

**AKCİĞER KANSERİNE KARŞI DNA AŞISININ GELİŞTİRİLMESİ VE FARELER
ÜZERİNDE TÜMÖRE KARŞI TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Ezgi DAĞ TAŞKESENLİGİL

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

2025

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
BİYOTEKNOLOJİ BİLİM DALI

**AKCİĞER KANSERİNE KARŞI DNA AŞISININ GELİŞTİRİLMESİ VE FARELER
ÜZERİNDE TÜMÖRE KARŞI TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

(Development of a DNA Vaccine Against Lung Cancer and Determination of Its Therapeutic
Effect on Tumors in Mice)

DOKTORA TEZİ

Ezgi DAĞ TAŞKESENLİGİL

Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

Erzurum

Haziran, 2025

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Ezgi DAĞ TAŞKESENİGİL tarafından hazırlanan “Akciğer Kanserine Karşı DNA Aşısının Geliştirilmesi ve Fareler Üzerinde Tümöre Karşı Tedavi Edici Etkisinin Belirlenmesi” başlıklı çalışması 13/06/2025 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Harun BUDAK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Danışman:	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Serkan YILDIRIM <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Adem KARA <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Yeliz DEMİR <i>Ardahan Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır.

Enstitü Yönetim Kurulunun
.... /.../.... tarih ve
sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Alper NUHOĞLU

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır.

Bu çalışma BAP (Doktora Tez Projesi ve Çok Disiplinli Araştırma Projesi) projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2022-10925 ve FCD-2024-12719

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak Doç. Dr. Yağmur ÜNVER danışmanlığında sunulan “Akciğer Kanserine Karşı Tedavi Edici DNA Aşısının Geliştirilmesi ve Fareler Üzerinde Tümöre Karşı Tedavi Edici Etkisinin Belirlenmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	2	30
Kuramsal Temeller	2	30
Materyal ve Metot	22	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	7	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	10	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Sunulan bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ettiğimizi beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Ezgi DAĞ TAŞKESENLİGİL	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER
16.06.2025	16.06.2025
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamda bana her konuda destek sağlayan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yağmur ÜNVER'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmam süresince bilgi ve birikimlerinden yararlandığım tez izleme komitesinde yer alan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Harun BUDAK'a ve Sayın Prof. Dr. Serkan YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda bilgi birikimlerinden, önerilerinden yaralandığım, hiçbir zaman yardımını ve desteklerini eksik etmeyen ekip arkadaşım Sayın Melek ACAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımı yürüttüğüm Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) bünyesinde çalışan hocalarıma, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kübra SOLAK'a aynı çalışma ortamını paylaştığım kıymetli arkadaşlarıma ve Sayın Nurgül ABUL'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, FDK-2022-10925 ve FCD-2024-12719 numaralı Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) kapsamında yapılmıştır. Aynı zamanda TÜBİTAK 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ve YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı kapsamında desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na ve Yükseköğretim Kurulu (YÖK)'na teşekkür ederim.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan değerli aileme ve tez çalışmalarım boyunca bana her zaman destek olan sevgili eşime teşekkür ederim.

Doktora tezim süresince yeterince vakit ayıramadığım ve en güzel anlarını kaçırdığım hayatımın anlamı olan oğluma minnettarım. Tezimi oğluma ve tüm kanser hastalarına ithaf ediyorum.

Ezgi DAĞ TAŞKESENLİGİL

ÖZET

DOKTORA TEZİ

AKCİĞER KANSERİNE KARŞI DNA AŞISININ GELİŞTİRİLMESİ VE FARELER ÜZERİNDE TÜMÖRE KARŞI TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Ezgi DAĞ TAŞKESENLİGİL

Danışman: Doç. Dr. Yağmur ÜNVER

Amaç: Bu tez çalışmasında, akciğer kanserine karşı kullanılabilecek DNA aşı adaylarının elde edilmesi ve bu aşı adaylarının sinjenik tümör modeli oluşturulan C57BL/6 farelerinde tedavi edici etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: pVAX1'e sırasıyla GM-CSF, CTLA-4 ve Muc1 VNTR nükleotid dizilerinin ardışık olarak *E. coli* JM109 hücrelerinde klonlanmasıyla üç farklı rekombinant DNA (pVAX1-GMCSF, pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF) elde edilmiş ve doğrulama için koloni PCR ve dizi analizi kullanılmıştır. Elde edilen rekombinant DNA'lar CHO hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle aktarılmış, GM-CSF proteini Western blotlama, CTLA-4 proteini ise gümüş boyama yöntemi ile tespit edilmiştir. LLC1 (Lewis lung carcinoma) hücre hattıyla tümör modeli oluşturulan C57BL/6 fareleri üzerinde dört grup (kontrol, pVAX1(sham), pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF) aşı ile aşılama protokolü oluşturulmuş ve her gruba üç doz aşı uygulanmıştır. 30 gün boyunca tümör progresyonu izlenmiştir. Çalışma sonunda farelerden alınan doku örnekleri histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Diğer yandan, DNA aşılarının immünojenik etkilerini değerlendirmek amacıyla aynı aşı grupları ile *in vivo* bağışıklama deneyi gerçekleştirilmiş, aşılama sonrası özgül antikor yanıtı ELISA ile analiz edilmiştir. Çalışma sonunda farelerden alınan doku örnekleri histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Klonlama çalışmaları sonucunda elde edilen rekombinant DNA'lar (pVAX1-GMCSF, pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF) elde edilmiştir. Diğer yandan, GM-CSF ve CTLA-4 proteinlerinin CHO hücreleri tarafından ifade edildiği belirlenmiştir. Tümör modeli oluşturulan farelerde pVAX1-CTLA4-GMCSF aşısının pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF aşısına kıyasla tümör büyümesini yavaşlattığı gözlenmiştir. Gruplarda yer alan farelerden alınan doku örnekleri ile gerçekleştirilen histopatolojik ve immunohistokimyasal analizlerin bu bulguları desteklediği görülmüştür. Diğer yandan, yapılan *in vivo* bağışıklama deneyinde farelerde pVAX1-CTLA4-GMCSF aşısına karşı spesifik CTLA-4 antikorunun geliştiği doğrulanmış, alınan doku örneklerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal analizleri neticesinde normal histolojik görünüm gözlenmiştir.

