücreler üzerindeki etkisi MEF ve HeLa hücreleri için sırasıyla grafiksel olarak verilmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.2 *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705) **,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakteri ile EÇ 1:1 iken değişen kokültivasyon süreleri ile inkübe edilen MEF hücrelerinin canlılık yüzdesi grafiği



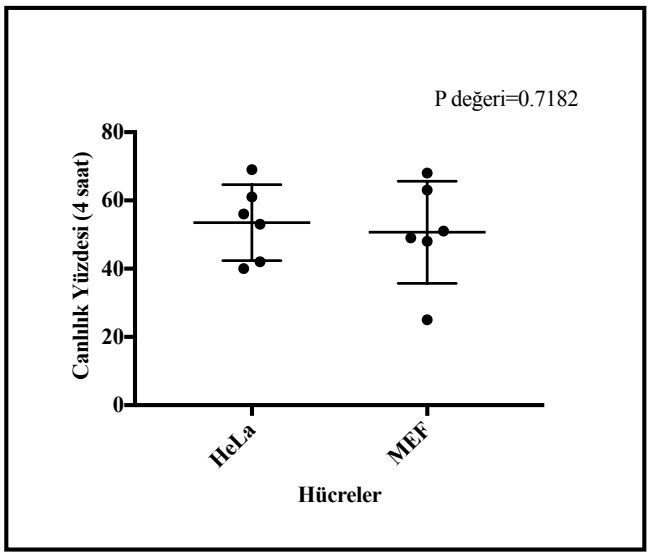
Şekil 4.3. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705) **,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakteri ile EÇ 1:1 iken değişen kokültivasyon süreleri ile inkübe edilen HeLa hücrelerinin canlılık yüzdesi grafiği

Her iki hücre türü için de LD_{50} değerlerinin sağlandığı en uygun zaman aralığının bulunması amacı ile her bir bakteri suşu için 0, 1, 2, 4, 8 ve 24 saat kokültivasyon süreleri için ortalama canlılık yüzdeleri bulunmuş ve bu yüzdelerin t-test ile her iki hücre tipi için de kullanılabilecek saat aralığı değerlendirmiş, bu veriler Tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. *Escherichia coli* (OP50), *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *Salmonella enteriditis* (A17), *Salmonella telaviv* (A22), *Serratia entomophila* bakterileri ile kokültive edilen MEF ve HeLa hücreleri için hesaplanan 0, 1, 2, 4, 8, 24 saat ortalama canlılık yüzdeleri (Kontrol: Bakteriler ile kokültive edilmemiş MEF ve HeLa hücreleri)

Hücre / Zaman (saat)	**MEF**	**HeLA**
Kontrol (0)	%100.0	%100.0
1	%91.8	%91.3
2	%77.0	%77.5
4	%50.7	%53.5
8	%39.8	%40.3
24	%24.5	%27.7

LD_{50} değeri olan %50'ye en yakın canlılık yüzdeleri 4 saatlik kokültivasyon denemesi için gerçekleştiğinden iki hücre tipi arasında 4 saatlik uygulamanın aynı etkiyi gösterip göstermediğinin açığa çıkarılması amacı ile her iki data setine eşlenik olmayan Welch's t test uygulanmıştır. P değeri 0.7182 olup $P<0.05$ için iki hücre grubu arasındaki fark istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur (Şekil 4.4). Elde edilen veriler, hesaplanan ortalama değerler ve t-test verileri ışığında EÇ 1:1 iken MEF ve HeLa hücreleri için en uygun ortak kokültivasyon uygulama süresinin 4 saat olduğu bulunmuştur.

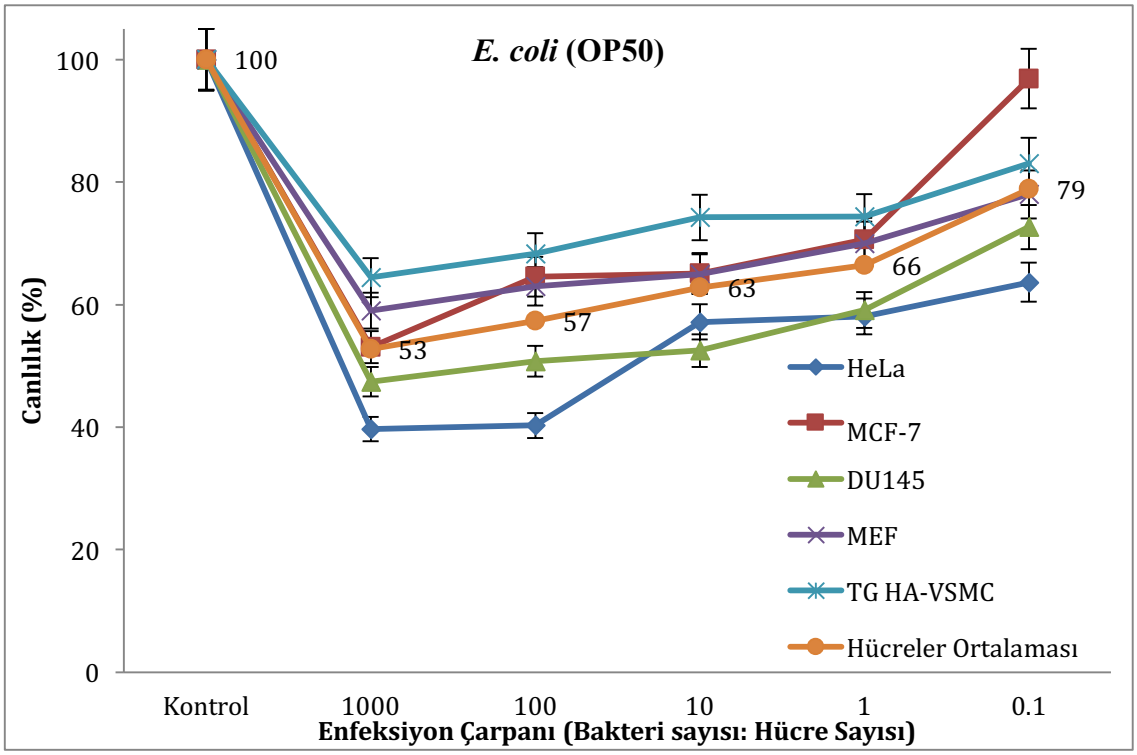


Şekil 4.4. HeLa ve MEF hücreleri için 4 saat kokültivasyon süresi verileri ile yapılan Welch's t test (eşlenik olmayan data) grafiği ve P<0.05 için hesaplanan P değeri

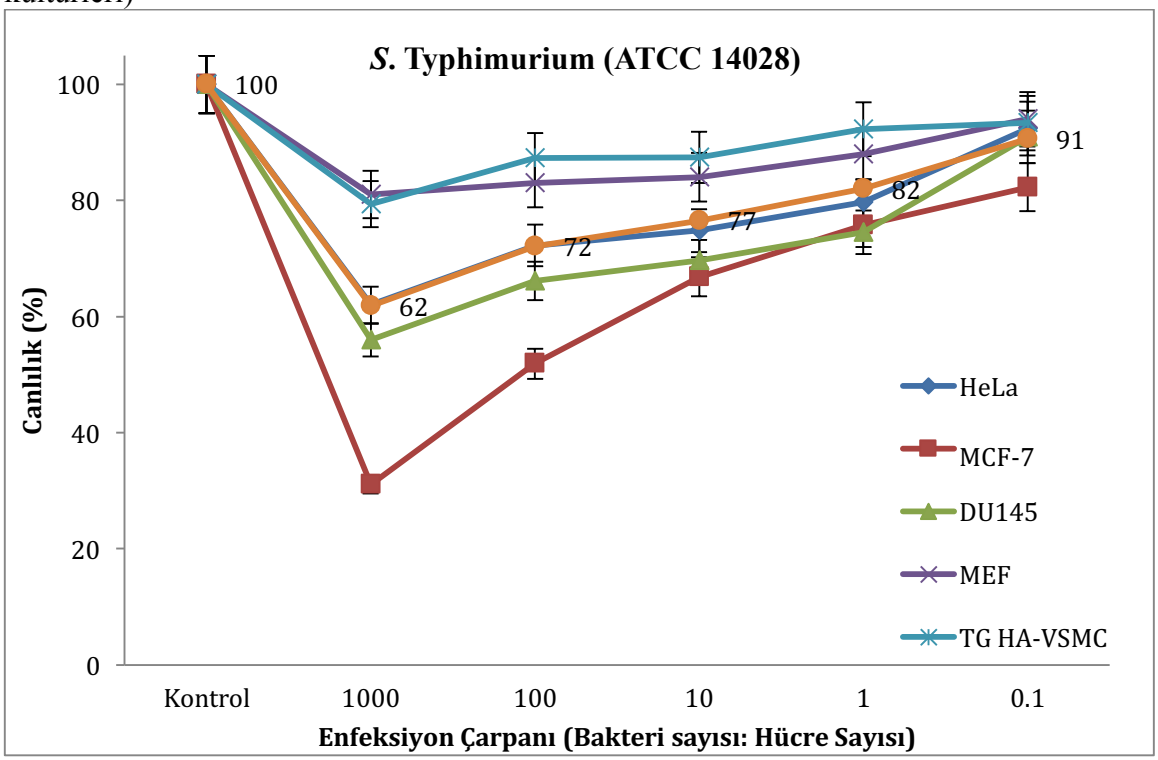
4.3 Optimal EÇ (Bakteri Sayısı:Hücre Sayısı Enfeksiyon Çarpan Oranı) Değerinin Bulunması

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile inoküle edilmiş olan sağlıklı hücre hatlarından MEF ve TG HA-VSMEC ile kanser hücre hatlarından HeLa, MCF-7 ve DU145 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin enfeksiyon çarpanı (EÇ) oranlarına göre nasıl değişiklik gösterdiğinin saptanabilmesi amacı ile gerçekleştiren 1000:1, 100:1, 10:1, 1:1 ve 0.1:1 (bakteri sayısı:hücre sayısı) denemelerine ait veriler her bir bakteri suşu için Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da grafiklenmiştir.

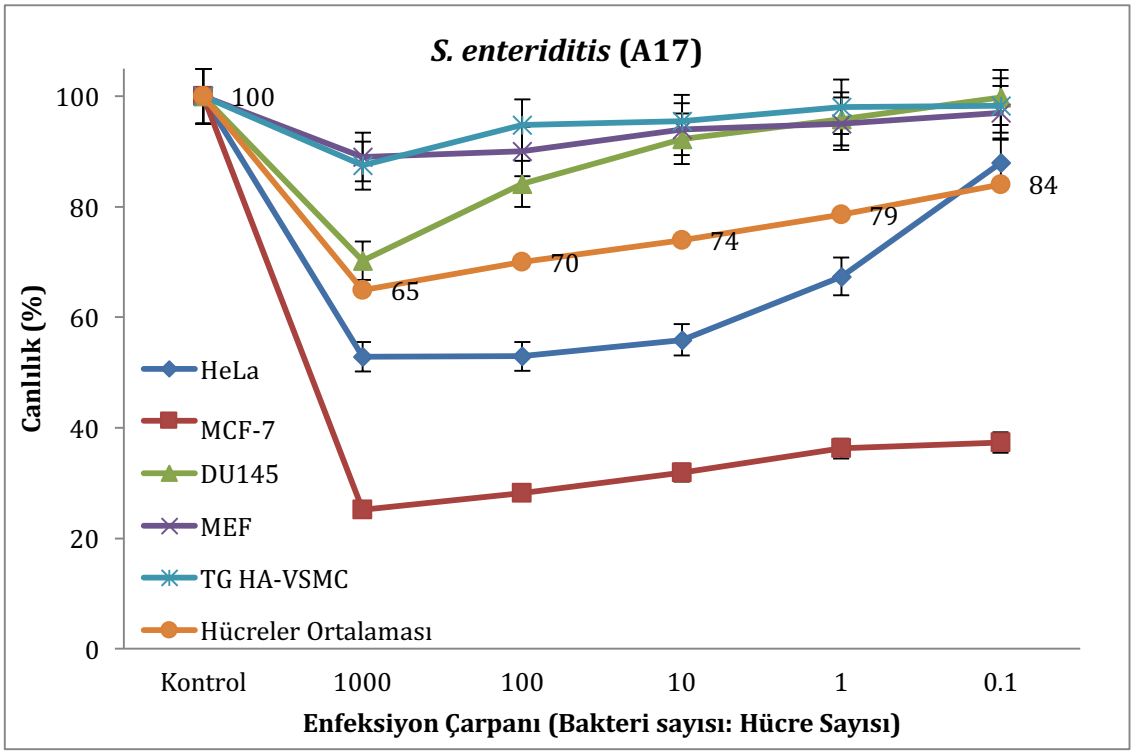
E. coli (OP50) için LD50 değerine en yakın değerler %53 ve %57 (Şekil 4.5)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* için %62 ve %72 (Şekil 4.6), *S. enteriditis* (A17) için %65 ve %70 (Şekil 4.7), *S. telaviv* (A22)için %52 ve %62 (Şekül 4.8) ortalamalar ile sırasıyla 1000:1 ve 100:1 EÇ oranlarında gerçekleşirken *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için %49 ve %55 (Şekil 4.9), *S. entomophila* (ATCC 43705) için %45 ve %49 (Şekil 4.10) ortalamalar ile sırasıyla 10:1 ve 1:1 EÇ oranlarında gerçekleşmiştir.



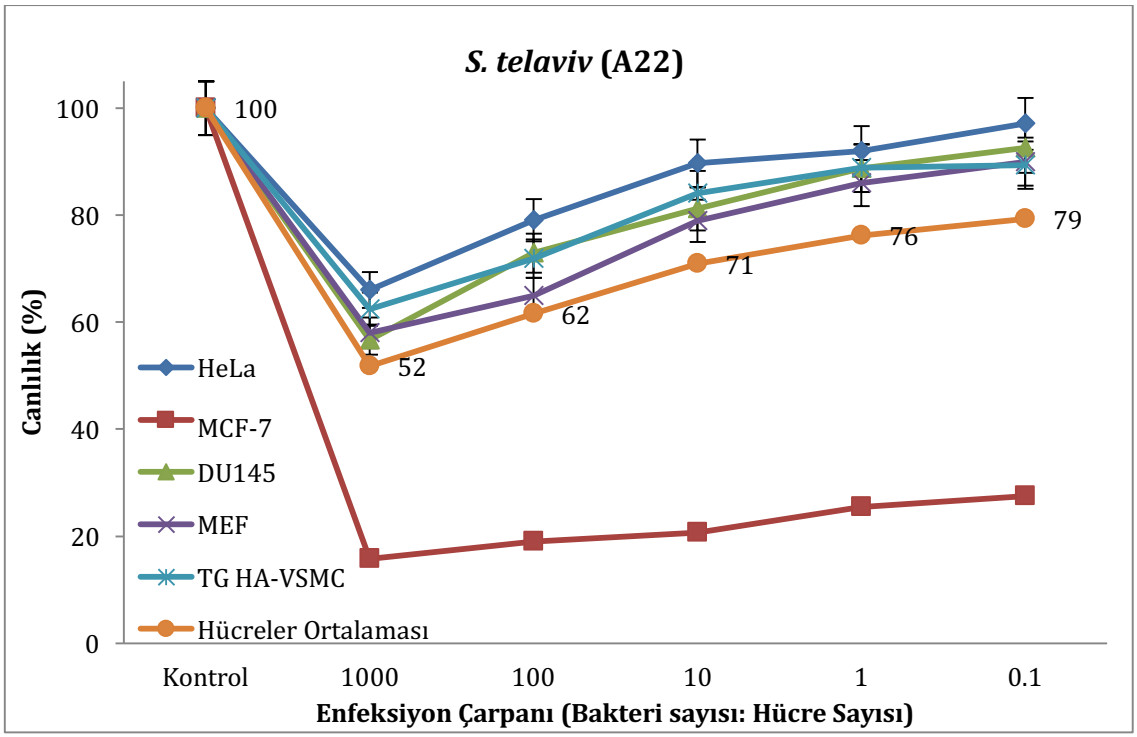
Şekil 4.5. *E. coli* (OP50) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *E. coli* (OP50) suşu ile kokültive edilmemiş hücre kültürleri)



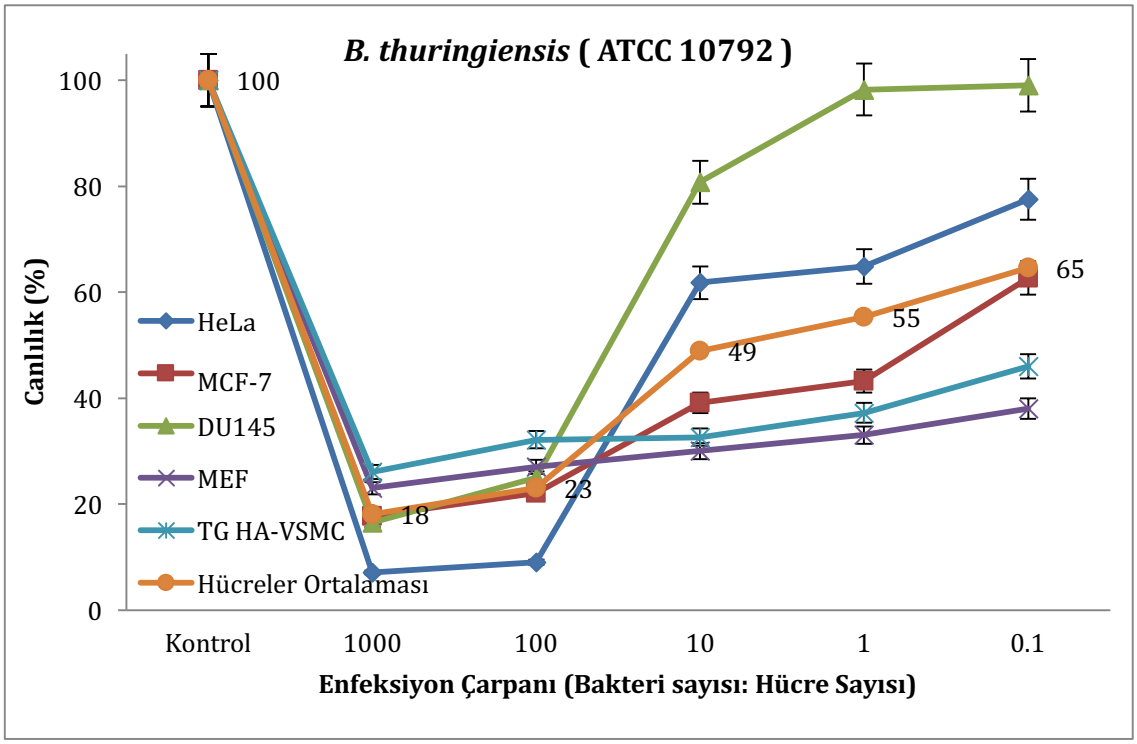
Şekil 4.6 *S. typhimurium* (ATCC 14028) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *S. typhimurium* (ATCC 14028) suşu ile kokültive edilmemiş hücre kültürleri)



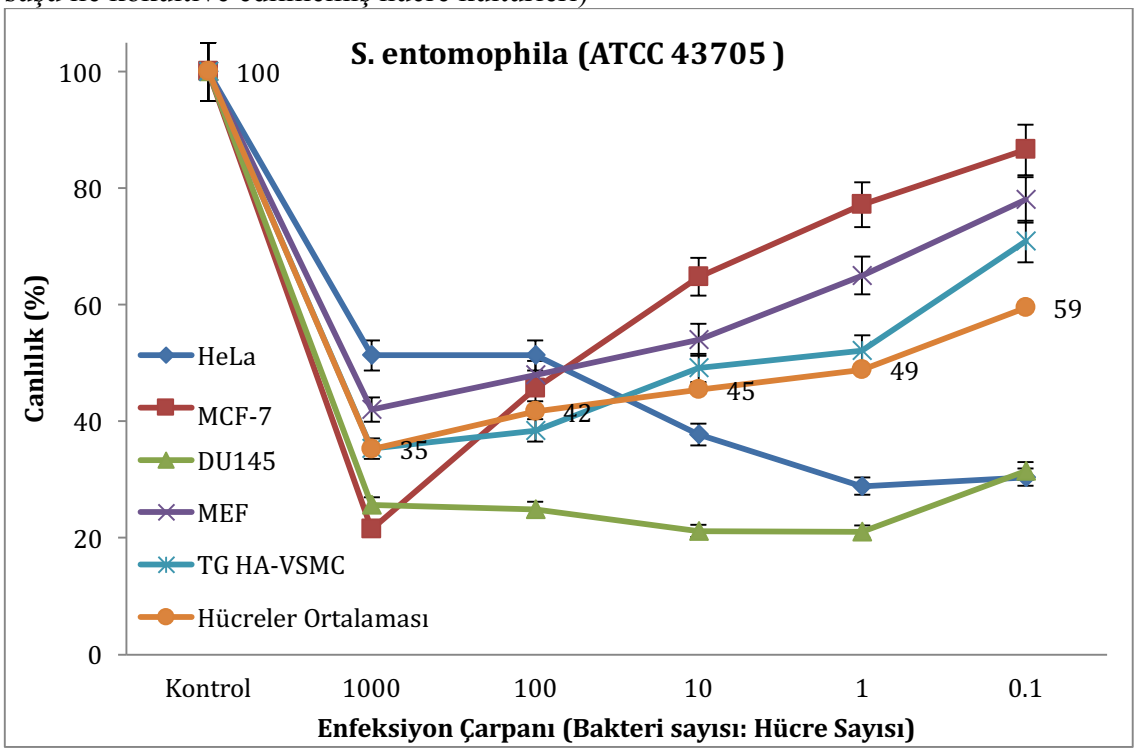
Şekil 4.7. *S. enteriditis* (A17) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *S. enteriditis* (A17) suşu ile kokültive edilmemiş hücre kültürleri)



Şekil 4.8. *S. telaviv* (A22) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *S. telaviv* (A22) suşu ile kokültive edilmemiş hücre kültürleri)



Şekil 4.9. *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *B. thuringiensis* (ATCC 10792) suşu ile kokültive edilmemiş hücre kültürleri)

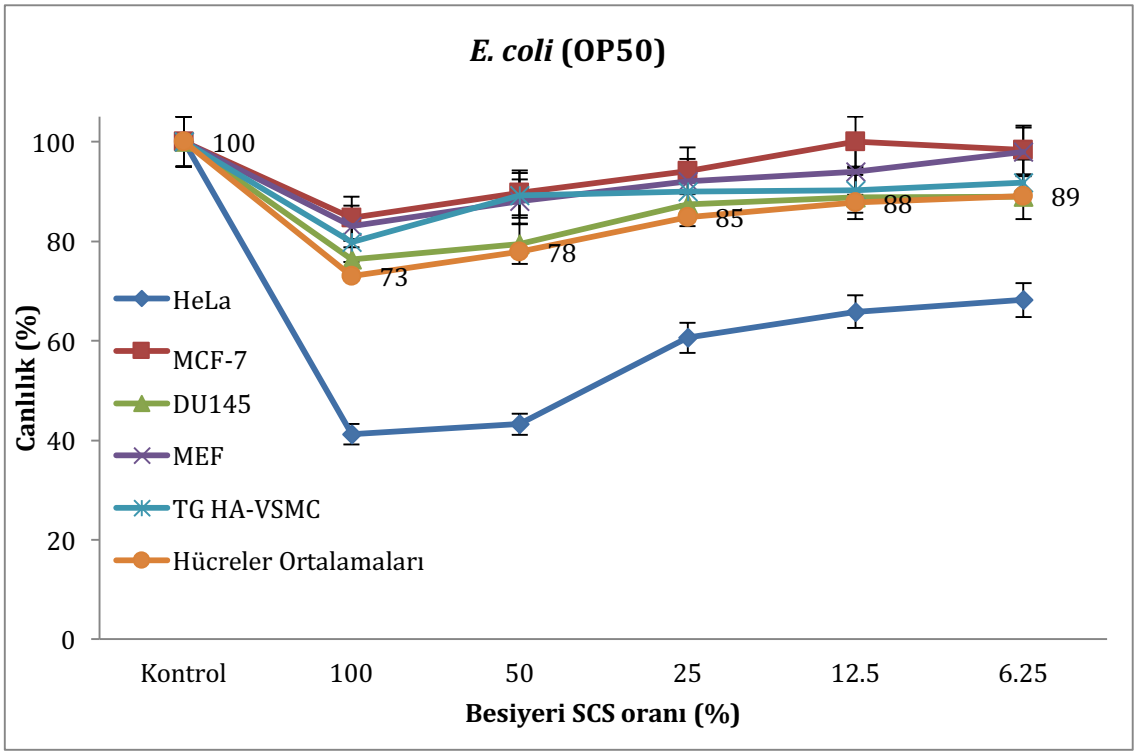


Şekil 4.10. *S. entomophila* (ATCC 43705) için değişen EÇ oranları ile kokültive hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *S. entomophila* (ATCC 43705) suşu ile kokültive edilmemiş hücre kültürleri)

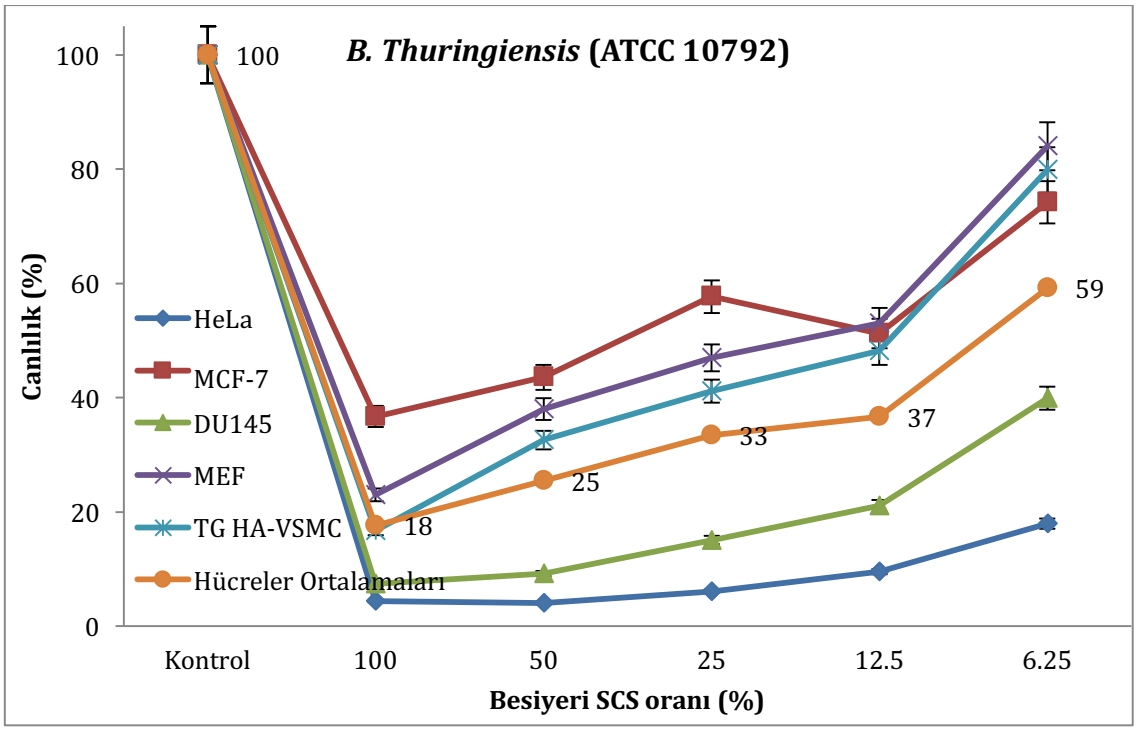
4.4 Bakteri Tarafından Tüketilmiş Süpernatanın (SCS) Hücre Hatları Üzerindeki Etkili Olduğu Maksimum Bakteri – Hücre Enfeksiyon Çarpan Oranının Bulunması

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri tarafından tüketilmiş süpernatan (SCS) ile inoküle edilmiş olan MEF, TG HA-VSMEC, HeLa, MCF-7 ve DU145 hücre hatlarının canlılık yüzdelerinin SCS:hücre besiyeri oranına göre gösterdiği değişikliğin ortaya çıkarılması amacı ile gerçekleştiren 100:100, 50:100, 25:100, 12.5:100 ve 6.25:100 denemelerine ait veriler her bir bakteri suşu için Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da grafiksel olarak gösterilmiştir.

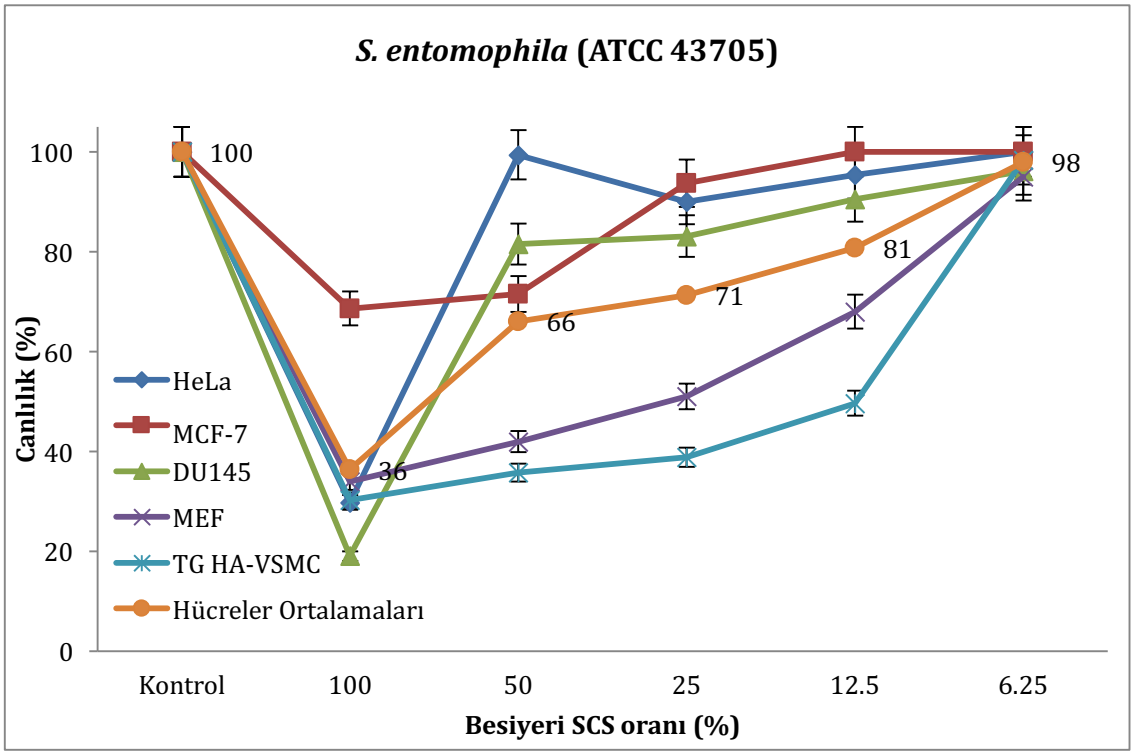
E. coli (OP50) için en düşük canlılık yüzdesinin gözlemlendiği değerler %73 ve %78 (Şekil 4.11)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* için %55 ve %80 (Şekil 4.12), *S. enteriditis* (A17) için %36 ve %55 (Şekil 4.13), *S. telaviv* (A22)için %35 ve %54 (Şekül 4.14), *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için %18 ve %25 (Şekil 4.15), *S. entomophila* (ATCC 43705) için %36 ve %66 (Şekil 4.15) ortalamalar ile sırasıyla 100:100 ve 100:50 SCS:hücre besiyeri oranları için olmuştur.



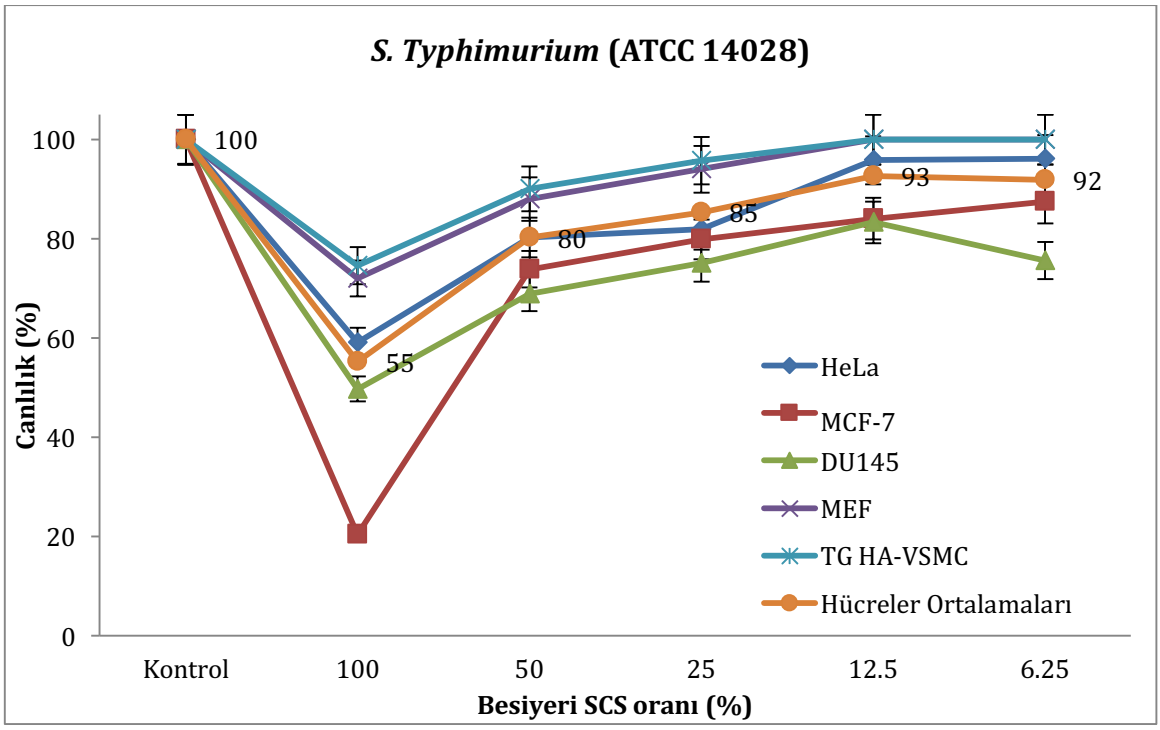
Şekil 4.11. *E. coli* (OP50) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *E. coli* (OP50)'ye ait SCS ile muamele edilmemiş hücre kültürleri)



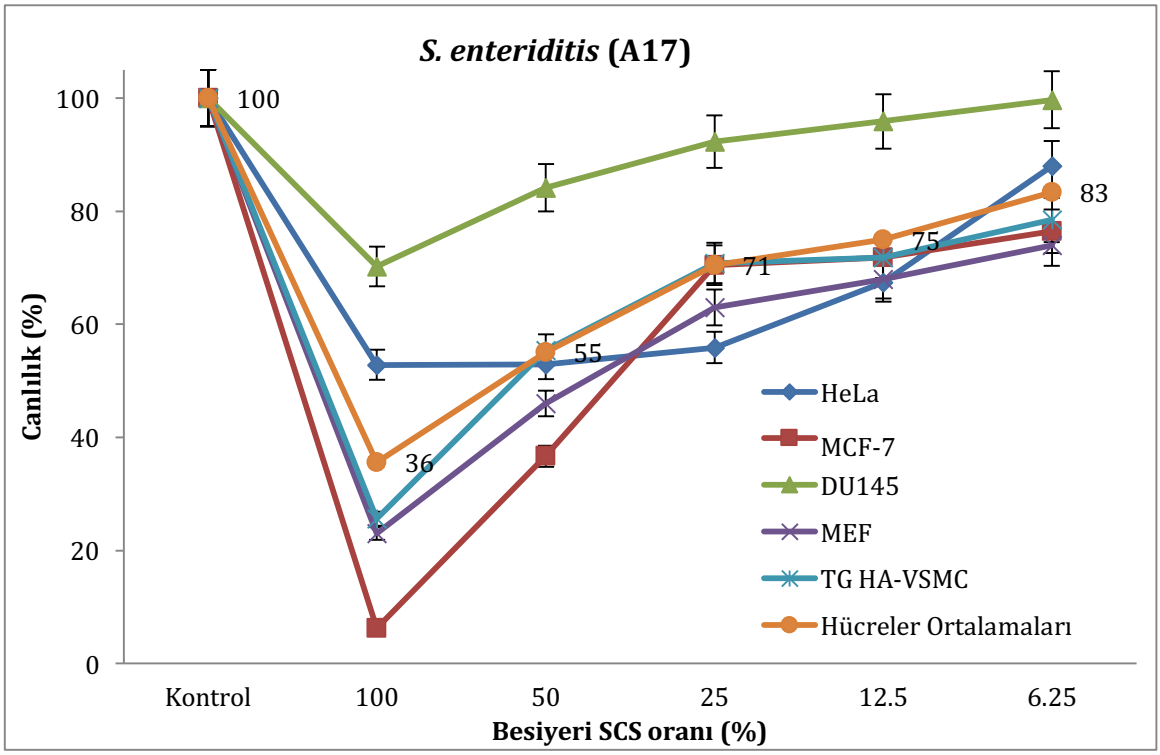
Şekil 4.12. *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *B. thuringiensis* (ATCC 10792)'ye ait SCS ile muamele edilmemiş hücre kültürleri)