Sonuç: pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF aşısının farelerde tümör büyümesini önlemede etkili olmadığı, buna karşılık pVAX1-CTLA4-GMCSF aşısının tümör büyümesini anlamlı şekilde azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF aşısının Muc1 VNTR'ye özgü antikor üretimini indüklemediği, pVAX1-CTLA4-GMCSF aşısının ise CTLA-4'e özgü antikor üretimini sağladığı görülmüştür. Aynı zamanda DNA aşılarının sağlıklı fareler üzerinde herhangi bir yan etki oluşturmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Muc1-VNTR, CTLA-4, GM-CSF, DNA aşısı, LLC1 hücre hattı, C57BL/6 fare

Haziran 2025, 156 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

DEVELOPMENT OF A DNA VACCINE AGAINST LUNG CANCER AND DETERMINATION OF ITS THERAPEUTIC EFFECT ON TUMORS IN MICE

Ezgi DAĞ TAŞKESENLİĞİL

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yağmur ÜNVER

Purpose: This thesis aims to identify DNA vaccine candidates for use against lung cancer, and to evaluate their therapeutic effects in C57BL/6 mice with a syngeneic tumour model.

Method: Three different recombinant DNAs (pVAX1-GMCSF, pVAX1-CTLA4-GMCSF and pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF) were obtained by cloning the GM-CSF, CTLA-4 and Muc1VNTR nucleotide sequences, respectively, into pVAX1 in *E. coli* JM109 cells. Colony PCR and sequence analysis were then used to confirm the results. These recombinant DNAs were then transferred to CHO cells via electroporation. GM-CSF protein was detected using Western blotting and CTLA-4 protein using silver staining. A vaccination protocol was established involving four groups of C57BL/6 mice (control, pVAX1 (sham), pVAX1-CTLA4-GMCSF and pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF), in which a tumour model was created using the LLC1 (Lewis lung carcinoma) cell line. Three doses of the vaccine were administered to each group. Tumour progression was monitored for 30 days. At the end of the study, tissue samples taken from the mice were evaluated histopathologically and immunohistochemically. To evaluate the immunogenic effects of the DNA vaccines, an in vivo immunisation experiment was performed with the same groups of vaccines, and the specific antibody response after vaccination was analysed using ELISA. At the end of the study, tissue samples taken from the mice were evaluated histopathologically and immunohistochemically.

Findings: Cloning studies resulted in the production of recombinant DNAs (pVAX1-GMCSF, pVAX1-CTLA4-GMCSF and pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF). It was also determined that GM-CSF and CTLA-4 proteins were expressed by CHO cells. In mice with tumour models, it was observed that the pVAX1-CTLA4-GMCSF vaccine slowed tumour growth more effectively than the pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF vaccine. Histopathological and immunohistochemical analyses of tissue samples taken from the mice supported these findings. In the in vivo immunisation experiment, it was confirmed that specific CTLA-4 antibodies developed in response to the pVAX1-CTLA4-GMCSF vaccine, and normal histological appearance was observed in the tissue samples analysed.

Results: It was determined that the pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF vaccine was ineffective in preventing tumour growth in mice, whereas the pVAX1-CTLA4-GMCSF vaccine significantly reduced tumour growth. Additionally, the pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF vaccine was found to not induce Muc1VNTR-specific antibody production, whereas the pVAX1-CTLA4-GMCSF vaccine was found to induce CTLA-4-specific antibody production. Furthermore, it was determined that the DNA vaccines did not cause any adverse reactions in healthy mice.

Keywords: MUC1-VNTR, CTLA-4, GM-CSF, DNA vaccine, LLC1 cell line, C57BL/6 mice

June 2025, 156 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xvi
GİRİŞ	1
KURAMSAL TEMELLER	5
Kanser ve Tedavi Yöntemleri	5
Nanoilaç taşıma sistemi.....	5
Moleküler hedefe yönelik tedavi	6
Fototermal tedavi	6
Bağışıklık tedavisi stratejileri (İmmünoterapi)	6
Aşılar	7
Kanser Aşılarının Tasarımı	16
Uygun antijen seçimi	16
Neoantijen aşılarının optimizasyonu	17
Adjuvanların rolü	17
Adjuvan Olarak GM-CSF	17
İmmün Kontrol Noktası İnhibitörü Olarak CTLA-4.....	19
Ortak Tümör İlişkili Antijen Olarak Muc-1 Proteini	21
Deney Hayvanlarının Temel ve Uygulamalı Bilimlerdeki Rolü	23
Hayvan modelleri ve insanlarla benzerlik	24
Hayvan modellerinin türleri	24
Herhangi bir hastalık için ilaç geliştirme süreci ve subkutan tümör modelleri	25
Biyoluminesans teknolojisi	29
Kanser Tedavisi için Fare Modellerinin Seçimi	29
Deney tasarımı	29

MATERYAL VE METOD	35
Kullanılan Cihazlar	35
Kullanılan Kimyasallar ve Kitler	35
Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponların Hazırlanması	36
Tasarlanan Primerler ve Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri	37
DNA Aşı Vektörü (pVAX1)	38
Kompetan <i>E. Coli</i> JM109 Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu	39
<i>E. coli</i> Hücrelerinden Plazmit İzolasyonu	40
GM-CSF Geninin Klonlanması	41
GM-CSF geninin PCR ile amplifikasyonu	41
PCR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ve fenol-kloroform ekstraksiyonu	42
Vektör DNA (pVAX1)'nın kesimi ve jelden ekstraksiyonu	43
Ligasyon reaksiyonu ve <i>E. coli</i> JM109 hücrelerinin transformasyonu	43
Kloni PCR	44
Muhtemel rekombinant plazmitlerin dizi analizi ile doğrulanması	44
CTLA-4 Geninin Klonlanması	45
CTLA-4 geninin PCR ile amplifikasyonu	45
PCR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ve fenol-kloroform ekstraksiyonu	45
Vektör DNA (pVAX1-GMCSF)'nın kesimi ve jelden ekstraksiyonu	46
Ligasyon reaksiyonu ve <i>E. coli</i> JM109 hücrelerinin transformasyonu	46
Kloni PCR	47
Muhtemel rekombinant vektörlerin dizi analizi ile doğrulanması	48
Muc1-VNTR Dizisinin Klonlanması	48
Muc1-VNTR dizisinin PCR ile amplifikasyonu	48
PCR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ve fenol-kloroform ekstraksiyonu	49
Vektör DNA (pVAX1-CTLA-4-GMCSF)'nın kesimi ve jelden ekstraksiyonu	49
Ligasyon reaksiyonu ve <i>E. coli</i> JM109 hücrelerinin transformasyonu	50
Kloni PCR	50
Muhtemel rekombinant vektörlerin dizi analizi ile doğrulanması	51
CHO (Çin Hamster Ovaryumu) Hücre Hattının Kültürü	51
Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon Etkinliğinin Belirlenmesi	51
Akış sitometri analizi	54