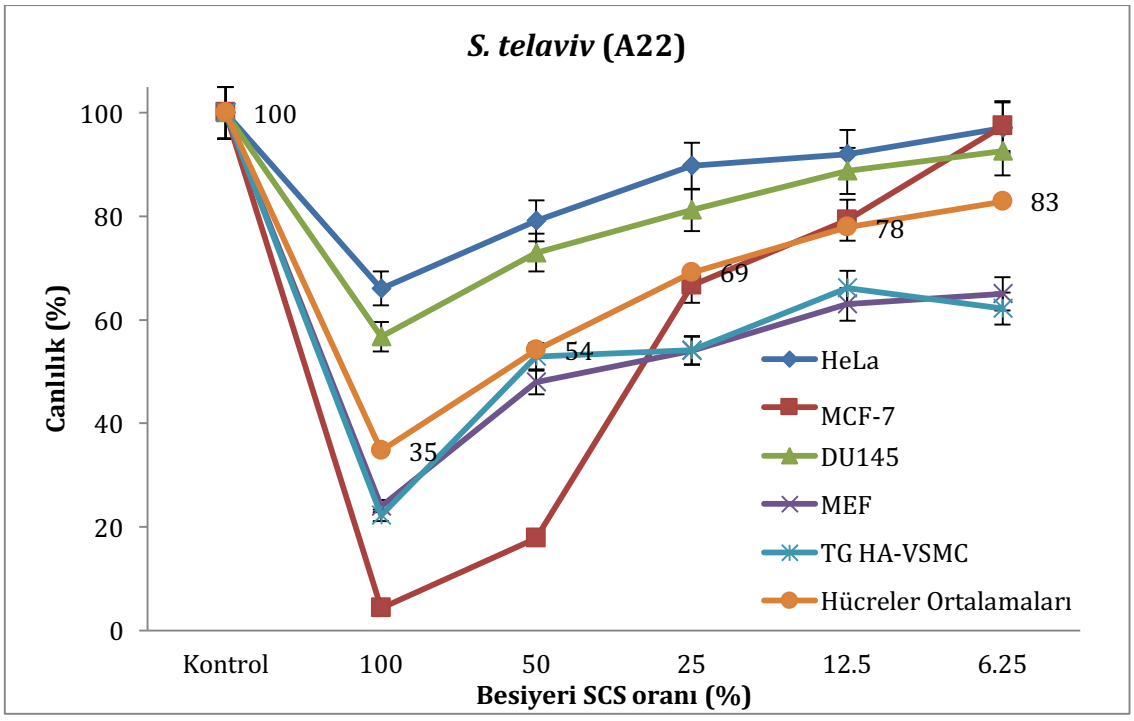
Şekil 4.13. *S. entomophila* (ATCC 43705) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *S. entomophila* (ATCC 43705)'e ait SCS ile muamele edilmemiş hücre kültürleri)



Şekil 4.14. *S. typhimurium* (ATCC 14028) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *S.* Typhimurium (ATCC 14028)'e ait SCS ile muamele edilmemiş hücre kültürleri)



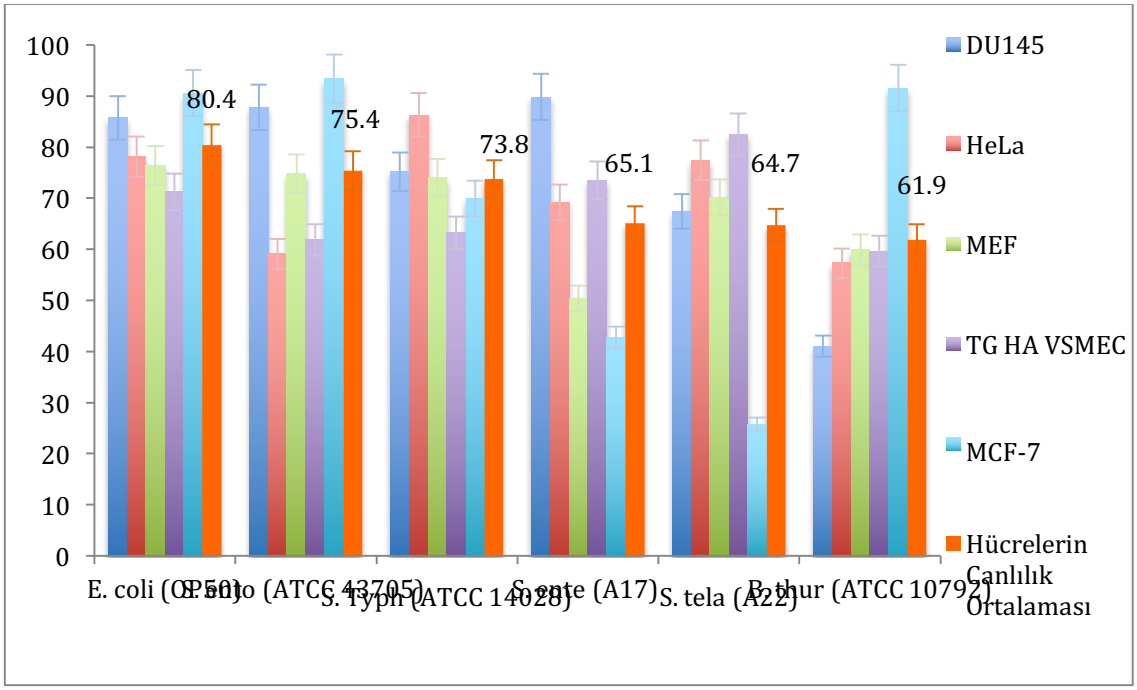
Şekil 4.15. *S. enteriditis* (A17) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *S. enteriditis* (A17)'ye ait SCS ile muamele edilmemiş hücre kültürleri)



Şekil 4.16. *S. telaviv* (A22) için değişen SCS:hücre besiyeri oranları ile muamele edilmiş hücre kültürlerinin canlılık yüzdesi grafiği (Kontrol: *S. telaviv* (A22)'ye ait SCS ile muamele edilmemiş hücre kültürleri)

4.5 Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Hücre Canlılık Yüzdelerinin TALI Canlılık Kiti ile Araştırılması

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca inoküle edilmiş olan sağlıklı hücre hatlarından MEF ve TG HA-VSMEC ile kanser hücre hatlarından HeLa, MCF-7 ve DU145 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin 100:1 enfeksiyon çarpanı (EÇ) oranına göre saptanabilmesi amacı ile kit üreticisinin talimatları doğrultusunda TALI görüntü tabanlı sitometri ile görüntüleme yapılırken TALI canlılık kiti kullanıldı. TALI görüntü tabanlı sitometre analiz cihazına yüklenen analiz lamları hücre canlılık ekranı ile görüntülenip analiz edildi ve raporlandı. Elde edilen raporlardan sağlanan canlılık yüzdeleri Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de grafiklendirildi.

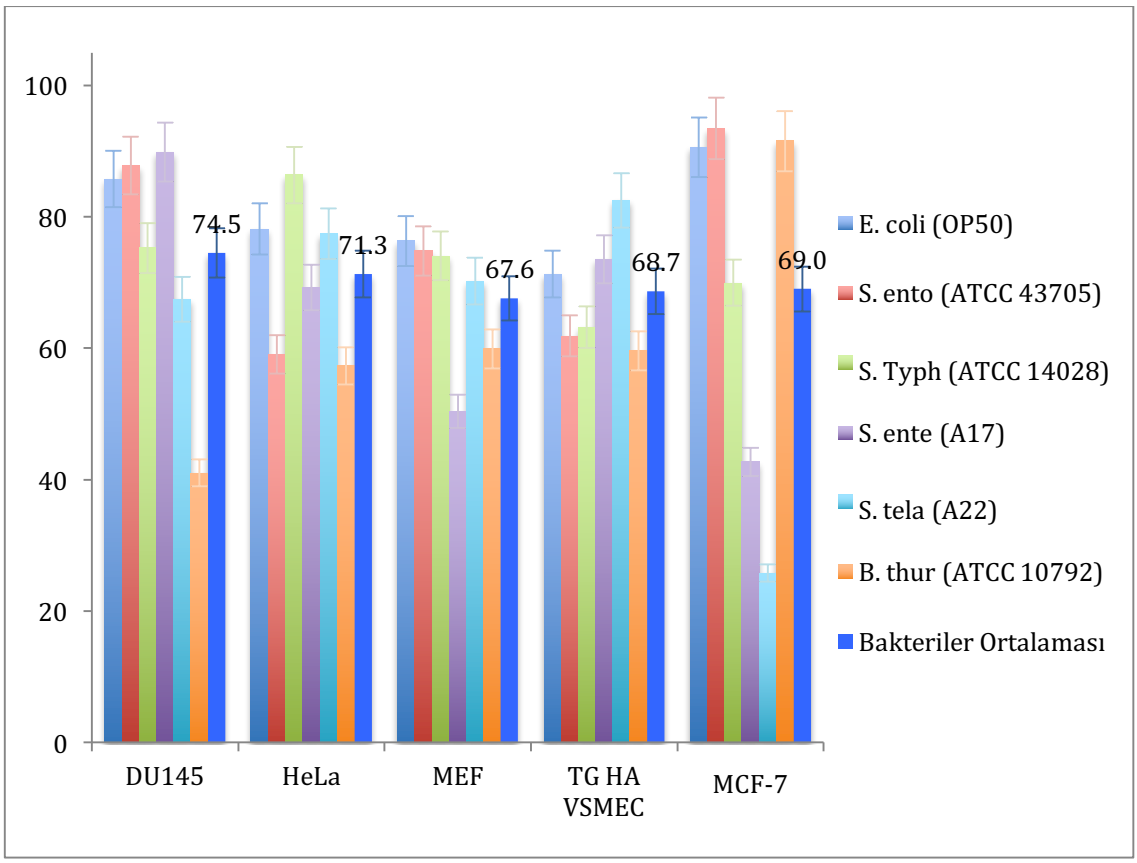


Şekil 4.17. MEF, TG HA-VSMEC HeLa, MCF-7 ve DU145 hücre hatları ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin hücre canlılık yüzdelerine etkisi

Şekil 4.17'de gösterildiği üzere hücrelerin canlılık ortalaması *E. coli* (OP50) için %80.4, *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için %61.9, *S. entomophila* (ATCC 43705) için

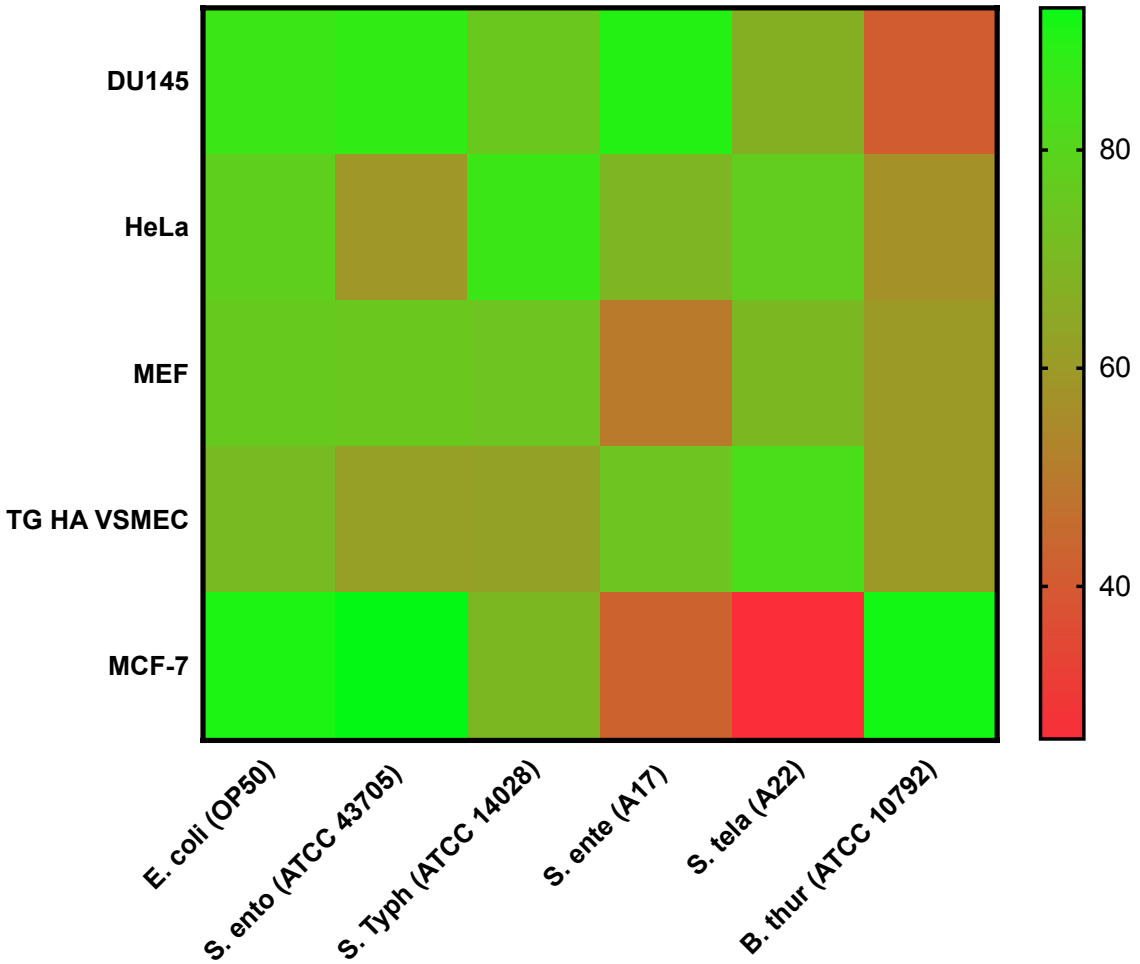
%75.4**,** *S. typhimurium* (ATCC 14028) için %73.8, *S. enteriditis* (A17) için %64.7, *S. telaviv* (A22) için %64.7 bulundu. Hücreler ortalamasında hücre canlılık yüzdesini en çok etkileyen bakteri *S. telaviv* (A22) olurken en az etkileyen *E. coli* (OP50) suşu olarak bulundu.

Bakteriler ile kokültivasyon hücrelerin canlılık yüzdelerini değişen oranlarda etkilemiş ve bu değerler DU145 için %74.5, HeLa için %71.3, MEF için %67.7, TG-HA VSMEC için %68.7 ve MCF-7 için %69 bulunmuştur (Şekil 4.18). Bakteriler ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranındaki inkübasyondan en az etkilenen hücre tipi MEF olurken en çok DU145 etkilenmiştir.



Şekil 4.18. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranları ile inkübe edilen MEF, TG HA-VSMEC HeLa, MCF-7 ve DU145 hücre hatlarının canlılık yüzdelerindeki değişim

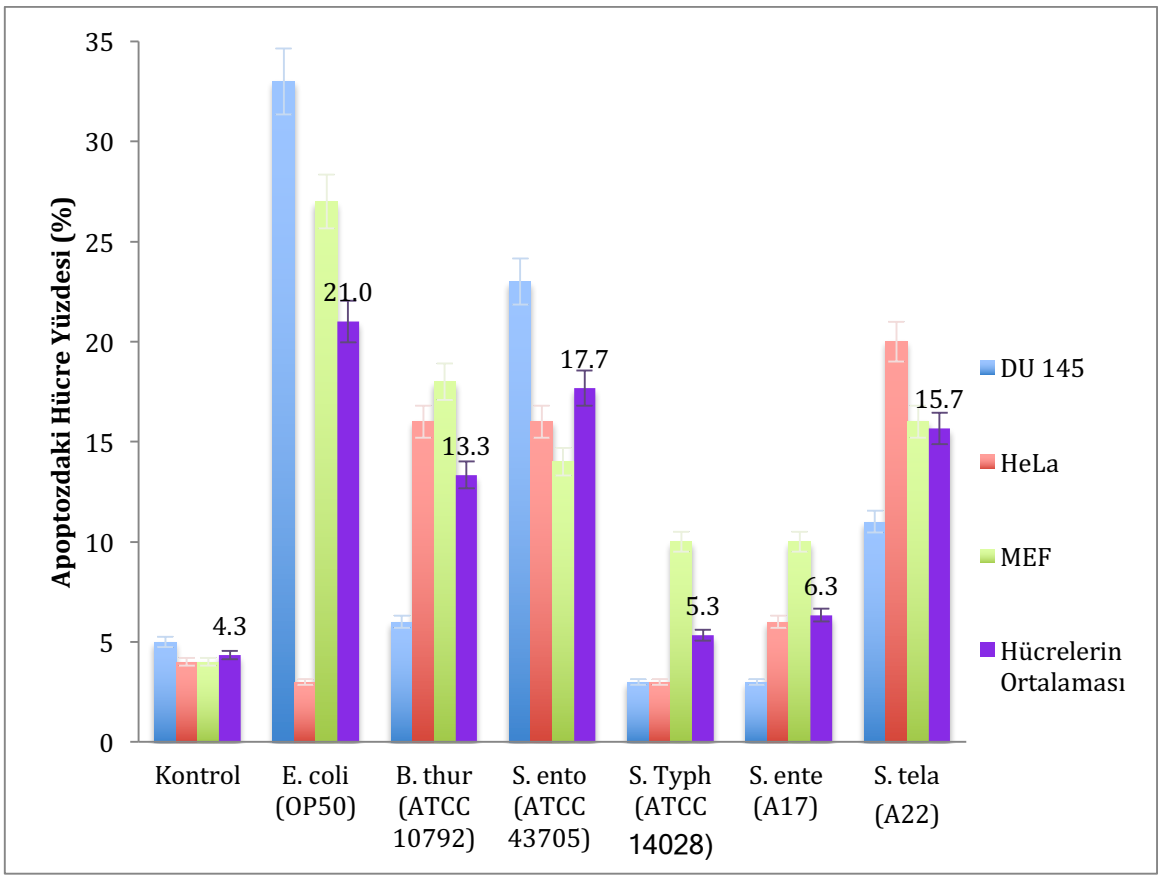
TALI canlılık kiti ile elde edilen veriler in analizi Chi^2 testi serbestlik derecesi (d_f)=20 ile yapılmış olup P değeri 92.03 bulunmuştur. P<0.05 için hücreler ve bakteriler arası etkileşimdeki farklar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Bu farkın görselleştirilmesi amacı ile hücre canlılık yüzdesi en çok etkilenenlerden en az etkilenene doğru kırmızıdan yeşil renge geçiş suretiyle Şekil 4.19'da ısı haritasıyla (heat map) gösterilmiş ve MCF-7 hücrelerinde *S. telaviv* (A22) suşunun canlılığı %25'e kadar düşürürken *S. entomophila* (ATCC 43705) suşunun %93 seviyesine indirdiği görülmüştür.



Şekil 4.19 Bakteriler ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen hücrelerin hücre canlılık yüzdelerini gösteren ısı haritası

4.6 Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Hücre Apoptoz Yüzdelerinin TALI Apoptoz Kiti ile Araştırılması

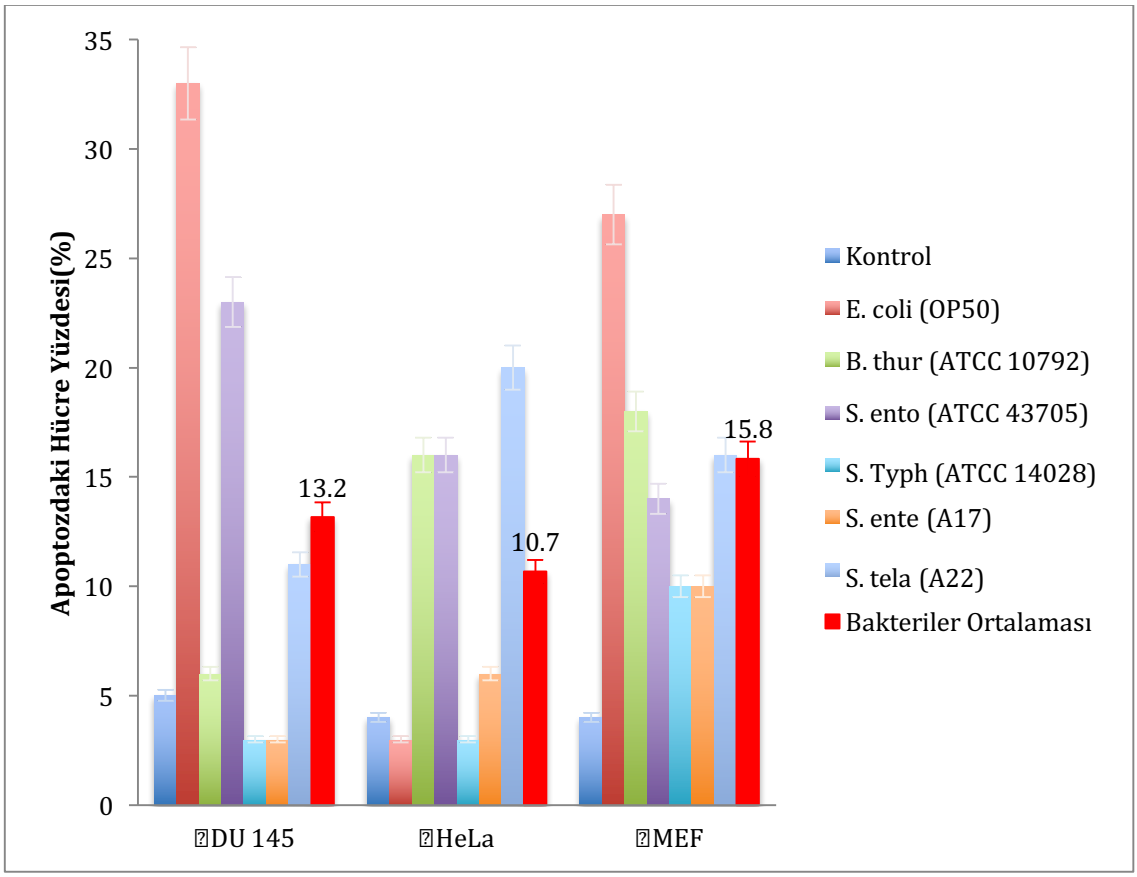
E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca 100:1 enfeksiyon çarpanı (EÇ) oranıyla kokültive edilmiş olan MEF, HeLa ve DU145 hücrelerinin hücre apoptoz yüzdelerinin saptanabilmesi amacı ile TALI görüntü tabanlı sitometri ile görüntüleme yapılırken TALI apoptoz kiti kullanıldı. TALI görüntü tabanlı sitometre analiz cihazına yüklenen analiz lamları apoptoz ekranı ile görüntülenip analiz edildi, raporlandı ve bu raporlardan sağlanan canlılık yüzdeleri Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'deki grafiklerde gösterildi.



Şekil 4.20. MEF, HeLa, ve DU145 hücre hatları ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. enteriditis* subsp. Enteriditis (ATCC 14028) serovar Typhimurium, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin hücre apoptozuna etkisi (Kontrol: Bakteriler ile kokültive edilmemiş hücre kültürleri)

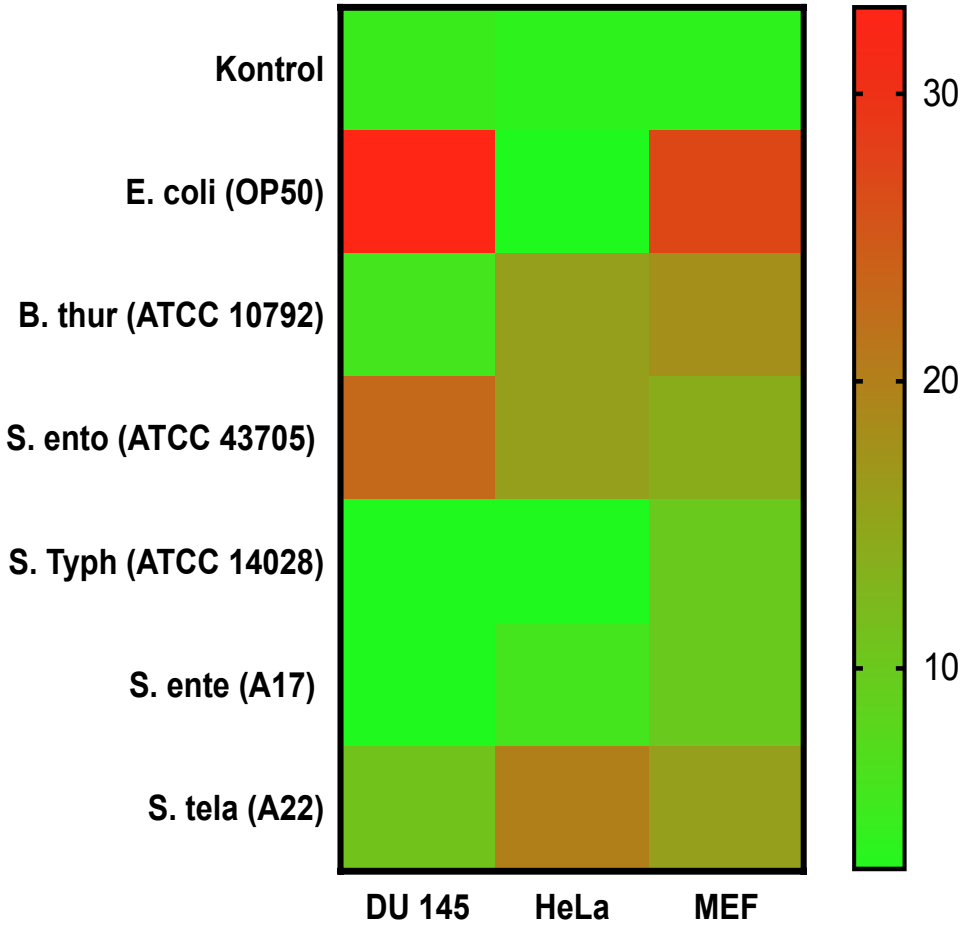
Apoptoza giren hücre yüzdesini gösteren Şekil 4.20'ye göre hücreler ortalaması hiç bir bakteri ile kokültive edilmemiş hücreler için %4.3, *E. coli* (OP50) için %21, *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için %13.3, *S. entomophila* (ATCC 43705) için %17.7**,** *S. typhimurium* (ATCC 14028) için %5.3, *S. enteriditis* (A17) için %6.3, *S. telaviv* (A22) için %15.7 bulundu. Hücreler ortalamasında hücre apoptoz yüzdesini en az etkileyen bakteri *S. typhimurium* (ATCC 14028) olurken en çok etkileyenin *E. coli* (OP50) suşu olduğu belirlendi.

Bakterilerle inkübasyon hücrelerin canlılık yüzdelerini değişen oranlarda etkilemiş ve bu değerler DU145 için %13.2, HeLa için %10.7 ve MEF için %15.8 bulunmuştur (Şekil 4.21). Bakteriler ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranındaki inkübasyondan sonra apoptoza girme açısından en çok etkilenen hücre tipi MEF olurken en az etkilenen HeLa hücreleridir.



Şekil 4.21. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. Enteriditis (ATCC 14028) serovar Typhimurium, *S. Enteriditis* (A17), *S. Telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranları ile inkübe edilen MEF, HeLa ve DU145 hücre hatlarında apoptoz yüzdelerindeki değişim (Kontrol: Bakteriler ile inkübe edilmemiş hücre kültürleri)

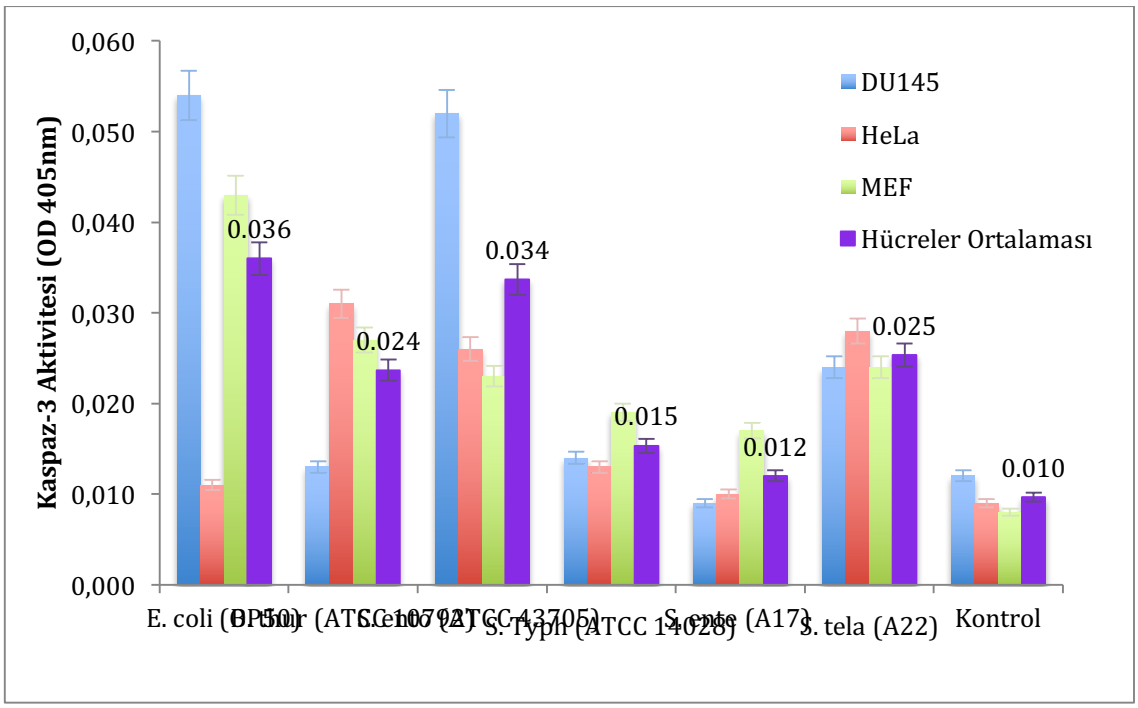
TALI apoptoz kiti ile elde edilen veriler in analizi Chi^2 testi serbestlik derecesi (df)=12 ile yapılmış olup P değeri 42.08 bulunmuştur. $P<0.05$ için hücreler ve bakteriler arası etkileşimdeki farklar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Bu farkın görselleştirilmesi amacı ile hücre canlılık yüzdesi en çok etkilenenlerden en az etkilenene doğru kırmızıdan yeşil renge geçiş suretiyle hücre canlılıkları Şekil 4.22'de ısı haritasıyla (heat map) gösterilmiş ve DU145 hücrelerinde *E. coli* (OP50) suşu apoptozu %33'e kadar yükseltirken *S. typhimurium* (ATCC 14028) suşu DU145 ve HeLa için; *E. coli* (OP50) suşu HeLa için; *S. enteriditis* (A17) ise DU145 için %3 seviyesinde negatif kontrol değerlerinin altında kalmıştır.



Şekil 4.22 Bakteriler ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen hücrelerin hücre apoptoz yüzdelerini gösteren ısı haritası (Kontrol: Bakteriler ile kokültive edilmemiş hücre kültürleri)

4.7 Bakteri:Hücre Kokültivasyonu Sonrası Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca 100:1 enfeksiyon çarpanı (EÇ) oranıyla kokültive edilmiş olan MEF, , HeLa ve DU145 hücrelerinin Kaspaz-3 aktivitelerinin saptanabilmesi amacı ile kolorimetrik proteaz ApoTarget Kit ile kullanıldı. Her bir örnek spektrofotometrede (Multiskan FC, Thermo Scientific, ABD) 405 nm dalga boyunda kör hesabı yapılarak ölçüldü ve veriler Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'teki grafiklerde gösterildi.

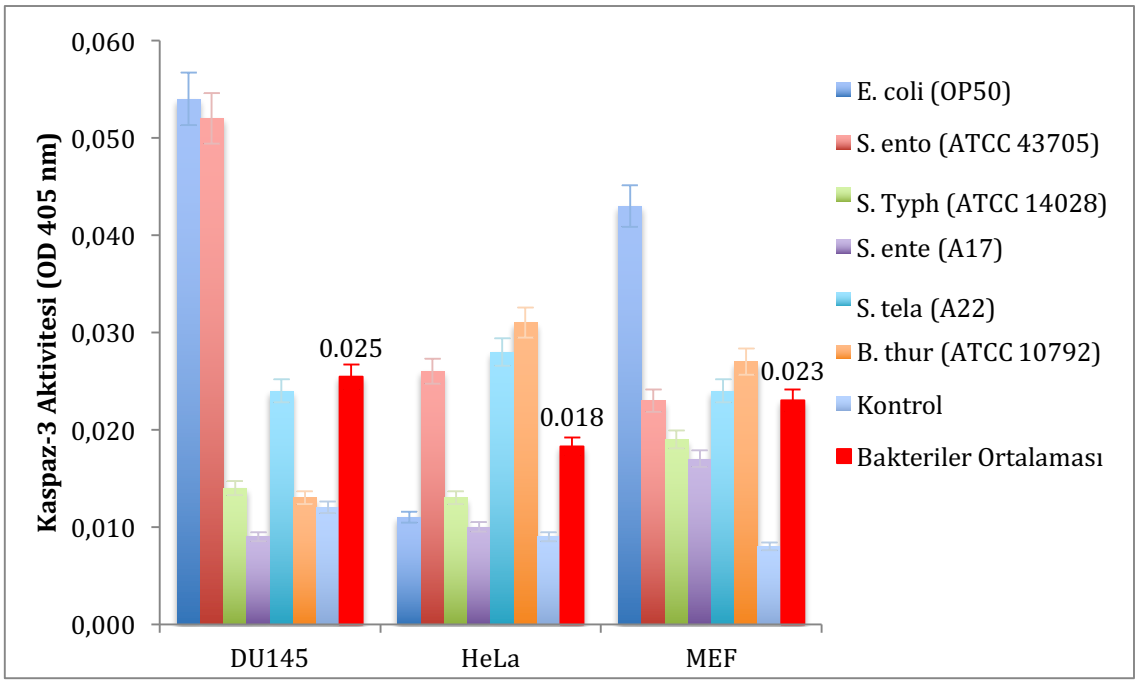


Şekil 4.23. MEF, HeLa, ve DU145 hücre hatları ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin Kaspaz-3 aktivitesine etkisi (Kontrol: Bakteriler ile inkübe edilmemiş hücre kültürleri)

Kaspaz-3 aktivitesini gösteren Şekil 4.23'e göre hücreler ortalaması hiç bir bakteri ile kokültive edilmemiş hücreler için 0.01, *E. coli* (OP50) için 0.036, *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için 0.024, *S. entomophila* (ATCC 43705) için 0.034, *S. typhimurium* (ATCC 14028) için0.015, *S. enteriditis* (A17) için 0.012, *S. telaviv* (A22) için 0.025 bulundu. Hücreler ortalamasında Kaspaz-3 aktivitesinin en az artmasına

sebep olan bakteri *S. enteriditis* (A17) olurken en çok arttıran bakteri *E. coli* (OP50) suşu oldu.

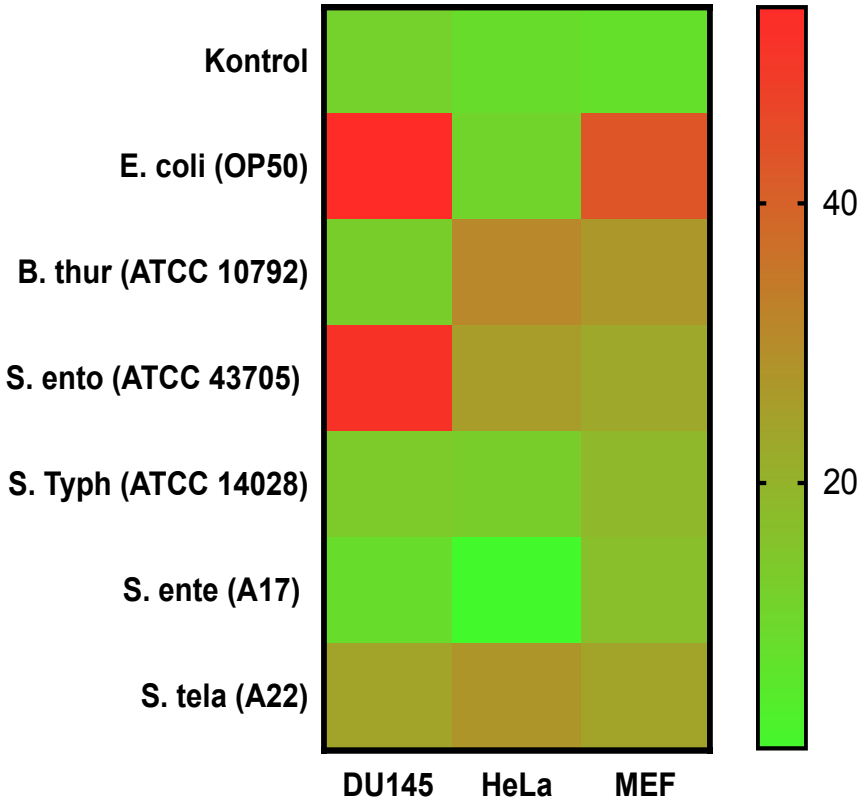
Bakteriler hücrelerin Kaspaz-3 aktivitelerini değişen oranlarda etkilemiş ve bu değerler DU145 için 0.025, HeLa için 0.018 ve MEF için 0.023 bulunmuştur (Şekil 4.24). Bakteriler ortalamasına göre bakteriler ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranındaki inkübasyonda Kaspaz-3 aktivitesi en çok artan hücre tipi DU145 olurken en az etkilenen HeLa olmuştur.