CHO Hücrelerine pVAX1-GMCSF'nin Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyonu	54
Western blot analizi	55
SDS-PAGE jelinde proteinlerin yürütülmesi	55
Gümüş Boyama	56
In vivo Tümör Tedavisi	59
In vivo tümör tedavi deneyinin histopatolojik analizi	60
In vivo Bağışıklama Deneyi	62
In vivo bağışıklama deneyinin histopatolojik analizi	63
ELISA analizi	63
ARAŞTIRMA BULGULARI	66
E. coli JM109 Hücrelerinin Transformasyonu ve Plazmit İzolasyonu	66
GM-CSF Geninin Klonlanması	66
GM-CSF geninin gradyan PCR ile amplifikasyonu	66
GM-CSF geninin ve pVAX1'in endonükleaz enzimleriyle kesilmesi	67
E. coli JM109 hücrelerinin transformasyonu	67
Geni taşıyan transformantların belirlenmesi	68
Muhtemel rekombinant plazmitlerin dizi analizi	69
CTLA-4 Geninin Klonlanması	71
CTLA-4 geninin gradyan PCR ile amplifikasyonu	71
CTLA-4 geninin ve pVAX1-GMCSF'nin endonükleaz enzimleriyle kesilmesi ve görüntülenmesi	72
E. coli JM109 hücrelerinin transformasyonu	72
Geni taşıyan transformantların belirlenmesi	73
Muhtemel rekombinant plazmitin dizi analizi	74
Muc1-VNTR Dizisinin Klonlanması	77
Muc1-VNTR dizisinin gradyan PCR ile amplifikasyonu	77
Muc1-VNTR peptit dizisinin ve pVAX1-CTLA4-GMCSF'nin endonükleaz enzimleriyle kesilmesi ve görüntülenmesi	77
E. coli JM109 hücrelerinin transformasyonu	77
Geni taşıyan transformantların belirlenmesi	78
Muc1-VNTR dizisine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR	78
Muhtemel rekombinant plazmitlerin dizi analizi	80
Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon Etkinliğinin Belirlenmesi	81
Akış sitometri analiz sonuçları	81

pVAX1-GMCSF'nin CHO Hücrelerine Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyonu	83
Western blot analizi sonucu	83
Gümüş boyama sonucu	84
<i>In vivo</i> Tümör Tedavisi	85
<i>In vivo</i> tümör tedavi deneyinin histopatolojik analiz sonuçları	88
<i>In vivo</i> Bağışıklama Deneyi.....	103
<i>In vivo</i> bağışıklama deneyinin histopatolojik analiz sonuçları	104
TARTIŞMA SONUÇ.....	106
KAYNAKLAR.....	116
ÖZGEÇMİŞ.....	134



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Cihazların İsimleri, Marka ve Model Bilgileri	35
Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Kitler	35
Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponların Hazırlanışı	36
Tablo 4. Tasarlanan Primerler	37
Tablo 5. pVAX1'e Ait Primerler	38
Tablo 6. Kesim Enzimlerinin Tanıma Dizileri	38
Tablo 7. GM-CSF Geninin Gradyan PCR ile Amplifikasyonu	41
Tablo 8. Gradyan PCR Şartları.....	41
Tablo 9. PCR Ürünü Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	42
Tablo 10. Vektör DNA Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği.....	43
Tablo 11. Ligasyon Reaksiyonu	43
Tablo 12. Koloni PCR için Reaksiyon Karışım İçeriği.....	44
Tablo 13. PCR Şartları	44
Tablo 14. CTLA-4 Geninin Gradyan PCR ile Amplifikasyonu	45
Tablo 15. Gradyan PCR Şartları.....	45
Tablo 16. PCR Ürünü Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	46
Tablo 17. Vektör DNA Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği.....	46
Tablo 18. Ligasyon Reaksiyonu	47
Tablo 19. Koloni PCR için Reaksiyon Karışım İçeriği.....	47
Tablo 20. PCR Şartları	47
Tablo 21. Muc1-VNTR Dizisinin Gradyan PCR ile Amplifikasyonu	48
Tablo 22. Gradyan PCR Şartları.....	48
Tablo 23. PCR Ürünü Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği	49
Tablo 24. Vektör DNA Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği.....	49
Tablo 25. Ligasyon Reaksiyonu	50
Tablo 26. Koloni PCR için Reaksiyon Karışım İçeriği.....	51
Tablo 27. PCR Şartları	51
Tablo 28. Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon İçin 1. Optimizasyon Şartları	53
Tablo 29. Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon İçin 2. Optimizasyon Şartları	53
Tablo 30. Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon İçin 3. Optimizasyon Şartları	53
Tablo 31: SDS Jelinin Hazırlanması	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. DNA aşısının hümmoral ve hücreseľ bağışıklığı uyarması	12
Şekil 2. GM-CSF'nin dentritik hücre olgunlaşmasını ve efektör T hücre aktivasyonunu uyarması	18
Şekil 3. CTLA-4 ve T hücre arasındaki ilişki; a) T hücre inaktivasyonu, b) T hücre aktivasyonu	20
Şekil 4. Normal musin-1 ve tümör ilişkili musin-1 proteininin farklılıkları	22
Şekil 5. Klinik öncesi kanser ilacı geliştirme	25
Şekil 6. Subkutan modellerin farklı tipleri	27
Şekil 7. pVAX1 haritası.....	39
Şekil 8. KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş. Yerel Etik Kurulu başvuru onay belgesi	58
Şekil 9. Tümör tedavi deneyi için gruplarının oluşturulması	59
Şekil 10. Tümör tedavi deneyi; a) Tümör tedavi deneyi için grupların oluşturulması ve aşılama takvimi, b) Tümör tedavi deneyi süresince yapılan uygulamalar.....	60
Şekil 11. Bağışıklama deneyi için gruplarının oluşturulması	62
Şekil 12. Bağışıklama deneyi; a) Bağışıklama deneyi için grupların oluşturulması ve aşılama takvimi, b) Bağışıklama deneyi süresince yapılan uygulamalar	63
Şekil 13. İzole edilen plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü	66
Şekil 14. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	67
Şekil 15. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri	67
Şekil 16. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	68
Şekil 17. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	69
Şekil 18. Vektör DNA'ya ait primerler ile gerçekleştirilen Sanger dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisinin blast sonucu (Query: NCBI'dan referans alınan dizi, Sbjct: Sanger analizi sonucu elde edilen dizi)	70
Şekil 19. pVAX1-GMCSF'nin SnapGene'de çizilen haritası.....	70
Şekil 20. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	71
Şekil 21. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	72
Şekil 22. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri	73
Şekil 23. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	73
Şekil 24. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	74