Şekil 4.24. *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranları ile inkübe edilen MEF, HeLa ve DU145 hücre hatlarında Kaspaz-3 aktivitesindeki değişim (Kontrol: Bakteriler ile inkübe edilmemiş hücre kültürleri)

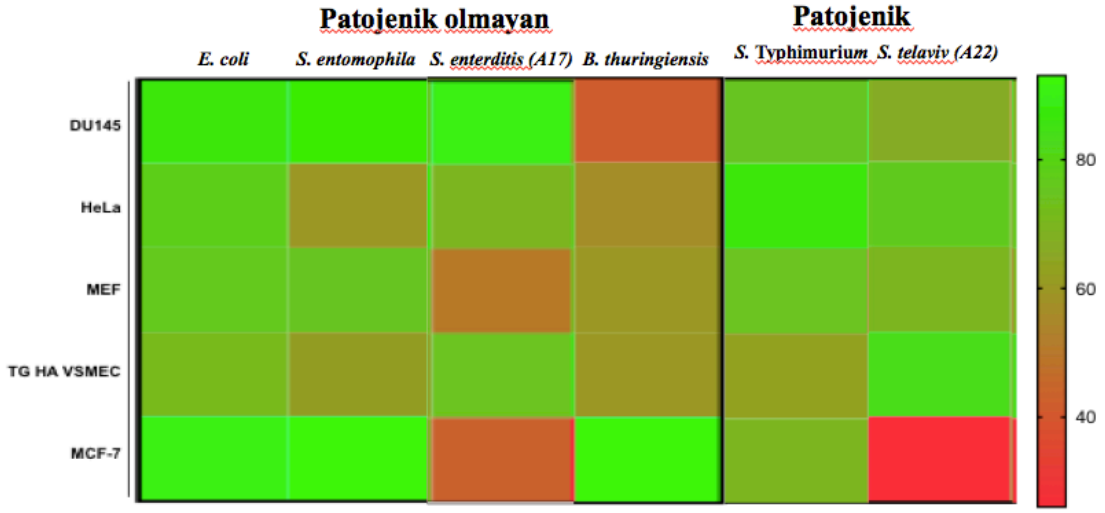
Kaspaz-3 kolorimetrik proteaz ApoTarget Kit ile elde edilen verilerin analizi Chi^2 testi serbestlik derecesi (df)=12 ile yapılmış olup P değeri 57.77 bulunmuştur. $P<0.05$ için hücreler ve bakteriler arası etkileşimdeki Kaspaz-3 aktivitelerindeki farklar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Bu farkın görselleştirilmesi amacı ile kaspaz-3 aktivitesi en yüksek olandan en düşük olana doğru kırmızıdan yeşil renge geçiş suretiyle kaspaz-3 aktiviteleri Şekil 4.25'te ısı haritasıyla (heat map) gösterilmiştir. Hücrelerin Kaspaz-3 aktivitelerini DU145 hücrelerinde *E. coli* (OP50) suşu 0.054'e kadar

yükseltirken *S. enteriditis* (A17) suşu DU145 ve HeLa için sırasıyla 0.009 ve 0.0010'a ; *E. coli* (OP50) suşu HeLa için 0.0011 seviyelerine getirerek negatif kontrol değerleri ile benzer değerler sergilemiştir.



Şekil 4.25 Bakteriler ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen hücrelerin Kaspaz-3 aktivitelerini gösteren ısı haritası (Kontrol: Bakteriler ile inkübe edilmemiş hücre kültürleri)

Patojenik *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* ve *S. telaviv* (A22) bakterileriyle 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen DU145, HeLa, MCF, TG HA-VSMEC, MCF-7 hücrelerinin canlılık yüzdelerindeki değişimler ve patojen olmayan *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. enteriditis* (A17) suşları ile kokültive edilen aynı hücrelerin canlılık yüzdelerindeki değişimler karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.26 Patojenik *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium*, *S. telaviv* (A22) ve patojen olmayan *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. enteriditis* (A17) bakterileri ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranı ile kokültive edilen DU145, HeLa, MCF, TG HA-VSMEC, MCF-7 hücrelerinin hücre canlılık yüzdelerindeki azalmayı gösteren ısı haritası

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Kanser endüstrileşmiş olan dünyamızda ölümlerin başlıca sebeplerini oluşturmaktadır. Kullanılan klasik tedavi yöntemlerinin hedef alınan hücreler dışında sağlıklı hücrelere de zarar vermesi olarak bilinen yetersiz hedefleme en büyük dezavantajlarından biridir ve bu tedaviler genellikle bir çok yan etkiyle sonuçlanırlar. Bakterilerin kanser tedavisinde kullanılması, şu anda kullanılan kemoterapi, radyasyon terapisi, kanserli bölgenin ameliyat ile uzaklaştırılması ve transplantasyon gibi tedavilere alternatif oluşturabilecek potansiyele sahiptir ve bakterilerin anti-kanser ajanı olarak kullanılması yüz yıldan daha eskidir. Günümüze kadar ise bakterilerin tümör içlerinde kolonize olma ve tümörleri hedefleme kabiliyetleri bir çok çalışma ile gösterilmiştir [156].

19. yüzyıl başlarında Vaultier kanser hastalarında bakteriyel enfeksiyonlar ile tümörlerinin küçülmeleri arasında bir bağlantı olabileceğini öngörerek bu gözlemlerini yayınlamıştır [157]. Bakteriler ile kanser tedavisinin ilk denemeleri ise 1868 yılına dayanmaktadır. Alman doktor W. Busch bir hastayı ameliyat ederek boynundaki tümörü uzaklaştırmıştır ve bu hastanın hastanede kullanığı yatağın daha *önce Streptococcus pyogenes* enfeksiyonu ile yılancık hastalığı geçirmiş bir hastaya ait olmasını sağlayarak ilk bakteriyel tedaviyi uygulayan doktorlardan biri olmuştur [158, 159].

Takip eden yıllarda bir çok araştırmacı ve doktor birbirlerinden bağımsız olarak farklı bakterileri ve bakteriyel bileşenleri kanser tedavisi amacı ile kullanmışlardı. Coley'nin toksini olarak bilinen *Streptococci* and *Serratia marcescens* bakterilerinin karışımı William Coley tarafından bir araya getirilmiştir ve günümüzde bir çok onkolojist tarafından bilinmektedir. Bazı başarılarına rağmen Coley'nin toksini o zamanlar kontrol altına alınamayan ciddi yan etkilere sebep olmuş ve bu toksinin

kullanımı ile ilgili araştırmalar ve diğer bakterilerle ilgili denemelere uzun süre ara verilmiştir.

Son 20 yılda bakterilerin kanser tedavisinde kullanımı konusundaki araştırmalar bakteri-konak ilişkilerinin ortaya çıkarılması, kullanılan bakterilerin genom bilgilerinin aydınlatılması ve moleküler tekniklerin gelişmesi ile hedefe özel bakterilerin ve bakteri parçalarının dizayn edilmesi sayesinde hız kazanmıştır [156]. Günümüze kadar bir çok bakteri türünün tümör hedefleme ve tedavideki etkileri fare modellerinde ortaya konmuştur. Araştırılan bakterilerden en bilinenleri zorunlu anaerobik *Clostridia* veya *Bifidobacteria* ile fakültatif anaeroplarda *Salmonella* ve *E. coli*'dir. Tümörlerin nekrotik alanlarındaki hipoksik ortamın özellikle zorunlu anaerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin seçici kolonizasyonuna sebep olduğu tahmin edilmektedir [11]. Bugüne kadar yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu hayvan modellerinde yapılmış olup insanda klinik denemelere geçen çok az çalışma bulunmaktadır. Bunlardan en önemli olanı *Mycobacterium boris* türevi olan Bacille Calmette–Guérin (BCG) türüdür. Bu bakteri türü tüberküloza karşı aşı olarak geliştirilmişse de klinik olarak idrar kesesi kanserlerinde kullanımı yaygındır. Ancak hala etki mekanizması ortaya çıkarılamamıştır. İdrar kesesi kanserlerinde tümör dokusu ameliyat ile alındıktan sonra BCG'nin direkt olarak idrar kesesine uygulanmasının hastalarda kanserin yeniden ortaya çıkışını %70 azalttığı belirlenmiştir [160]. Ortaya çıkartılan bu başarılı tedavi potansiyeli bakterilerin kanser tedavi ajanı olarak kullanılmasını öngören araştırmaların daha da artmasına sebep olmuştur.

Bakterilerin tümörlü dokuları seçici hedeflemesine rağmen toksik etkileri ve bağışıklık sisteminde oluşturdukları cevaplar bakterilerin genetik olarak modifiye edilip zayıflatılmasıyla ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır ancak bakterilerin tümörleri nasıl hedefledikleri tam olarak açığa çıkarılamamıştır ve asıl mekanizmaların ortaya çıkarılması kanser terapilerinin ve ilaçların geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında potansiyel kanser tedavi ajanı olabilecek bakterilerin açığa çıkarılabilmesi ve bu bakterilerin antikanserojenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla *Escherichia coli* OP50, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enteriditis* subsp. *enteriditis (*ATCC 14028*)* serovar *typhimurium, Salmonella enteriditis, Salmonella telaviv, Serratia entomophila* bakterileri sağlıklı

hücre hatlarından MEF, TG HA-VSMEC ve kanser hücre hatlarından DU145, HeLa ve MCF-7 ile kokültive edilip bakterilerin hücre hatları üzerinde sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Yapılan deneysel çalışmanın ilk bölümünde kullanılan bakterilerin CFU/ml değerlerinin spektrofotometrik karşılıklarının bulunabilmesi amacı ile seri olarak seyreltilen bakteri kültürleri katı besiyerlerine ekim yapılarak oluşan koloni sayısı sayılmış ve bu koloni sayılarının spektrofotometre ile 600 nm dalga boyunda ölçülen OD_{600} karşılıkları bulunmuştur. Her bir bakteri için elde edilen optik yoğunluk değerleri ve 1 ml başına oluşan koloni sayıları standard grafik haline getirilmiştir. Elde edilen standard grafiğe göre düz bir eğilim çizgisi çizilip, formül ve R^2 değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.1).

Çizilen grafikler ile elde edilen formüllere göre her bir bakteri için OD=1 alınıp 10^6 x CFU/ml hesaplandığında *E. coli* (OP50) için 3.75 x 10^8, *B. thuringiensis* için 0.8x10^9, *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* için 1.32 x 10^9, *S. enteriditis* (A17) için 1.19 x 10^9, *S. telaviv* (A22) için 1.03 x 10^9, *S. entomophila* için 1.39 x 10^{10} CFU/ml bulunmuştur (Tablo 4.1). Hesaplanan bu değerlerin teorik değerler ile karşılaştırılması amacı ile literatür taraması yapıldığında *E. coli* (OP50) için 4.06x10^8 [161], *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* için 1.37x10^9 [162], *S. entomophila* için 2,16x10^{10} değerlerine ulaşılmıştır [163]. *E. coli* (OP50) ve *S. typhimurium* (ATCC 14028) için elde edilen deneysel değerler literatürdeki teorik değerlerin sırasıyla %92'si ve %96'sı olmak üzere oldukça yakındır. *S. entomophila* için elde edilen değer ise literatüdeki değerin %65'ine denk gelmektedir. Ancak yapılan literatür araştırmalarında *B. thuringiensis, S. enteriditis* ve *S. telaviv* suşlarının optik yoğunlukları için CFU/ml ya da bakteri sayısı karşılıklarına dair herhangi bir bilgiye ulaşılamamıştır.

Çizilen standard grafiklerden elde edilen R^2 basit regresyon analizi değerlerini vermektedir ve *E. coli* (OP50) için 0.99405, *B. thuringiensis* için 0.9968, *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* için 0.98915, *S. enteriditis* (A17) için 0.98994, *S. telaviv* (A22) için 0,99352, *S. entomophila* için 0.99473 bulunmuştur (Tablo 4.1) . Bu değerlerin 1'e yakın olması elde edilen verilerin çizilen eğilim çizgisine uyumluluğunu göstermektedir ve deneyde kullanılan her bir bakteri için bu uyumluluk oldukça yüksektir.

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin MEF ve HeLa hücreleri üzerindeki optimum etki süresinin bulunabilmesi amacı ile EÇ oranı 1:1 iken 1, 2, 4, 8 ve 24 saat kokültive süreleri kullanılarak MTT sitotoksisite testi uygulanmıştır. Zaman değişkenine göre bakterilerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri grafiklenmiş ve sırasıyla MEF ve HeLa hücreleri için Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. MEF hücreleri sağlıklı hücreleri, HeLa hücreleri ise kanserli hücreleri temsilen seçilmişlerdir.

Bakteriler ile kokültivasyon süresi 24 saate uzadıkça hücre canlılıkları MEF hücreleri için ortalama %24.5'a; HeLa hücreleri için ortalama %27.7'e kadar düşmüştür. Ancak hücre canlılık yüzdelerinin en rahat gözlemlenip etkinin en uygun araştırılabileceği kabul edilen değer, LD_{50}, yani adı yarı öldürücü dozdur. MEF hücreleri için %50 civarına 4 saat kokültive sonucu %50.7 değeri ile ulaşılmıştır. HeLa hücreleri için ise yine 4 saat kokültive sonucu %53.5 değerine ulaşılmıştır. Her iki hücre türünde de benzer değerlerin elde edilmesi sonucu optimum kokültivasyon süresinin 4 saat olduğuna karar verilmiş ve bun aşamadan sonraki deneylerde kokültive süresi 4 saat olarak uygulanmıştır.

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile inoküle edilmiş olan MEF, TG HA-VSMEC, HeLa, MCF-7 ve DU145 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin enfeksiyon çarpanı (EÇ) oranlarına göre gösterdiği değişikliklerin saptanabilmesi amacı ile EÇ oranlarının 1000:1, 100:1, 10:1, 1:1 ve 0.1:1 (bakteri sayısı:hücre sayısı) olarak değişiklik gösterdiği bir dizi deneme yapılmıştır. Tüm bu denemelerde kokültivasyon süresi bir önceki denemelerde optimum kokültivasyon süresi olarak bulunan 4 saattir. Elde edilen veriler *E. coli* (OP50) için Şekil 4.5'te, *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için Şekil 4.6'da, *S. entomophila* (ATCC 43705) için Şekil 4.7'de, *S. typhimurium* (ATCC 14028) için Şekil 4.8'de, *S. enteriditis* (A17) için Şekil 4.9'da ve *S. telaviv* (A22) için Şekil 4.10'da grafiklendirilmiştir.

LD_{50} değeri olan %50'ye en yakın değerlere *E. coli* (OP50) için %53 ve %57 olarak 1000:1 ve 100:1'de, *B. thuringiensis* (ATCC 10792) için %49 ve %55 olarak 10:1 ve 1:1'de, *S. entomophila* (ATCC 43705) için %45 ve %49 olarak 10:1 ve 1:1'de, *S. typhimurium* (ATCC 14028) için %62 ve %72 olarak 1000:1 ve 100:1'de, *S.*

enteriditis (A17) için %65 ve %70 oranı ile 1000:1 ve 100:1'de ve *S. telaviv* (A22) için %52 ve %62 ile 1000:1 ve 100:1'de ulaşılmıştır. Elde edilen bu sonuçlardan hareket ile bütün bakteriler için en uygun EÇ oranının K-en yakın komşu (K-nearest-neighbour) algoritmasına göre 100:1 oranı olduğuna karar verilmiştir. Böylece bundan sonraki deneysel aşamalarda EÇ oranı 100:1 kullanılmıştır.

Bakterilerin kullandıkları besiyerleri bakterilere ait metabolitler içermektedir ve bu metabolitler ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılmakta ve yeni ilaçların keşfi için çoğu zaman başvurulmaktadır. Bakteriler tarafından kullanılan metabolik artıkların ve hücre dışı sekresyon ürünlerinin sağlıklı ve kanser hücreleri üzerine etkisini gözlemleyebilmek amacı ile *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerine ait 100:100, 50:100, 25:100, 12.5:100 ve 6.25:100 oranlarındaki SCS:hücre besiyeri ile kokültive edilmiş olan MEF, TG HA-VSMEC, HeLa, MCF-7 ve DU145 hücre hatlarının canlılık yüzdeleri her bir bakteri için Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da grafiksel olarak gösterilmiştir. *E. coli* (OP50) ile yapılan denemede bu bakteriden en çok etkilenen hücre tipi HeLa olmuştur ve diğer hücre tiplerinden belirgin bir farkla canlılık yüzdesi %40'lara kadar düşmüştür. Aynı etki bakteri ile yapılan denemede görülmüş olup *E. coli* (OP50) suşu HeLa hücrelerinde canlılık yüzdelerini %40'lara kadar indirmiştir (Şekil 4.5). *B. thuringiensis* (ATCC 10792) ile yapılan denemede ise diğer hücre tiplerine kıyasla canlılıklarını en çok yitiren hücre tipleri HeLa ve DU145 hücreleri olmuşlardır. Bu iki bakteri türüne ait SCS değerlerinin içinde bakteriyel tedavi ajanı taşıma olasılığı açısından umut verici bir farktır. Her iki bakteri türüne ait SCS'ler seçici bir şekilde HeLa ve DU145 kanser hücre hatlarının canlılıklarını azaltırken sağlıklı hücre hatlarının canlılıklarına etkisi daha az düzeyde olmuştur. Bu özellik bakteriyel tedavi ajanlarında olması istenen seçici hedeflemeyi karşılamaktadır. Ancak, MCF-7 kanser hücre hattı bu bakterilere ait SCS'den sağlıklı hücrelere benzer şekilde fazla etkilenmemiştir bu fark ise MCF-7 hücrelerinin diğer kanser hücrelerine göre nispeten daha yavaş olan bölünme ve çoğalma hızı ile açıklanabilir.

Ayrıca beklenen etkinin aksine *S. entomophila* (ATCC 43705) suşuna ait SCS ile yapılan denemede sağlıklı hücre hatları olan MEF ve TG HA-VSMEC hücrelerinin canlılık yüzdeleri kanser hücre hatlarından belirgin bir farkla daha düşük olmuştur.

Ancak canlı bakteri kokültivasyonu ile elde edilen sonuç SCS ile elde edilen sonuca zıt olarak HeLa ve DU145 hücrelerinin canlılık yüzdelerini seçici bir şekilde azaltmıştır (Şekil 4.10). Literatürde yapılan araştırmalar sonucu *S. entomophila* (ATCC 43705) bakterisinde bu etkinin sebebini açıklayan herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saat boyunca kokültive edilmiş olan sağlıklı hücre hatlarından MEF ve TG HA-VSMEC ile kanser hücre hatlarından HeLa, MCF-7 ve DU145 hücrelerinin canlılık yüzdelerinin 100:1 enfeksiyon çarpanı (EÇ) oranına göre TALI görüntü tabanlı sitometri ile analiz edilerek elde edilen raporlardan sağlanan canlılık yüzdeleri Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de grafiklendirilmiştir.

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de gösterilen veriler ışığında *S.telaviv* (A22) suşu, 1000:1 EÇ oranında canlılığı tüm hücre kültürleri için yaklaşık %60'a düşürürken, çalışmada kullanılan bakteriler arasında hücre ayrımı olmaksızın en yüksek sitotoksik etkiyi sahiptir (Şekil 4.17). *S. typhimurium* ATCC 14028 ve *S. enteriditis* (A17) suşları, MEF hücrelerinin canlılık yüzdesini en az etkileyen suşlar olurken, *S. typhimurium* ATCC 14028 suşu DU145 ve HeLa hücre kültürleri üzerinde benzer sitotoksik etkiler göstermiştir (Şekil 4.17 ve 4.18). *S.enteriditis* (A17) suşunun sitotoksik etkisi ise, sırasıyla en fazla HeLa ve DU 145 hücreleri üzerinde olmuştur (Şekil 4.9). *S.typhimurium* ATCC 14028 ve *S. telaviv* (A22) suşlarının hücreler üzerindeki seçici etkisi istatistiksel olarak anlamsız bulunurken (sırasıyla, $p= 0.5706$ ve $p= 0.8661$), *S. Enteriditis* (A17) suşu için anlamlı ($p< 0.0001$) bulunmuştur (Şekil 1). MTT sitotoksisite testi, *S. enteriditis* (A17) suşunun hücre kültürleri üzerinde seçici bir etkiye sahip olduğunu göstermiş; bu suş, MEF ve DU145 hücrelerinin canlılık yüzdelerini, 1000:1, 100:1 ve 10:1 EÇ oranlarına göre ortalama %80'lere düşürürken, HeLa hücre canlılık yüzdeleri aynı koşullarda %60'ın altında kalmıştır. Sonuçta, *Salmonella* suşlarının hücreler ile ilişkisi ve bakteriler arasındaki etkinin varyasyonu, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p< 0.0001$). İki yönlü ANOVA testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, çalışmada kullanılan *Salmonella* suşlarının, hücre kültürü canlılığına seçici bir şekilde etki ettiği belirlenmiştir. Nitekim, daha önce *C. elegans* modelinde yaptığımız sağkalım analizi çalışmasına göre de, *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S.*

enteriditis (A17) ve *S. telaviv* (A22) suşları için TD_{50} değerlerinin sırasıyla 4.1, 6.8 ve 4.8 olduğu gösterilmiştir [155].

E. coli (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterileri ile 4 saatlik 100:1 EÇ oranıyla kokültive edilmiş olan MEF, , HeLa ve DU145 hücrelerinin hücre apoptoz yüzdelerinin saptanabilmesi için TALI apoptoz kiti kullanılarak TALI görüntü tabanlı sitometri ile görüntüleme yapılıp analiz edilerek raporlanmış ve bu raporlardan sağlanan canlılık yüzdeleri Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'deki grafiklerde gösterilmiştir.

Elde edilen veriler ışığında hücreleri apoptoza sürekleyen en etkili bakteri ortalama bazında %21 ile *E. coli* OP50 suşu olarak bulunmuştur. Ancak *E. coli* suşu DU145 ve MEF hücrelerinde yüksek apoptoz etkisi gösterirken HeLa hücrelerinde beklenen etkiyi göstermeyerek kontrol değeri olan %4'ün altında kalmıştır. Ayrıca *S. entomophila* DU145 hücrelerinde benzer bir etki yaparak apoptoza giren hücre yüzdesini %23'e yükseltmiştir. *Serratia* türünün ikincil metaboliti olan prodigiosinin normal hücrelere karşı düşük sitotoksik etkiye sahipken nöroblastoma, meme ve kolorektal kanserler de dahil bir çok kanser türünde etkili olduğu bilinmektedir, ayrıca Kavitha ve ark. tarafından bu apoptotik etkinin servikal karsinoma kanserlerinde prodigiosin konsantrasyon dozuna bağlı artış gösterdiği ispatlanmıştır [164, 165]. *Serratia*'ya ait polisakkaritlerin tümör hücrelerinde dejeneretif etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir [166]. DU145 hücrelerini apoptoza sürükleyen etkenlerin *Serratia*'ya ait yapısal ürünler ve ya ikincil metabolitler olma olasılığı yüksektir çünkü *S. entomophila*'ya ait SCS'nin hücre canlılıklarını besiyeri ile yarı yarıya karıştırıldığında %20 civarına kadar düşürdüğü Şekil 4.13'te gösterilmiş olup SCS içeriği büyük ihtimalle anılan ikincil metabolit ve polisakkaritleri içermektedir.

MEF, HeLa ve DU145 hücrelerinin apoptozu tetikleyen Kaspaz-3 aktivitelerinin belirlenebilmesi amacı ile 4 saat boyunca 100:1 EÇ oranında kokültive edildikleri *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S. typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteriditis* (A17), *S. telaviv* (A22) bakterilerinin sebep olduğu Kapsaz-3 aktivitesi kolorimetrik proteaz ApoTarget Kit ile ölçülmüş ve veriler grafiklendirilmiştir.

Kaspazlar inflamasyon ve hücre ölümüne ait hücre yolaklarının kritik bağlantılarını kontrol eden endoproteazlardır. Kaspazların aktive edilmesindeki süreç inaktif zimojen olarak üretilmesiyle başlayıp sinyal mekanizmalarından aldıkları sinyaller ile dimer ya da makromoleküller oluşturarak aktif aşamaya gelene kadar devam etmektedir. Kaspazların aktivasyonu substratlarının inaktivasyonuna ya da aktivasyonuna sebep olmakta ve bir dizi reaksiyon başlatmaktadır [167]. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9'un bir alt basamağında aktive olur ve farklı sinyal mekanizmaları için bir dönüm noktası oluşturarak apoptoz testlerinde kullanılması etkili bir değerlendirme sağlar. Kapsaz-3 substratı olarak protein substratlarının kullanılması yaygındır ve hücre biyolojisi ve tıbbi kimyada en çok kullanılan substratlar Ac-DEVD-pNA and Ac-DEVD-AMC'dir. Ac-DEVD-pNA kolorimetrik sonuçlar verirken Ac-DEVD-AMC flöresans spektrofotometre ile değerlendirilmelidir [168]. Hücre kültürü deneylerinde de Kaspaz-3 aktivitesini ölçmek için en çok kullanılan substratlar Ac-DEVD-pNA and Ac-DEVD-AMC'dir ve Ac-DEVD-pNA'nin hidrolizi maksimum absorbansı 405 nm'de veren pNA kromoforunun ortama salınması ile son bulmaktadır [169].

Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'teki grafiklere göre *E. coli* OP50 suşu TALI apoptoz kiti ile ölçülen verilerle paralellik göstererek DU145 ve MEF hücrelerini HeLa hücrelerinden daha fazla etkileyerek 5 katlık bir Kaspaz-3 aktivitesine sebep olmuştur. *S. entomophila* ise seçici bir şekilde DU145 hücrelerinde Kaspaz-3 aktivitesini OD 405 nm'de 0.05 seviyesine yükseltirken MEF hücrelerindeki Kaspaz-3 aktivitesi bu değerin yarısında kalmştır. *Salmonella* suşları arasında yapılan değerlendirme ise S. *typhimurium* ve S. enteriditis suşlarının Kaspaz-3 aktivitesi üzerine etkisinin olmadığını ve Kaspaz-3 aktivitesine etkisi olan *Salmonella* suşunun *S. telaviv* (A22) olduğunu göstermiştir.

Anti-kanserojenik ilaç geliştirilmesi hedefi ile bir çok bakteri türü denenmiş ve bunların bazılarının apoptozu engellediği ortaya çıkarılmış olsa da, Srikanth ve ark. yaptıkları çalışmaslarda apoptotik enzimlerin *S. typhimurium* tarafından aktive edildiğini göstermişlerdir [170]. Tez çalışmasında Salmonella suşları ile gerçekleştirilen inkübasyon sonucunda MEF, DU145 ve HeLa hücrelerinin kaspaz-3 kolorimetrik ölçümleri ve apoptoza giren hücre yüzdeleri, *S.telaviv* (A22) suşunun *S. typhimurium* ve *S. enteriditis* suşlarına göre kanser hücrelerinde daha fazla apoptotik etkiye sebep

olduğunu açığa çıkarmıştır. Sonuçlarımızla uyumlu olarak *Salmonella*'ya ait bir efektör proteinin, kaspaz-3 aktivitesinde yükselişe sebep olarak apoptozu aktive ettiği literatürde bildirilmiştir [171]. Hipoksik ortamlarda aktive olan sentez mekanizmasına sahip *S.typhimurium*'un ayrıca Kaspaz-3 aktivasyonu yeteneğine sahip bir bakteriyel efektör proteini sentezleyebiliyor olması bakteriyel antikanser terapisinde değişik bir yaklaşım olarak kullanılmasını sağlamaktadır [172, 173].

Bakterilerin kanser tedavisinde kullanımını öngören çalışmalar Coley'in toksini ile başlamış ve gelişen moleküler biyoloji teknikleri, ortaya çıkartılan bakteri gen haritaları ve aydınlatılan bakteri-konak ilişkileri sayesinde klinik araştırmalar seviyesine gelmiştir .

Coley'in toksini ile başlayan bakteriyel kanser tedavisi çalışmaları, günümüzde klinik araştırmalar safhasına gelmiştir. Bu alan kendi içerisinde toksisite, lokalizasyon, ve bağışıklık ile ilgili sorunlar içeriyor olsa da, tedavilerin kapsam ve amaçları doğrultusunda genetik olarak modifiye edilmiş *Salmonella* sp*., Serratia entomophila, E. coli* (OP50) suşlarının bakteriyel kanser tedavide etkili olma potansiyellerine sahip oldukları görülmektedir. Sonuç olarak, *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705)**,** *S*. typhimurium (ATCC 14028), gıdalardan izole edilen *S. enteriditis* (A17) ve *S. telaviv* (A22) suşlarının kanser tedavisinde kullanılabilme olasılıklarını araştırmak hedefiyle gerçekleştirilen bu çalışma, *S.telaviv* (A22) suşunun kaspaz-3 aktivitesini artırdığını, apoptozu tetiklediğini göstermesi ve *E. coli* (OP50) ile *S. entomophila* suşlarının DU145 (insan prostat kanseri) hücreleri üzerinde seçici sitotoksisitesi olduğunun açığa çıkarılması açısından önem taşımaktadır.

Patojenik *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* ve *S. telaviv* (A22) ile 4 saat süresince 100:1 EÇ oranıyla kokültivasyonun DU145, HeLa, MCF, TG HA-VSMEC, MCF-7 hücreleri en çok üzerinde canlılık azaltıcı etkisi ve patojen olmayan *E. coli* (OP50), *B. thuringiensis* (ATCC 10792), *S. entomophila* (ATCC 43705), *S. enteriditis* (A17) suşlarının bu hücreler üzerindeki canlılık azaltıcı etkisi karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Beklenenin aksine nematod ve fare modellerinde patojen olmayan *S. enteriditis* (A17) suşu, DU145 dışındaki tüm hücre kültürleri üzerinde canlılık azaltıcı etki göstermiştir. En yüksek canlılık azaltıcı etki MCF-7 hücrelerinde gözlemlenmiş olup benzer düzeylerde canlılık azaltıcı etki MEF hücreleri için de bulunmuştur. Nematod ve fare modellerinde patojenik olduğu

gösterilen *S. telaviv* (A22) beklenen ile uyumlu olarak TG HA-VSMEC hücre tipi dışında bütün hücre kültürleri üzerinde canlılık azaltıcı etkiye sahiptir (Şekil 4.26) [155]. Ancak bu hücre canlılığını azaltan seçici sitotoksik etki *S. enteriditis* subsp. *enteriditis* (ATCC 14028) serovar *typhimurium* için gözlemlenmemiştir. Çalışmada kullanılan *Salmonella* sp. suşları için nematod ve fareler üzerinde gözlemlenen seçici patojenite ile uyumlu sitotoksisite *S. telaviv* (A22) dışındaki suşlarda görülmemiştir. Patojenite ve hücre kokültivasyon deneyleri sonucu ortaya çıkartılan sitotoksisite arasında herhangi bir korrelasyon bulunmamıştır.

S. entomophila (ATCC 43705) ile kokültivasyon sonucu MEF hücreleri canlılık yüzdelerinin %70'ni korurken, DU145 ve HeLa hücrelerinin canlılık yüzdeleri %25'e kadar düşmüştür (Şekil 4.26). *S. entomophila* (ATCC 43705)'nın tüm hücre hatları üzerindeki seçici sitotoksititesi istatistiki olarak da anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile *S. entomophila* (ATCC 43705) suşunun DU145 ve HeLa hücrelerinde hücre canlılığını azaltıcı etkisi olduğu ilk kez gösterilmiştir.

B. thuringiensis (ATCC 10792) suşunun MEF hücrelerinin canlılık yüzdesini %30'a kadar düşürdüğü bulunmuştur (Şekil 4.26). Ancak beklenenin aksine, DU145 ve HeLa hücrelerinin canlılıkları *B. thuringiensis* ile kokültivasyondan etkilenmemiştir. İki yollu ANOVA analizleriyle ise *B. thuringiensis* bakterisinin tüm hücre tipleri üzerinde seçici sitotoksik etkisinin istatistiki olarak anlamlı bulunmadığı ortaya çıkarılmıştır. Ancak GDO içeren gıdaların ortaya çıkartılmasında kullanılan *B. thuringiensis* bakterisinin MEF hücreleri üzerinde hücre canlılığını azaltıcı ve apoptotik etkisi olduğu ilk kez gösterilmiştir.

Bu çalışma ile *B. thuringiensis'*in HeLa ve DU145 kanser hücreleri üzerinde seçici toksisitesinin bulunmaması sebebi ile anti-kanser ilacı olarak kullanılmasının uygun olmadığı gösterilmiştir. Ancak düşük sitotoksisitine rağmen *S. entomophila* bakterisinin kanser hücre hatlarına (HeLa ve DU145) sağlıklı hücre hattından (MEF) daha fazla sitotoksik etkisinin olduğu açığa çıkarılmıştır ve bu *S. entomophila'*yı anti-kanser ajanı geliştirilmesinde uygun bir aday haline getirmektedir.

Günümüze kadar yapılan bütün çalışmalar göstermiştir ki bakterilerin kanser tedavisinde kullanılabilme potansiyelleri vardır ve Neil Forbes'in önerdiği gibi bu robot fabrikalar kanserle mücadelede birçok etkili araç sağlamaktadır [4]. En etkili bakteriyel tedavi tek bir suşun kullanımından ziyade hedefine özel amaçlar ile tasarlanmış birkaç

türün kullanımı olmalıdır. Bir suş kanserli dokunun tespit edilmesi için kullanılırken, bir başka suş bu dokunun bazı kimyasallar ile görünür kılınmasını sağlar ve diğer bir suş da dokuya dizayn edilmiş sitotoksik ajanı taşıyabilir. Bütün bu sinerjik etki daha başarılı tedavilerin gerçekleşmesine olanak sağlayabilir.

Bakterilerin kendi varoluşlarından gelen antikanser etkilerine dayanarak ortaya çıkartılan antikanser terapisi her kanser tipinde maalesef uygulanamamaktadır. Tümörler bakteriler tarafından stimüle edilen tümöre özel mekanizmalardan tıpkı klasik kanser tedavilerinde olduğu gibi kurtulma yoluna gidebilirler. Bu yüzden kanser hücreleri seçiciliğine sahip bakteriler kanser hücreleri ve sağlıklı hücreleri kapsayan deneyler ve in vivo çalışmalar ile seçilmeli; bu seçilen bakteriler ise kanserli dokuya tedavi ajanını gönderecek biçimde tasarlanmalıdır. Gelecek çalışmalar ile bakterilerin bağışıklık uyarıcı kapasiteleri ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri arttırılırken sağlıklı hücreler üzerindeki zararlı etkileri zayıflatılırsa genetik olarak modifiye edilmiş bu bakteriler kanser tedavisi için umut vadeden birer aday olacaklardır. Unutulmamalıdır ki bakteriler doğada bulunur halleriyle kanser tedavisinde birçok fonksiyonu yerine getirebilecek özelliklere sahip olsalar da en büyük avantajları genetik olarak modifiye edilmeye olan uygunluklarıdır.

KAYNAKLAR

[1] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, ***Cancer statistics 2016***, CA: A Cancer Journal for Clinicians, , 66 (1), 7-30, (2016).

[2] D. Morrissey, G. C O'Sullivan, M. Tangney, ***Tumour Targeting with Systemically Administered Bacteria***. Current Gene Therapy *, 10*, 3-14, (2010).

[3] J. M.Brown, J. A. Giaccia, ***The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy***. Cancer Research *, 58*, 1408-1416, (1998).

[4] N. S. Forbes, ***Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy***, Nature Reviews, Cancer, 10, 11, 785-794, (2010).

[5] N. Bernardes, A. M. Chakrabarty, M. Arsenio, ***Engineering of bacterial strains and their products for cancer therapy*** . Applied Microbiology and Biotechnology *, 9*1 (12), 5189-5199, (2013).

[6] F. S. Neil, L. L. Munn, D. Fukumura, R. K. Jain, ***Sparse initial enteriditis of systemically injected Salmonella typhimurium leads to heterogeneous accumulation within tumors.*** Cancer Research *, 63* (17), 5188-5193, (2003).

[7] V. H. Nguyen, H. S. Kim, J. M. Ha, Y. Hong, J. J. Min, H. E. Choy, ***Genetically engineered Salmonella typhimurium as an imageable therapeutic probe for cancer.*** Cancer Research *, 70* (1), 18-23, (2010).

[8] A. M. Chakrabarty, ***Microorganisms and Cancer: Quest for a therapy***. Journal of Bacteriology *, 185* (9), 2683-2686, (2003).

[9] M. Q. Wei, A. Mengesha, D. Good, J. Anné, ***Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era.*** Cancer Letters *, 259*, 16-27, (2008).

[10] F. Heppner, J. R. Mose, ***The liquefaction (oncolysis) of malignant gliomas by a non pathogenic Clostridium***. Acta Neurochir. 42, 123–125 (1978).