Şekil 25. Vektör DNA'ya ait primerler ile gerçekleştirilen Sanger dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin blast sonucu (Query: NCBI'dan referans alınan dizi, Sbjct: Sanger analizi sonucu elde edilen dizi)	75
Şekil 26. F-2A'ya ait aminoasit dizisi ve bu aminoasitleri şifreleyen kodonlar	76
Şekil 27. pVAX1-CTLA4-GMCSF'nin SnapGene'de çizilen haritası	76
Şekil 28. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	77
Şekil 29. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri	78
Şekil 30. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	78
Şekil 31. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	79
Şekil 32. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	80
Şekil 33. Vektör DNA'ya ait primerler ile gerçekleştirilen Sanger dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin blast sonucu (Query: NCBI'dan referans alınan dizi, Sbjct: Sanger analizi sonucu elde edilen dizi)	80
Şekil 34. pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF'nin SnapGene'de çizilen haritası	81
Şekil 35. Akış sitometri sonuçları 1	82
Şekil 36. Akış sitometri sonuçları 2	83
Şekil 37. GM-CSF proteininin western blot görüntüsü	84
Şekil 38: GM-CSF ve CTLA-4 proteinlerinin gümüş boyama görüntüsü	85
Şekil 39. Sinjenik tümör modeli oluşturulan farelere ait görüntüler	86
Şekil 40. Tümörlü fare modelinde pVCG ve pVMCG ile aşılama sonrası DNA aşılarının etkinliğini gösteren grafik	87
Şekil 41. Aşıların fare sağ kalımları üzerine etkisi. A) Farelerin sağ kalım grafiği, B) Farelerin sağ kalım görüntüsü.....	88
Şekil 42. Kontrol grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde düşük diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz ve hiperkromazi izlendi (H&E; a: 10X, b: 40X, Bar: 10 µm). 89	
Şekil 43. Sham grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde az diferansiyasyon, polimorfizm, şiddetli düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E; a: 10X, b: 40X, Bar: 10µm)......	89
Şekil 44. pVCG grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde iyi diferansiyasyon, polimorfizm, hafif düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10µm)......	90
Şekil 45. pVMCG grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz, hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10µm).	90

Şekil 46. Kontrol grubuna ait deri dokusunda kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10 μ m).	91
Şekil 47. Sham grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlenmiştir (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10 μ m).	91
Şekil 48. pVCG grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde orta düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10 μ m).....	92
Şekil 49. pVMCG grubuna ait deri dokusunda kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10 μ m).	92
Şekil 50. Deri dokusunda görülen histopatolojik ve immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel analiz verileri. Kanser hücrelerinde a. hiperkromazi (** p=0.0022), b. mitoz (** p=0.0022), c. polimorfizm (** p=0.0022), d. Ki67 ekspresyon seviyesi (** p=0.0022).	93
Şekil 51. Kontrol grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10 μ m).	94
Şekil 52. Sham grubuna ait akciğer dokusu, kanser hücrelerinde diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	94
Şekil 53. pVCG grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde; diferansiyasyon, polimorfizm, hafif düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	95
Şekil 54. pVMCG grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde; diferansiyasyon, polimorfizm, orta düzeyde mitoz, hiperkromaz ve damarlarda metastatik hücreler izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	95
Şekil 55. Kontrol grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde; şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	96
Şekil 56. Sham grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde, şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	96
Şekil 57. pVCG grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde, hafif düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	97
Şekil 58. pVMCG grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde, şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	97
Şekil 59. Akciğer dokusunda görülen histopatolojik ve immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel analiz verileri. Kanser hücrelerinde a. hiperkromazi (**	

p=0.0022), b. mitoz (** p=0.0022), c. polimorfizm (** p=0.0022), d. Ki67 ekspresyon seviyesi (** p=0.0022).	98
Şekil 60. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde diferansiyasyon, polimorfizm, şiddetli düzeyde mitoz, hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	99
Şekil 61. Sham grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde; az diferansiyasyon, polimorfizm, şiddetli düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	99
Şekil 62. pVCG grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde; iyi diferansiyasyon, polimorfizm, hafif düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	100
Şekil 63. pVMCG grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde; az diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).....	100
Şekil 64. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	101
Şekil 65. Sham grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	101
Şekil 66. pVCG grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde hafif düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	102
Şekil 67. pVMCG grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlendi (IHC-P, a: 10X, b: 40X, Bar: 10).	102
Şekil 68. Karaciğer dokusunda görülen histopatolojik ve İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel analiz verileri. Kanser hücrelerinde a: hiperkromazi (** p=0.0022), b: mitoz (** p=0.0022), c: polimorfizm (** p=0.0022), d: Ki67 ekspresyon seviyesi (** p=0.0022).	103
Şekil 69. CTLA-4 proteini için gerçekleştirilen ELISA analizi sonucu.....	104
Şekil 70. Normal histolojik görünüm izlendi (H&E, Bar:10µm). a: kontrol grubu, akciğer dokusu, b: kontrol grubu, karaciğer dokusu, c: sham grubu, akciğer dokusu, d: sham grubu, karaciğer dokusu, e: pVCG grubu, akciğer dokusu, f: pVCG grubu, karaciğer dokusu, g: pVMCG grubu, akciğer dokusu, h: pVMCG grubu, karaciğer dokusu	105
Şekil 71. Negatif Ki67 ekspresyonu ve normal histolojik görünüm izlendi (IHC-P, Bar:10µm) a: kontrol grubu, akciğer dokusu, b: kontrol grubu, karaciğer dokusu, c: sham grubu, akciğer dokusu, d: sham grubu, karaciğer dokusu, e: pVCG grubu, akciğer	

dokusu, f : pVCG grubu, karaciğer dokusu, g : pVMCG grubu, akciğer dokusu, h : pVMCG grubu, karaciğer dokusu	105
--	-----