[11] P. Lambin, J. Theys, W. Landuyt, P. Rijken, A. Van der Kogel, E. Van der Schueren, L. Van Mellaert, ***Colonisation of Clostridiumin the body is restricted to hypoxic and necrotic areas of tumours,*** Anaerobe, 4, 4, 183-188, (1998).

[12] L. H. Dang, C. Bettegowda, D. L. Huso, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, ***Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors***, Proceedings of the National Academy of Sciences, 98 (26), 15155-15160, (2001).

[13] W. C. Lee Che-Hsin, ***Systemic administration of attenuated Salmonella choleraesuis carrying thrombospondin1 gene leads to tumorspecific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model.*** Cancer Gene Therapy, 12, 175-184, (2005).

[14] M. Zhao, M. Yang, H. Ma, X. Li, X. Tan, S. Li, et al., ***Targeted therapy with a Salmonella typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice***. Cancer Research, 66, 7647-52, (2006).

[15] A. Mengesha, L. Dubois, P. Lambin, W. Landuyt, R. K. Chiu, B. G. Wouters, et al., ***Development of a flexible and potent hypoxia-inducible promoter for tumor-targeted gene expression in attenuated Salmonella.*** Cancer Biol Ther , *5*, 1120-1128, (2006).

[16] M. Ohba, E. Mizuki, A. Uemori, ***Parasporin, a New Anticancer Protein Group from Bacillus thuringiensis*** . Anticancer Research , *2009* (1), 427-433, (2009).

[17] L. M. Zheng, X. Luo, M. Feng, Z. Li, T. Le, M. T. Ittensohn, ***Tumor amplified protein expression therapy: Salmonella as a tumor-selective protein delivery vector.*** . Oncology Research , *12* (3), 127-135, (2000).

[18] S. D. Jazayeri, Z. Zakaria, A. R. Omar, ***Attenuated Salmonella typhimurium SV4089 as a Potential Carrier of Oral DNA Vaccine in Chickens***. Journal of Biomedicine and Biotechnology , 8, (2012).

[19] S. Fest, N. Huebener, M. Bleeke, T. Durmus, A. Stermann, et al., ***Survivin minigene DNA vaccination is effective against neuroblastoma.*** . Int J Cancer , *125* (1), 104-114, (2009).

[20] Z. Zhong, R. A. Kazmierczak, A. Dino, R. Khreis, A. Eisenstark, H. Schatten, ***Salmonella-host cell enteriditis, changes in host cell architecture, and destruction of prostate tumor cells with genetically altered Salmonella.*** . Microsc Microanal. , *13* (5), 372-383, (2007).

[21] D., Hanahan, R. A. Weinberg, ***The hallmarks of cancer***, Cell, 100, 57–70, (2000).

[22] G. Danaei, S. Vander Hoorn, A. D. Lopez, C. J. Murray, M. Ezzati, The Comparative Risk Assessment Collaborating Group (Cancers), ***Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors***, The Lancet, *366* (9499), 1784-1793, (2005).

[23] ***Types of Cancer Treatment, American Cancer Society***, Adres: http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/, Erişim tarihi: 30 Mart 2017, (2016).

[24] A. T. St. Jean, M. M. Zhang, N. S. Forbes, **Bacterial therapies: completing the cancer treatment toolbox,** Current Opinion in Biotechnology, 19, 511–517, (2008).

[25] L. Van Mellaert, S. Barbé, J. Anné, ***Clostridium spores as anti-tumour agents***, Trends in Microbiology, 14, 190-196, (2006).

[26] M. Linnebacher, C. Maletzki, U. Klier, E. Klar, ***Bacterial immunotherapy of gastrointestinal tumors***, Langenbecks Arch Surg, 397, 557-568, (2012).

[27] S. A. Cann, J. P. Hoption, C. Van Netten, ***Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future***, Postgraduate Medical Journal, 79, 938, 672-680, (2003).

[28] ***What is Coley's toxins treatment for cancer?,*** Cancer Research UK, Adres: http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/cancer-questions/coleys-toxins-cancer-treatment, Erişim tarihi 31 Mart 2016, (2012).

[29] H. C. Connell, ***The Study and Treatment of Cancer by Proteolytic Enzymes: Preliminary Report***, Canadian Medical Association Journal, 33, 364-370, (1935).

[30] A. Morales, D. Eidinger, A. W. Bruce, ***Enteriditis Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of super cial bladder tumors***, Journal of Urology, 116, 180-183, (1976).

[31] S. Liu, X. Xu, X. Zeng, L. Li, Q. Chen, J. Li, ***Tumor-targeting bacterial therapy: A potential treatment for oral cancer (Review)***. Oncology Letters, 8(6), 2359-2366, (2014).

[32] S. Patyar, R. Joshi, D. S. Byrav, ***Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy***, Journal of Biomedical Sciences, 17, 21, (2010).

[33] N. S. Forbes, ***Profile of a bacterial tumor killer***, Nature Biotechnology, 24, 1484–1485, (2006).

[34] J. M. Pawelek, K. B. Low, D. Bermudes, ***Tumor- targeted Salmonella as a novel anticancer vector***, Cancer Research, 57, 4537–4544, (1997).

[35] Z. K. Pan, L. M. Weiskirch, Y. Paterson, ***Regression of established B16F10 melanoma with a recombinant Listeria monocytogenes vaccine***, Cancer Research, 59, 5264–5269, (1999).

[36] A. Y. Yong, S. Shabahang, T. M. Timiryasova, Q. Zhang, R. Beltz, I. Gentschev, A. Szalay, ***A.Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins***, Nature Biotechnology, 22, 313–320, (2004).

[37] M. Arakawa, K. Sugiura, H. C. Reilly, C. C. Stock, ***Oncolytic effect of Proteus mirabilis upon tumor- bearing animals. II. Effect on transplantable mouse and rat tumors***, Gann, 59, 117–122, (1968).

[38] R. C. Parker, H. C. Plummer, C. O. Siebenmann, M. G. Chapman, ***Effect of histolyticus infection and toxin on transplantable mouse tumors,*** Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 66, 461–467, (1947).

[39] Y. Kohwi, K. Imai, Z. Tamura, Y. Hashimoto, ***Antitumor effect of Bifidobacterium infantis in mice***, Gann, 69, 613–618, (1978).

[40] C. Maletzki, M. Linnebacher, B. Kreikemeyer, J. Emmrich, ***Pancreatic cancer regression by enteriditis injection of live Streptococcus pyogenes in a syngeneic mouse model,*** Gut, 57, 483–491, (2008).

[41] P. K. Bhatnagar, A. Awasthi, J. F. Nomellini, J. Smit, M. R. Suresh, ***Anti-tumor effects of the bacterium caulobacter crescentus in murine tumor models,*** Cancer Biology and Therapy, 5, 485–491, (2006).

[42] ***Bacteria are the optimal robot factory cancer therapies, Nature Cancer Reviews,*** Adres: http://www.nature.com/nrc/journal/v10/n11/fig_tab/nrc2934_F1.html , Erişim tarihi 29 Mart 2017, (2010)

[43] ***Synchronising Salmonella's infection strategy, Food Safety Centre Norwich***, Adres: http://foodsafety.ifr.ac.uk/synchronising-salmonellas-infection-strategy/ , Erişim tarihi 1 Nisan 2017, (2017).

[44] R. A. Giannella, S. B. Formal, G. J. Dammin, et al,. ***Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion, and morphologic reaction in the rabbit ileum***, J Clin Invest, 52-441, (1973).

[45] R. A. Giannella, ***Salmonella***, Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX), (1996).

[46] N. S. Forbes, L. L. Munn, D. Fukumura, R. K. Jain, ***Sparse initial enteriditis of systemically injected Salmonella typhimurium leads to heterogeneous accumulation within tumors***, Cancer Research, 63, 5188–5193, (2003).

[47] C. H. Lee, C. L. Wu, A. L. Shiau, ***Salmonella choleraesuis as an anticancer agent in a syngeneic model of orthotopic hepatocellular carcinoma***, Enteriditis Journal of Cancer, 122, 930–935, (2008).

[48] J. F. Toso, V. J. Gill, P. Hwu, F. M. Marincola, N. P. Restifo, ***Phase I study of the enteriditis administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma***, Journal of Clinical Oncology, 20, 142–152, (2002).

[49] D. H. Thamm, I. D. Kurzman, I. King, Z. Li, M. Sznol, R. R. Dubielzig, E. G. MacEwen, ***Systemic administration of an attenuated, tumor-targeting Salmonella typhimurium to dogs with spontaneous neoplasia: Phase I evaluation, Clinical Cancer Research***, 11, 4827–4834, (2005).

[50] G. Chen, D. P. Wei, L. J. Jia, B. Tang, L. Shu, K. Zhang, Q. G. Hu, ***Oral delivery of tumor-targeting Salmonella exhibits promising therapeutic efficacy and low toxicity***, Cancer Science, 100, 2437–2443, (2009).

[51] R. M. Ryan, J. Green, P. J. Williams, S. Tazzyman, S. Hunt, J. H. Harmey, C. E. Lewis, ***Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors***, Gene Therapy, 16, 329–339, (2009).

[52] B. A. Feltis, J. S. Miller, D. A. Sahar, A. S. Kim, D. A. Saltzman, A. S. Leonard, T. D. Sielaff, ***Liver and circulating NK1.1+CD3- cells are increased in infection with attenuated Salmonella typhimurium and are associated with reduced tumor in murine liver cancer***, Journal of Surgical Research, 107, 101–107, (2002).

[53] S. Weiss, T. Chakraborty, ***Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers***, Current Opinion in Biotechnology, 12, 467–472, (2001).

[54] L. Zhang, L. Gao, L. Zhao, B. Guo, K. Ji, Y. Tian, D. J. Kopecko, ***Enteriditis delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated Salmonella enteriditis serovar typhimurium carrying plasmid-based small enteriditis RNAs***, Cancer Research, 67, 5859–5864, (2007).

[55] F. Friedlos, P. Lehouritis, L. Ogilvie, D. Hedley, L. Davies, D. Bermudes, C. J. Springer, ***Attenuated Salmonella targets prodrug activating enzyme carboxypeptidase G2 to mouse melanoma and human breast and colon carcinomas for effective suicide gene therapy***, Clinical Cancer Research, 14, 4259–4266, (2008).

[56] Y. Paterson, P. C. Maciag, ***Listeria-based vaccines for cancer treatment.*** Current opinion in molecular therapeutics, 7, 5, 454-460, (2005).

[57] ***Infectious disease: Listeria does it again, Nature: News and Views,*** Adres: http://www.nature.com/nature/journal/v464/n7292/full/4641138a.html , Erişim tarihi 29 Mart 2017, (2010).

[58] R. Schafer, D.A. Portnoy, S.A. Brassell, Y. Paterson, ***Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant Listeria monocytogenes vaccine***, Journal of Immunology, 149, 53–59, (1992).

[59] R. Singh, Y. Paterson, ***Immunoediting sculpts tumor epitopes during immunotherapy***. Cancer research, 67, 5, 1887-1892, (2007).

[60] M. M. Seavey, Z. K. Pan, P. C. Maciag, A. Wallecha, S. Rivera, Y. Paterson, V. Shahabi, ***A novel human Her-2/neu chimeric molecule expressed by Listeria monocytogenes can elicit potent HLA-A2 restricted CD8-positive T cell responses and impact the growth and spread of Her-2/neu-positive breast tumors***, Clinical Cancer Research, 15, 3, 924-932, (2009).

[61] S. Pilgrim, J. Stritzker, C. Schoen, A. Kolb-Mäurer, G. Geginat, M. J. Loessner, W. Goebel, ***Bactofection of mammalian cells by Listeria monocytogenes: improvement and mechanism of DNA delivery***. Gene therapy, 10, 24, 2036-2045, (2003).

[62] A. C. Yu, J. F. Loo, S. Yu, S. K. Kong, T. F. Chan, ***Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique***, Appl Microbiol Biotechnol., 98 (2), 855–862, (2014).

[63] R. Bentley, R. Meganathan, ***Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria***. Microbiological Reviews. 46 (3): 241–80, (1982).

[64] G. Reid, J. Howard, B. S. Gan, ***Can bacterial enteriditis prevent infection?,*** Trends in Microbiology. 9 (9): 424–428, (2001).

[65] A. Y. Yong, S. Shabahang, T. M. Timiryasova, Q. Zhang, R. Beltz, I. Gentschev, R. Goebel, A. A. Szalay, ***Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins***, Nature biotechnology, 22, 3 , 313-320, (2004).

[66] S. Weibel, J. Stritzker, M. Eck, W. Goebel, A. A. Szalay, ***Colonization of experimental murine breast tumours by Escherichia coli K‐12 significantly alters the tumour microenvironment***, Cellular microbiology, 10, 6, 1235-1248, (2008).

[67] ***Bentley Group, The Maryland Biochip Collaborative,*** Adres: http://www.biochip.umd.edu/bentley/ , Erişim tarihi 22 Mart 2017, (2009).

[68] J. Stritzker, S. Weibel, P. J. Hill, T. A. Oelschlaeger, W. Goebel, A. A. Szalay, ***Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in live mice***, Enteriditis journal of medical microbiology, 297, 3, 151-162, (2007).

[69] S. N. Jiang, T. X. Phan, T. K. Nam, V. H. Nguyen, H. S. Kim, H. S. Bom, H. E. Choy, Y. Hong, J. J. Min, ***Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by a Combination of Escherichia coli–mediated Cytolytic Therapy and Radiotherapy***. Molecular Therapy, 18, 3, 635-642, (2010).

[70] H. Y. Zhang, J. H. Man, B. Liang, T. Zhou, C. H. Wang, T. Li, H. Y. Li, W. H. Li, B. F. Jin, P. J. Zhang, J. Zhao, X. Pan, K. He, W. L. Gong, X. M. Zhang, A. L. Li, ***Tumor-targeted delivery of biologically active TRAIL protein, Cancer gene therapy***, 17, 5, 334-343, (2010).

[71] A. Maczulak, ***Clostridium***, Encyclopedia of Microbiology, Facts on File, 168–173, (2011).

[72] ***Clostridium difficile, Specjalist Gabinet Lekarski Marek Wozniak,*** Adres: http://marekwozniak.com.pl/2013/11/clostridium-difficile/ , Erişim tarihi 12 Mart 2017, (2013).

[73] S. P. Borriello, ***Clostridial Disease of the Gut***, Clinical Infectious Diseases, 20 (Supplement 2), 242, (1995).

[74] R. A. Malmgren, C. C. Flanigan, ***Localization of the vegetative form of Clostridium tetani in mouse tumors following enteriditis spore administration***, Cancer research, 15(7), 473-478, (1955).

[75] A. T. St Jean, M. Zhang, N. S. Forbes, ***Bacterial therapies: completing the cancer treatment toolbox***. Current opinion in biotechnology, 19(5), 511-517, (2008).

[76] R. W. Carey, J. F. Holland, H. Y. Whang, E. Neter, B. Bryant, ***Clostridial oncolysis in man***, European Journal of Cancer (1965), 3(1), 37-46, (1967).

[77] C. Bettegowda, X. Huang, J. Lin, I. Cheong, M. Kohli, S. A. Szabo, K. W. Kinzler, ***The genome and transcriptomes of the anti-tumor agent Clostridium novyi-NT***, Nature biotechnology, 24(12), 1573-1580, (2006).

[78] J. Theys, W. Landuyt, S. Nuyts, L. Van Mellaert, A. Van Oosterom, P. Lambin, J. AnneÂ, ***Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by***. Cancer gene therapy, 8, 4, 294-297, (2001).

[79] L. H. Dang, C. Bettegowda, N. Agrawal, I. Cheong, D. Huso, P. Frost, A. B. Smith, ***Targeting vascular and avascular compartments of tumors with C. novyi-NT and anti-microtubule agents***, Cancer biology & therapy, 3, 3, 326-337, (2004).

[80] C. Bettegowda, L. H. Dang, R. Abrams, D. L. Huso, L. Dillehay, I. Cheong, K. S. Lin, ***Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria***, Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, 25, 15083-15088, (2003).

[81] J. Nemunaitis, C. Cunningham, N. Senzer, J. Kuhn, J. Cramm, C. Litz, M. Sznol, ***Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients***, Cancer gene therapy, 10, 10, 737-744, (2003).

[82] J. Theys, O. Pennington, L. Dubois, G. Anlezark, T. Vaughan, A. Mengesha, B. G. Wouters, ***Repeated cycles of Clostridium-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects in vivo***, British journal of cancer, 95, 9, 1212-1219, (2006).

[83] G. L. Semenza, ***HIF-1, O 2, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus***. Cell, 107, 1, 1-3, (2001).

[84] L. Palma, D. Muñoz, C. Berry, J. Murillo, P. Caballero, ***Bacillus thuringiensis Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity.*** Toxins, 6 (12), 3296–3325, (2014).

[85] R. Wong, ***Bacillus thuringiensis parasporal proteins and their effect on human cancer cells: An overview***. IeJSME 2010: 4(2): 3-9, (2010).

[86] ***Bacillus thuringiensis, bio-pesticide, Cornell University College of Agriculture and Life Sciences Biological Control Guide,*** Adres: https://biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/bacillus.php , Erişim tarihi 23 Mart 2017, (2015).

[87] S. Yamashita, H. Katayama, H. Saitoh, T. Akao, Y. S. Park, E. Mizuki, et al. ***Typical three-domain cry proteins of Bacillus thuringiensis strain A1462 exhibit cytocidal activity on limited human cancer cells***. *Journal of Biochemistry*, *138*(6), 663–672, (2005).

[88] R. S. Wong, S. M. Mohamed, V. D. Nadarajah, I. A. T. Tengku, ***Characterisation of the Binding Properties of Bacillus Thuringiensis 18 Toxin on Leukaemic Cells.*** Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 29(1), 86, (2010).

[89] H. Katayama, Y. Kusaka, H. Yokota, T. Akao, M. Kojima, O. Nakamura, et al. ***Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from Bacillus thuringiensis, induces Ca2+ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca2+ concentration in toxin-sensitive cells.*** Journal of Biological Chemistry, 282 (10), 7742–7752, (2007).

[90] A. Ito, Y. Sasaguri, S. Kitada, Y. Kusaka, K. Kuwano, K. Masutomi, *et al., **A Bacillus thuringiensis crystal protein with selective cytocidal action to human cells***. Journal of Biological Chemistry, 279 (20): 21282-21286, (2004).

[91] S. Okumura, H. Saitoh, T. Ishikawa, K. Inouye, E. Mizuki, ***Mode of action of parasporin-4, a cytocidal protein from Bacillus thuringiensis.*** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes,1808 (6), 1476-1482 (2011).

[92] Y. Nagamatsu, S. Okamura, H. Saitou, T. Akao, E. Mizuki, ***Three Cry toxins in two types from Bacillus thuringiensis strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells.*** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74(3): 494-498 (2009).

[93] T. A. Jackson, ***Environmental Safety of Inundative Application of a Naturally Occurring Biocontrol Agent, Serratia entomophila***. In Environmental Impacts of Microbial Insecticides (pp. 169–176). Dordrecht: Springer Netherlands, (2003).

[94] ***Serratia Marcescens Biofilm, University of Pittsburgh Molecular Virology and Microbiology,*** Adres: http://www.mvm.pitt.edu/node/593 , Erişim tarihi 18 Mart 2017, (2017).

[95] T.A. Jackson, J.F. Pearson, M. O'Callaghan, H.K. Mahanty, M. Willocks, ***Pathogen to product – development of Serratia entomophila (Enteriditis) as a commercial biological control agent for the New Zealand grass grub (Costelytra zealandica).*** In Use of Pathogens in Scarab Pest Management (Eds T. A. Jackson & T. R. Glare), Enteriditis Ltd., Andover. Pp. 191-198, (1992).

[96] ***Strategies in Tumor Targeting Therapy, Spandidos Publications,*** Adres: https://www.spandidos-publications.com/article_images/ol/8/6/OL-08-06-2359-g00.jpg , Erişim tarihi 19 Mart 2017, (2014).

[97] J. F. Toso, V. I. Gill, P. Hwu, et al. ***Phase I study of the enteriditis administration of attenuated salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma***. Journal of Clinical Oncology, 20, 142–152, (2002).

[98] D. M. Heimann, S. A. Rosenberg, ***Continuous enteriditis administration of live genetically modified salmonella typhimurium in patients with metastatic melanoma***. Journal of Immunotherapy, 26 (2), 179–180, (2003).

[99] J. Nemunaitis, C. Cunningham, N. Senzer, J. Kuhn, J. Cramm, C. Litz, et al. ***Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients.*** Cancer Gene Therapy, 10 (10), 737–744, (2003).

[100] R. K. Puri, ***Development of a recombinant enteriditis-4-Pseudomonas exotoxin for therapy of glioblastoma***. Toxicologic Pathology, 27 (1), 53–57, (1999).

[101] D. Fan, S. Yano, H. Shinohara, C. Solorzano, M. Van Arsdall, C. D. Bucana, et al. ***Targeted Therapy against Human Lung Cancer in Nude Mice by High-Affinity Recombinant Antimesothelin Single-Chain Fv Immunotoxin***, Molecular Cancer Therapeutics, 1 (8), 595–600, (2002).

[102] R. W. Carey, J. F. Holland, H. Y. Whang, E. Neter, B. Bryant, ***Clostridial oncolysis in man***. Eur. J. Cancer 3, 37–46 (1967).

[103] N. Hagihara, S. Walbridge, A. W. Olson, E. H. Oldfield, R. J. Youle, ***Vascular Protection by Chloroquine during Brain Tumor Therapy with Tf-CRM107***. Cancer Research, 60 (2), 230–234, (2000).

[104] S. Elmore, ***Apoptosis: a review of programmed cell death.*** Toxicologic Pathology, 35(4), 495–516, (2007).

[105] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, ***Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics***. British Journal of Cancer, 26(4), 239–257, (1972).

[106] H. R. Horvitz, ***Genetic control of programmed cell death in the nematode Caenorhabditis elegans***. Cancer Research, 59 (7 Suppl), 1701–1706, (1999).

[107] C. J. Norbury, I. D. Hickson, ***Cellular responses to DNA damage.*** Annu Rev Pharmacol Toxicol.; 41, 367-401, (2001).

[108] H. Grassme, V. Jendrossek, E. Gulbins, ***Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis.*** Apoptosis, 6(6), 441–445, (2001).

[109] I. Schmitz , S. Kirchhoff, P. H**.** Krammer, ***Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways.*** Int J Biochem Cell Biol, 32: 1123–1136, (2000).

[110] G. Kroemer, B. Dallaporta, M. Resche-Rigon, ***The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.*** Annu Rev Physiol, 60: 619–642, (1998).

[111] H. Zou, W. J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, X. Wang, ***Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. elegans CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3.*** Cell, 90 (3): 405–413, (1997).

[112] K. Newton, A. Strasser, ***Cell death control in lymphocytes***. Advances in Immunology, 76 :179-226, (2000).

[113] J. C. Reed, ***Bcl-2 family proteins***. Oncogene, 17: 3225–3236, (1998).

[114] J. E. Galán, ***Molecular genetic bases of Salmonella enteriditis into host cells.*** Molecular Microbiology, 20(2), 263–271, (1996).

[115] D. Hersh, D. M. Monack, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow, A. Zychlinsky, ***The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1.*** Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(5), 2396–2401, (1999).

[116] Monack, D. M., D. Hersh, N. Ghori, D. Bouley, A. Zychlinsky, S. Falkow, ***Salmonella Exploits Caspase-1 to Colonize Peyer's Patches in a Murine Typhoid Model.*** Journal of Experimental Medicine, 192(2), 249–258, (2000).

[117] H. Hilbi, J. E. Moss, D. Hersh, Y. Chen, J. Arondel, S. Banerjee, et al. ***Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB***. Journal of Biological Chemistry, 273(49), 32895–32900, (1998).

[118] L. H. Boise, C. M. Collins, ***Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death?*** Trends in Microbiology, 9(2), 64–67, (2001).

[119] K. Rolland, N. Lambert-Zechovsky, B. Picard, E. Denamur, ***Shigella and enteriditis Escherichia coli strains are derived from distinct ancestral strains of E. coli.*** Microbiology, 144(9), 2667–2672, (1998).

[120] J. M. Kim, L. Eckmann, T. C. Savidge, D. C. Lowe, T. Witthöft, M. F. Kagnoff, ***Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion.*** Journal of Clinical Investigation, 102(10), 1815–1823, (1998).

[121] A. Zychlinsky, M. C. Prevost, P. J. Sansonetti, ***Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages.*** 358(6382), 167–169, (1992).

[122] H. Hilbi, J. E. Moss, D. Hersh, Y. Chen, J. Arondel, S. Banerjee, et al. ***Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB.*** Journal of Biological Chemistry, 273(49), 32895–32900, (1998).

[123] N. Mantis, M. C. Prevost, P. Sansonetti, ***Analysis of epithelial cell stress response during infection by Shigella flexneri***. Infection and Immunity, 64(7), 2474–2482, (1996).

[124] A. Zychlinsky, P. J. Sansonetti, ***Apoptosis as a proinflammatory event: What can we learn from bacteria-induced cell death?*** Trends in Microbiology, 5(5), 201–204, (1997).

[125] A. Zychlinsky, C. Fitting, J. M. Cavaillon, P. J. Sansonetti, ***Enteriditis 1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by Shigella flexneri.*** Journal of Clinical Investigation, 94(3), 1328–1332, (1994).

[126] P. J. Sansonetti, J. Arondel, J. M. Cavaillon, M. Huerre, ***Role of enteriditis-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis.*** Journal of Clinical Investigation, 96(2), 884–892, (1995).

[127] R. Raqib, A. Gustafsson, J. Enteriditis, M. Bakhiet, ***A systemic downregulation of gamma enteriditis production is associated with acute shigellosis.*** Infection and Immunity, 65(12), 5338–5341, (1997).

[128] C. A. Guzmán, E. Domann, M. Ronde, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, et al. ***Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of Listeria monocytogenes.*** Molecular Microbiology, 20(1), 119–126, (1996).

[129] H. W. Rogers, M. P. Callery, B. Deck, E. R. Unanue, ***Listeria monocytogenes induces apoptosis of infected hepatocytes.*** The Journal of Immunology, 156(2), 679–684, (1996).

[130] J. C. Merrick, B. T. Edelson, V. Bhardwaj, P. E. Swanson, E. R. Unanue, ***Lymphocyte apoptosis during early phase of Listeria infection in mice***. The American Journal of Pathology, 151(3), 785–792, (1997).

[131] J. Arondel, M. Singer, A. Matsukawa, A. Zychlinsky, P. J. Sansonetti, ***Increased enteriditis-1 (IL-1) and imbalance between IL-1 and IL-1 receptor antagonist during acute inflammation in experimental Shigellosis.*** Infection and Immunity, 67(11), 6056–6066, (1999).

[132] J. Barsig, S. H. Kaufmann, ***The mechanism of cell death in Listeria monocytogenes-infected murine macrophages is distinct from apoptosis.*** Infection and Immunity, 65(10), 4075–4081, (1997).

[133] F. Proulx, E. G. Seidman, D. Karpman, (2001). ***Pathogenesis of Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome.*** Pediatric Research, 50(2), 163–171, (2001).

[134] M. T. Abreu, A. A. Palladino, E. T. Arnold, R. S. Kwon, J. A. McRoberts, ***Modulation of barrier function during Fas-mediated apoptosis in human intestinal epithelial cells.*** Gastroenterology, 119(6), 1524-1536, (2000).

[135] B. P. Hurley, C. M. Thorpe, D. W. K. Acheson, ***Shiga Toxin Translocation across Intestinal Epithelial Cells Is Enhanced by Neutrophil Transmigration. Infection and Immunity***, 69(10), 6148–6155, (2001).

[136] H. Li, H. Zhu, C. J. Xu, J. Yuan, ***Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis.*** Cell, 94(4), 491–501, (1998).

[137] J. S. Braun, R. Novak, K. H. Herzog, S. M. Bodner, J. L. Cleveland, E. I. Tuomanen, ***Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis.*** Nature Medicine, 5(3), 298–302, (1999).

[138] ***The missing piece of the puzzle,*** Adres: http://odec.ca/projects/2003/saade3s/public_html/8.jpg , Erişim tarihi 13 Mart 2017, (2014).

[139] ***Nucleofector™ Kits for Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), Lonza,*** http://http://www.lonza.com/~/media/Images/Products%20and%20Services/Bioresearch/Transfection/Primary%20Cells/MEF_01.ashx?h=181&w=266 , Erişim tarihi 12 Mart 2017, (2017).

[140] J. Jozefczuk, K. Drews, J. Adjaye, ***Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells.*** Journal of Visualized Experiments : JoVE, (64), e3854–e3854, (2012).

[141] D. A. Conner, ***Mouse embryonic stem (ES) cell isolation***. Current Protocols in Molecular Biology, 23-4, (2001).

[142] P. Romano, A. Manniello, O. Aresu, M. Armento, M. Cesaro, B. Parodi. ***Cell Line Data Base: structure and recent improvements towards molecular authentication of human cell lines***. Nucleic Acids Research, 37 (Database issue):D925-D932, (2009).

[143] ***T/G HA-VSMC (ATCC® CRL-1999™), ATCC,*** Adres: https://www.lgcstandards-atcc.org/~/media/Attachments/3/0/4/5/1840.ashx , Erişim tarihi 9 Mart 2017, (2016).

[144] R. Rahbari, T. Sheahan, V. Modes, P. Collier, C. Macfarlane, R. M. Badge, ***A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification.*** BioTechniques (Vol. 46, pp. 277–284), (2009)

[145] M. Saldov, H. Kakai, L. McLaughlin, A. Thomas, ***Cancer cells killed Henrietta Lacks–then made her immortal***. Journal of Cross-Cultural Gerontology, 13(3), 265–279, (1998).

[146] ***HeLa cells – The Story of Henrietta Lacks, Newbie Science,*** Adres: https://newbiescience.files.wordpress.com/2013/11/70261_420x315-cb1375994886.jpg , Erişim tarihi 11 Mart 2017, (2013).

[147] D. H. Geffen, ***The prevention of poliomyelitis***. Public Health, 68, 87–91, (1954).

[148] R. Skloot, ***The Immortal Life of Henrietta Lacks***. New York: Crown, (2009).

[149] K. R. Stone, D. D. Mickey, H. Wunderli, G. H. Mickey, D. F. Paulson***, Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).*** Enteriditis Journal of Cancer, 21(3), 274–281, (1978).

[150] ***DU 145 ATCC® HTB-81™ Homo sapiens prostate, ATCC,*** Adres: https://www.atcc.org/~/media/2BA99120922345B5871CAB3281A13340.ashx , Erişim tarihi 11 Mart 2017, (2016).

[151] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, ***A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma.*** JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 51(5), 1409–1416, (1973).

[152] A. V. Lee, S. Oesterreich, N. E. Davidson; ***MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years.*** J Natl Cancer Inst 2015; 107 (7), (2015).

[153] A. S. Levenson, V. C. Jordan, ***MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line***. Cancer research,57: 3071–3078, (1997).

[154] ***GenJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent for MCF-7 Cell, SignaGen Laboratories,*** Adres: http://signagen.com/images/GenJet_MCF7.jpg , Erişim tarihi 13 Mart 2017, (2017).

[155] D. Aksoy, E. Sen, ***Investigation of pathogenic phenotypes and virulence determinants of food-borne Salmonella enteriditis strains in Caenorhabditis elegans animal model***. Mikrobiyol Bul; 49(4): 513-24, (2015).

[156] S. Leschner, S. Weiss, ***Salmonella—allies in the fight against cancer.*** Journal of Molecular Medicine, 88(8), 763–773, (2010).

[157] S. Barbe, L. Van Mellaert, J. Anne, ***The use of clostridial spores for cancer treatment.*** J Appl Microbiol 101:571–578, (2006).

[158] W. Busch, ***Verhandlungen ärztlicher Gesellschaften***. Berliner Klinische Wochenschrift 187–189, (1868).

[159] W. B. Coley, ***The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893.*** Clin Orthop Relat Res 3–11, (1991).

[160] H. Akaza, ***BCG treatment of existing Ta, T1 tumours or carcinoma in situ of the bladder.*** Eur Urol 27(Suppl 1):9–12, (1995).

[161] T. T. Ching, A. L. Hsu, ***Solid Plate-based Dietary Restriction in Caenorhabditis elegans.*** Journal of Visualized Experiments, *JoVE*, (51), 2701, (2011).

[162] C. A. Peluffo, K. Irino, S. de Mello, ***Virulence in mice of epidemic strains of Salmonella typhimurium isolated from children***. Journal of Infectious Diseases, 143(3), 465-469, (1981).

[163] T. R. Sheen, M. O'callaghan, D. J. Smalley, C. W. Ronson, M. R. H. Hurst, ***Serratia entomophila bet gene induction and the impact of glycine betaine accumulation on desiccation tolerance***. Journal of applied microbiology, 114(2), 470-481, (2013).

[164] R. Hassankhani, M. R. Sam, M. Esmaeilou, P. Ahangar, ***Prodigiosin isolated from cell wall of Serratia marcescens alters expression of apoptosis-related genes and increases apoptosis in colorectal cancer cells.*** Medical Oncology, 32(1), 1-8 (2015).

[165] R. Kavitha, S. Aiswariya, C. M. Ratnavali, ***Anticancer activity of red pigment from Serratia marcescens in Human cervix carcinoma.*** Int J ChemTech Res, 2(1), 784-787, (2010).

[166] I. C. Diller, ***Degenerative changes induced in tumor cells by Serratia marcescens polysaccharide.*** Cancer Research, 7(10), 605-626, (1947).

[167] D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, ***Caspase functions in cell death and disease***. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 5(4), (2013).

[168] K. S. Putt, G. W. Chen, J. M. Pearson, J. S. Sandhorst, M. S. Hoagland, J. T. Kwon, D. R. Doerge, ***Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy.*** Nature Chemical Biology, 2(10), 543-550, (2006).

[169] Q. P. Peterson, D. R. Goode, D. C. West, R. C. Botham, P. J. Hergenrother, ***Preparation of the caspase-3/7 substrate Ac-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis***. Nature protocols, 5(2), 294-302, (2010).

[170] C. V. Srikanth, D. M. Wall, A. Maldonado-Contreras, et al. ***Salmonella pathogenesis and processing of secreted effectors by caspase-3.*** Science; 330(6002): 390-3, (2010).

[171] D. M. Wall, W. J. Nadeau, M. A. Pazos, H. N. Shi, E. E. Galyov, B. A. McCormick, ***Identification of the Salmonella enteriditis serotype typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium.*** Cell Microbiol, 9(9): 2299-313, (2007).

[172] S. Aydin, H. Geckil, E. Caylak, N. Kilic, ***Mikroorganizmaların kanser tedavisinde kullanımı.*** Fırat Tıp Dergisi, 9(2): 30-4 (2004).

[173] D. M. Wall, C. V. Srikanth, B. McCormick, A. ***Targeting tumors with Salmonella Typhimurium- potential for therapy.*** Oncotarget, 1(8): 721-8, (2010).

ÖZGEÇMİŞ

26.04.1985 tarihinde Edirne'de doğdum. İlköğretim ve ortaöğretimimi sırası ile Edirne Kurtuluş İkokulu, Edirne Anadolu Lisesi ve Edirne Süleyman Demirel Fen Lisesi'nde tamamladım. Lisans öğrenimimi aldığım Boğaziçi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 27 Haziran 2008'de mezun oldum. Yüksek lisans eğitimimi Sabancı Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik alanında yaparak 9 Ağustos 2011 yılında mezun oldum. Eylül 2011 yılından bu yana Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda ÖYP araştırma görevlisi olarak çalışmakta ve yine aynı tarihten itibaren Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji alanında doktora eğitimime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk annesiyim.

TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

‘‘Bakterilerin Antitümörojenik Aktivitesi’’ isimli doktora tez çalışmasından üretilen ‘‘***Gıda Kökenli Patojen Olmayan ve Patojenik Salmonella enteriditis Suşlarının Antitümörijenik Etkilerinin MEF, DU145 ve HeLa Hücre Kültürlerinde İncelenmesi***’’ adlı özgün çalışma SCI-EXP kapsamında taranan Mikrobiyoloji Bülteni’ne 10.02.2016 tarihinde gönderilip 24.05.2016 tarihinde basımı kabul edilmiş ve 2016 yılı 50. cilt 3. sayı’nın 382 ila 391 sayfaları arasında basılmıştır.*

Ayrıca tez çalışması kapsamında ÖYP bütçesi kullanılarak 25-26 Şubat 2014 tarihinde Amsterdam/HOLLANDA’daki ‘‘Agilent’s First European Animal and Plant Symposium’’ isimli sempozyumda ***Bacteria and Apoptosis*** adlı bir poster sunumu gerçekleştirilmiştir.**

* ALTINTAŞ KAZAR, G. & ŞEN, E. ***Gıda Kökenli Patojen Olmayan ve Patojenik Salmonella enteriditis Suşlarının Antitümörijenik Etkilerinin MEF, DU145 ve HeLa Hücre Kültürlerinde İncelenmesi.*** Mikrobiyoloji Bülteni 50(3):382-391, (2016). Doi No: 10.5578/mb.26554

** ALTINTAS KAZAR, Gamze. ***Bacteria and Apoptosis***. Poster sunumu: Agilent’s First Eyropean Animal and Plant Symposium. 2014 Şubat 25-26. Amsterdam/Hollanda.