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

Ad-hTERT	Onkolitik adenovirüs
AHT	Adaptif hücre transferi
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
ASH	Antijen sunan hücre
ASPIs	Androjen reseptörü sinyal yolu inhibitörleri
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BCG	Mycobacterium bovis bacillus Calmette–Guérin
bç	Baz çifti
BSA	Sığır serum albümini (Bovine serum albumin)
CAR-T	Kimerik antijen reseptörü T
CDX	Hücre hattı kaynaklı ksenogreftler
CHO	Çin hamster ovaryumu (Chinese hamster ovary)
CIAP	Buzağı bağırsak alkali fosfataz (calf İntestinal alkaline phosphatase)
c-Met	Hepatosit büyüme faktörü reseptörü ve
CMV	İnsan sitomegalovirüsü
CTL	Sitotoksik T lenfositlerini
CTLA-4	Sitotoksik T lenfosit antijeni
DH	Dentritik hücre
ddH ₂ O	Ultra saf su
dk.	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified eagle medyum
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
ECACC	Avrupa Doğrulanmış Hücre Kültürleri Koleksiyonu

EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent tahlili
FBS	Fetal sıgır serumu
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
GFP	Yeşil floresan protein
GM-CSF	Granülosit makrofaj uyarıcı faktör
HE	Hematoksilen-eozin
HF	Phusion High-Fidelity
HLA	İnsan lökosit antijeni
HRP	Horseradish peroksidaz
ICB	Bağıışıklık kontrol noktası blokaj
ICIs	Bağıışıklık kontrol noktası inhibitörleri
ICLAC	Uluslararası Hücre Hattı Doğrulama Komitesi
IFN- γ	İnterferon-gamma
LB	Luria Bertani
IL-2	İnterlökin-2
LLC1	Fare akciğer kanseri hücre hattı (Lewis lung carcinoma.)
LUAD	Akciğer adenokarsinomu
LunX	Akciğer spesifik X
mAb	Monoklonal antikor
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
Muc1	Müsin-1 protein
NFW	Nükleaz içermeyen su (Nüklease free water)
NLR	NOD benzeri reseptör
NOD/SCID	Nonobez diyabetik/ağır kombine immün yetmezlikli
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
OS	Genel sağkalım (overall survival)
OV	Onkolitik virüs
OVA	Ovalalbümin
RNA	Ribonükleik asit
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RLR	RIG-I benzeri reseptör

SCID	Ağır kombine immün yetmezlikli
SCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SLO	Sekonder lenfoid organ
S.O.C.	Katabolit baskılamalı süper ideal besiyeri (Super Optimal broth with Catabolite repression)
STR	Kısa tandem tekrar (short tandem repeats)
TAA	Tümörle ilişkili antijen (ing- t�rk�e9
TAE	Tris Asetik asit EDTA
TE	Tris EDTA
TBST	Tween-20 içeren tris tamponu
TCA	Trikloroasetik asit
TIL	Tümör infiltrasyonu yapan lenfosit
TLR	Toll benzeri reseptör
TME	Tümör mikroçevresini
THR	T hücre reseptörü
TSA	Tümör spesifik antijen
T-VEC	Talimogene laherparepvec
PAA	Poliamidoamin
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforez
PANVAC	Pankreas kanseri aşısı
PBS	Fosfat tampon �zeltisi (phosphate buffered saline)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PDX	Hasta kaynaklı ksenograft
PEG	Polietilen glikol
PER	Amonyum persülfat
PMSF	Fenilmetils�lfonil florür
PROTVAC	Prostat kanseri aşısı
PSCA	Prostat kök hücre antijeni (Prostat stem cell antigen)
PVDF	Polivinilidin diflorür
UV	Ultraviyole ışını
VEGFR2	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-2

VNTR

Değişken sayıdaki ardışık tekrar dizileri (Variable number tandem repeat)

Simgeler

%	Yüzde
A	Amper
aa	Aminoasit
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
g	g-kuvveti
gr	Gram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions Per Minute)
sn	Saniye
V	Volt

GİRİŞ

Kanser, farklı özelliklere sahip geniş bir kötü huylu tümör grubudur ve ölümcül sonuçlara yol açabilir. Gelişmiş ülkelerde yetişkinlerde en yaygın görülen kanser türleri arasında akciğer, kolorektal, meme, cilt melanomu ve prostat kanseri bulunmaktadır (Harding et al., 2018). Genel olarak, çocuklar ve ergenlerde kanser görülme sıklığı ve kanserden ölüm oranı oldukça düşüktür. Ancak bu oranlar, yetişkinlik döneminde yaş ilerledikçe katlanarak artar. Kanser görülme oranları ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir (F. B. Ahmad & Anderson, 2021). Başlıca risk faktörleri arasında sigara kullanımı, aşırı alkol tüketimi, sağlıksız beslenme, obezite, yetersiz fiziksel aktivite, enfeksiyon kaynaklı etkenler ve güneş ışınlarına uzun süre maruz kalma yer almaktadır (Smith et al., 2009). Meme, rahim ağzı, kolon ve rektum, akciğer ve prostat kanserlerinde erken teşhis, bir kişinin kanserden ölme olasılığını azaltabilir (Kiri & Ryba, 2024).

Kanser, teşhis ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen küresel ölçekte ciddi bir sağlık tehdidi olmaya devam etmektedir. Kanser görülme sıklığı dünya genelinde benzer eğilimler göstermektedir. 2020 yılında dünya genelinde 19 milyondan fazla kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümü bildirilmiştir (Ferlay et al., 2021). Önümüzdeki yıllarda, kanser vakalarının sayısında ciddi bir artış beklenmektedir. 2070 yılına kadar her yıl 34 milyondan fazla kanser vakasının teşhis edileceği tahmin edilmektedir. Özellikle düşük gelirli ülkelerin, önümüzdeki 50 yıl içinde orantısız şekilde etkilenecek kanser vakalarında %400'e varan artış yaşayacağı öngörülmektedir (Soerjomataram & Bray, 2021). Küresel ölçekte kanser vakalarında en büyük artışın akciğer, meme ve kolorektal kanser (CRC) türlerinde olacağı düşünülmektedir. Akciğer kanseri, günümüzde en yaygın kanser türü olup, 2035 yılına kadar vaka sayısının 3 milyona ulaşması beklenmektedir. Ayrıca, akciğer kanserine bağlı ölümlerin de dünya genelinde artacağı öngörülmektedir (Didkowska et al., 2016). Kanser vakalarındaki bu artış, kısmen dünya nüfusunun artışı, yaşam beklentisinin uzaması ve diyet değişiklikleri, tütün kullanımı gibi risk faktörlerinin yaygınlaşmasıyla ilişkilendirilmektedir (Didkowska et al., 2016; McCormack & Boffetta, 2011; Xi & Xu, 2021).

Kanserin tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik ilaçlar gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Hangi yöntemin tercih edileceği, kanserin tipi, yayılma durumu ve hastanın sağlık durumu gibi etkenlere bağlı olarak belirlenmektedir. Son 25 yılda tanı ve tedavi alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsada, akciğer kanseri hastalarının genel prognozu hâlâ arzu edilen düzeye ulaşmamıştır. Lokalize kanserler hariç,

standart tedavilere verilen yanıt genellikle yetersiz kalmaktadır. Bu bağlamda, alternatif bir yöntem olarak değerlendirilen kanser aşılı, son yıllarda büyük bir ilgi görmektedir (Hassan Lemjabbar-Alaouia et al., 2017).

Kanser aşılı geliştirme çalışmaları yaklaşık bir asırdır devam etmekle birlikte, bu aşılı bulaşıcı hastalıklara karşı geliştirilen aşılardan daha umut verici bulunmuştur. Bunun sebebi, bulaşıcı hastalık aşılılarının yalnızca hastalığın önlenmesine odaklanmasına karşın kanser aşılılarının hem önleyici hem de tedavi edici etkiler sunmayı hedeflemesidir. Günümüzdeki kanser aşısı araştırmaları, genellikle bilinen ya da potansiyel olarak keşfedilmemiş tümörle ilişkili antijenlerin hedeflenmesine odaklanmaktadır (Madan, Mohebtash, et al., 2012; Schlom, 2012; Thomas & Prendergast, 2016).

Bu tez çalışmasında, DNA aşılılarının sunduğu avantajlardan faydalanarak akciğer kanserinin tedavisi için iki farklı DNA aşısı geliştirilmesi amaçlandı. LLC1 fare akciğer kanseri hücre hattı kullanılarak oluşturulan sinjenik akciğer kanseri modeli taşıyan, bağışıklık sistemi baskılanmamış C57BL/6 erkek farelerde geliştirilen DNA aşılılarının tedavi edici etkisi araştırıldı.

Çalışmanın amacı doğrultusunda iki farklı DNA aşılı konstraktı hazırlandı:

1. pVAX1-CTLA4-GMCSF:

- Bu konstraktı elde etmek için pVAX1 kullanıldı.
- İlk olarak GM-CSF geni, pVAX1'e yerleştirildi ve rekombinant pVAX1-GMCSF elde edildi.
- Ardından, CTLA-4 geni ve bu genin aşağı akış (downstream) bölgesinde yer alan Furin-2A dizisi, GM-CSF geninin yukarı akış (upstream) bölgesine eklendi ve rekombinant pVAX1-CTLA4-GMCSF elde edildi.

2. pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF:

- Bu konstrakt, rekombinant pVAX1-CTLA4-GMCSF kullanılarak elde edildi.
- Muc1-VNTR dizisi ve bu dizinin aşağı akış (downstream) bölgesinde yer alan Furin-2A dizisi, CTLA-4 geninin yukarı akış (upstream) bölgesine eklendi ve rekombinant pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF elde edildi.

DNA aşılı konstraktlarının hazırlanmasının ardından yapılan çalışmalar:

1. Rekombinant protein ekspresyonu:

- pVAX1-GMCSF ve pVAX1-CTLA4-GMCSF CHO hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle transfer edildi.
- CHO hücrelerinde protein ekspresyonunu belirlemek için:
 - pVAX1-GMCSF tranfer edilen hücreler RIPA tampon ile lizise uğratarak proteinleri görüntülemek için western blot analizi yapıldı.
 - pVAX1-CTLA4-GMCSF transfer edilen hücreler de, RIPA tampon ile lizise uğratarak proteinleri görüntülemek için gümüş boyama yöntemi kullanıldı.

2. Tümör modeli oluşturulması ve tümör tedavisi:

- LLC1 fare akciğer kanseri hücre hattı kullanılarak C57BL/6 farelerinde sinjenik tümör modeli oluşturuldu.
- Tümör taşıyan fareler, DNA aşıları (pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF) ile 5'er gün aralıklarla 3 doz halinde aşılandı.
- Son aşılanmanın ardından 30 gün boyunca tümör boyutları, derinlik × genişlik × uzunluk ölçümleriyle haftada iki kez takip edildi.
- Ayrıca, hayvanlardan alınan çeşitli doku örneklerinin histopatolojik analizleri gerçekleştirildi.

3. Farelerin DNA aşıları ile bağışıklanması:

- Geliştirilen pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF aşılarının *in vivo* antikor üretimi uyarımını belirlemek için C57BL/6 farelere 1'er hafta arayla 3 doz halinde aşılama yapıldı.
- Aşılanan farelerde DNA aşılara karşı oluşan antikorlar, ELISA analizi ile tespit edildi.
- Ayrıca, hayvanlardan alınan çeşitli doku örneklerinin histopatolojik analizleri gerçekleştirildi

Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenen FDK-2022-10925 ve FCD-2024-12719 numaralı projeler kapsamında gerçekleştirilmiş olan bu tez çalışmasında akciğer kanserinin tedavisi için daha önce uygulanmamış bir DNA aşı kombinasyonu geliştirilmiştir. Çalışmanın özgün katkıları şunlardır:

1. CTLA-4 genini içeren bir DNA aşısı (pVAX1-CTLA4-GMCSF) ilk kez geliştirilmiştir.

2. GM-CSF, CTLA-4 genlerini ve Muc1-VNTR dizisini içeren DNA aşısı (pVAX-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF) ilk kez geliştirilmiştir.
3. Elde edilen DNA aşılarının, sinjenik akciğer kanseri modelinde tümörü tedavi edici etkisi ilk kez gösterilmiştir.



KURAMSAL TEMELLER

Kanser ve Tedavi Yöntemleri

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ve vücut içinde yayılma (metastaz) yeteneği ile tanımlanan bir grup hastalık için kullanılan genel bir terimdir (Henley & Dick, 2012).

Akciğer kanseri, dünya çapında en sık görülen kanser türlerinden biri olmakla birlikte akciğer kanserinde hem hastalığa yakalanma (morbidite) hem de hastalıktan kaynaklanan ölüm (mortalite) oranları oldukça yüksektir (Butterfield, 2015). Histolojik özelliklerine göre akciğer kanseri, iki ana gruba ayrılmaktadır: küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC). Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85-90'ını oluşturan NSCLC, en yaygın alt gruptur. Bu grup, akciğer adenokarsinomu (LUAD), skuamöz hücreli akciğer kanseri ve büyük hücreli akciğer kanseri gibi alt türleri içermektedir (Melief & van der Burg, 2008). Erken evre NSCLC (Evre I veya II) genellikle tümörün cerrahi olarak çıkarılmasını ve ardından adjuvan tedaviyi içeren bir yaklaşımla tedavi edilir. Ancak hastalık ilerleyip Evre III veya IV'e ulaştığında, tedavi çoğunlukla kemoterapi veya radyoterapiye yönelir (Hoption Cann et al., 2003; McCarthy, 2006). Bununla birlikte, standart kemoterapi ilaçlarının etkisi; özgül olmayan hedefleme, düşük biyoyararlanım ve ilaç direnci gibi faktörlerle sınırlı kalmaktadır (Ott & Wu, 2019). Günümüzde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahalenin sınırlamalarına alternatif olarak akciğer kanserini tedavici diğer yöntemler şu şekildedir;

Nanoilaç taşıma sistemi

Nanoilaç taşıma sistemi, kendine özgü özellikleri nedeniyle tedavi ajanlarını kapsüller ve bu sayede bu ajanların bozulmasını önleyerek antikanser ilaçları tümör bölgelerine hassas bir şekilde ulaştırır ve hedef dokuya verilen özgül olmayan zararı azaltarak antikanser etkinliği artırır (Ali et al., 2016; Ott & Wu, 2019; Soares et al., 2015). Nanotaşıyıcı bazlı ilaç taşıma, akciğer kanseri tedavisi için yeni bir stratejidir ve şu avantajları sağlar: vücutta ilaçların biyoyararlanımının artırılması, antikanser ilaçların belirli bir bölgeye özgül şekilde iletilmesi yoluyla güvenliğin artırılması ve hedefe yönelik ilaç taşıma sırasında ilaçların kontrollü ve sürdürülebilir salınımı, nihayetinde akciğer kanseri üzerindeki terapötik etkileri iyileştirir (Hollingsworth & Jansen, 2019; Kinkead et al., 2018). Nanotıp taşıma sistemi, yan etkileri olan klasik kemoterapi tedavisine alternatif bir seçenek sunar ve akciğer kanseri tedavisi alanında araştırılmaya değer umut verici bir yaklaşım olarak öne çıkar (Cheever et al., 2009; DeMaria & Bilusic, 2019).

Moleküler hedefe yönelik tedavi

Moleküler hedefe yönelik tedavi, NSCLC için önemli bir tedavi stratejisi haline gelmiştir (Madan, Bilusic, et al., 2012). Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), hepatosit büyüme faktörü reseptörü (c-Met) ve anaplastik lenfoma kinaz (ALK) gibi çeşitli reseptör tirozin kinazları hücre büyümesi ve hayatta kalması için önemli hedeflerdir ve moleküler hedefe yönelik tedavilerde kullanılır (Gulley et al., 2019). EGFR mutasyonu terapötik hedef olarak kullanılarak, gefitinib ve erlotinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri EGFR mutasyonlarını hedeflemek üzere geliştirilmiştir. Buna ek olarak, diğer hedefleri hedef alan inhibitörler üzerine de araştırmalar devam etmektedir (Giaccone et al., 2015). Moleküler hedefe dayalı tedavi yaklaşımları başlangıçta başarılı sonuçlar versede, epigenetik değişimler ve tümörün heterojen yapısı nedeniyle zamanla ilaç direnci gelişmesi genellikle kaçınılmazdır. Bu durum, NSCLC'de tedavinin etkinliğini ciddi şekilde kısıtlamaktadır (Vishnu & Tan, 2010). Bu nedenle, yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi ve bu doğrultuda tedavilerin geliştirilmesi hayati bir önem taşımaktadır.

Fotothermal tedavi

Fotothermal terapi, tümör tedavisinde umut vadeden ve minimal invaziv özellikte bir yöntem olarak değerlendirilmiş olup etkili sonuçlar ortaya koymuştur (Ogi & Aruga, 2013). Fotothermal tedavi, ışık enerjisini lokal ısı enerjisine dönüştürmek için fotothermal bir ajan ile lokal lazer ışınlamasını birleştirerek tümörleri tedavi eder (Faries et al., 2017). Nanoteknolojinin fotothermal terapi ile birleştirilmesi, tümör tedavisinde sinerjik bir etki oluşturarak potansiyel bir gelecek sunmaktadır (Sondak et al., 2002).

Bağışıklık tedavisi stratejileri (İmmünoterapi)

İmmünoterapi, akciğer kanserine karşı mücadelede çığır açan bir tedavi yöntemi olarak öne çıkmaktadır. Bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri (ICIs), kanser aşılı ve hücrel immünoterapiler gibi çeşitli yöntemleri içerir ve tümöre karşı etkili bağışıklık tepkileri oluşturmayı veya güçlendirmeyi amaçlamaktadır. Özellikle kemoterapi ile karşılaştırıldığında, immünoterapinin daha az yan etkisi olduğu ve hastaların yaşam sürelerini uzatmanın yanı sıra yaşam kalitelerini de iyileştirdiği gösterilmiştir (Valencia et al., 2022; Yan et al., 2022). İmmünoterapi, akciğer kanseri tedavisinde hem güvenli hem de etkili bir yöntem olarak dikkate değer bir seçenek sunmaktadır (Yu et al., 2019).

Aşılar

Kanser aşıları

Başarılı kanser immünoterapisi, nihayetinde, tümör hücrelerinin, tümöre özgü antijenleri (TSA'lar) veya tümörle ilişkili antijenleri (TAA'lar) anormal şekilde ifade edilen veya özgül olarak tanıyabilen sitotoksik lenfositler (T hücreleri) tarafından etkileşime girmesini gerektirir. Kanserli bazı hastalar, etkileyici tümör karşıtı aktivite oluşturma potansiyeline sahip, antijen spesifik T hücrelerinin yeterli seviyelerde veya fonksiyonla spontan olarak üretimini sağlarlar, ancak çoğu hasta bunu başaramaz. Yeterli seviyede ve işlevde bağışıklık efektörlerinin sağlanmasının bir yolu, terapötik kanser aşılmasıdır. Bu aktif immünoterapi yaklaşımı, tümörle mücadele eden bağışıklık yanıtlarını TAA'lar veya TSA'lara karşı tetiklemeyi amaçlamaktadır (Butterfield, 2015; Khong & Overwijk, 2016). Kanser aşılarının geliştirilmesi fikri, bazı tümörlerin akut enfeksiyon geçiren bireylerde kendiliğinden küçülebildiği gözlemine dayanarak ortaya çıkmıştır (Hoption Cann et al., 2003). Bundan bir asırdan uzun bir süre önce, Dr. William Coley, bu gözlemden yola çıkarak ısı ile etkisizleştirilmiş bakterilerden oluşan basit bir kanser karşıtı immünoterapi yöntemi geliştirmiştir (Hoption Cann et al., 2003; McCarthy, 2006). Ardından, bakteriyel ürünlere karşı oluşan özgül olmayan doğuştan gelen bağışıklık yanıtının, spesifik bir tümör karşıtı bağışıklık tepkisine nasıl evrildiği açıklığa kavuşturulmuştur. Bu durum, antijen sunan hücrelerin (ASH'ler) (örneğin, dendritik hücreler [DH'ler]), doğuştan gelen bağışıklık yanıtı sırasında salınan immünojenik tümör kaynaklı peptitleri nasıl tanıyıp işleyebildiği ile açıklanmıştır. Bu peptitler, spesifik reseptörlere sahip olan anti-tümör T hücrelerini etkinleştirmek için kullanılabilir (Ott & Wu, 2019). Bu da tümör kaynaklı antijenlerin, bağışıklık sistemine yeterince immünojenik bir bağlamda (bir "aşı") sunulması durumunda, kanser hücrelerini tercihen hedefleyerek, nispeten güvenli ve etkili kanser tedavilerinin mümkün olabileceğini ve uzun süreli bağışıklık oluşturabileceğini öne süren hipoteze yol açmıştır (Dag Taskesenligil & Unver, 2023).

Bu cesaret verici temele rağmen, kanser aşıları, son 40 yıl boyunca çeşitli malignitelerde yoğun bir şekilde prelinik ve klinik araştırmalara konu olmuş olsada, klinik düzeyde laboratuvarından uygulamaya geçiş oldukça yavaş olmuştur; yalnızca iki terapötik kanser aşısı (sipuleusel-T ve talimogene laherparepvec [T-VEC]) Amerika Birleşik Devletleri veya Avrupa Birliği'nde düzenleyici onay almış ve birçok negatif faz 3 çalışması ürünlerin sonlandırılmasına yol açmıştır. Yine de terapötik kanser aşılarına olan ilgi çeşitli nedenlerle devam etmektedir. Bunun nedenlerin birincisi, immün kontrol noktası inhibitörlerinin klinik alandaki başarısı ve tedavi gören hastalarda tümör antijenine özgü T hücrelerinin saptanması ile artık bu hastaların tümörle ilişkili T hücrelerini aktif hale getirebilmeleridir. Bu durum, immün kontrol noktası

blokajına yanıt veren kanser hastalarının az bir kısmında doğal olarak meydana gelmektedir. İkincisi; kanser aşılarının uygulanmasının ardından kontrol noktası moleküllerini ifade eden T hücreleri ile kontrol noktası ligandlarını ifade eden tümör hücrelerinin tespit edilmesi, aşılarda ve immün kontrol noktası inhibitörlerinin birlikte uygulanmasının etkili olabileceğine işaret etmektedir; bu da prelinik araştırmalarda kanıtlanmıştır (Ali et al., 2016; Kinhead et al., 2018; Soares et al., 2015). Üçüncüsü; başarısız sonuçlar içeren çalışmalar, bu alanda geleceğe yönelik önemli dersler sağlamış ve bu bulgular, şu anda devam eden klinik denemelerde uygulanmakta ve gelecek araştırmalara rehberlik etmektedir. Dördüncüsü, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ile antijen bağlanma mekanizmalarına dair artan bilgi birikimi, daha etkili aşı tasarımı ve doğru antijenlerin seçimini mümkün kılmıştır. Beşincisi, tip 2 tümör destekleyici bağışıklık tepkilerinin yerine, tip 1 tümör karşıtı bağışıklık tepkilerinin tercih edilerek indüklenmesi konusundaki ilerlemeler kayda değerdir. Son olarak ise, terapötik kanser aşılardan biri olan sipuleusel-T'nin sınırlı bir etkinliğe sahip olmasına rağmen onaylanması, terapötik aşı konseptinin klinik geçerliliğini ve bilimsel dayanağını kanıtlamıştır (Ali et al., 2016; Hollingsworth & Jansen, 2019; Kinhead et al., 2018; Soares et al., 2015; van Duikeren et al., 2012)

Bu alandaki son yeniliklerin, geçmişteki kanser aşısı çalışmalarındaki başarısızlıkları nasıl dönüştürdüğünü ve bu gelişmelerin gelecekte aşılarda rolünü nasıl şekillendirebileceğini değerlendirmek büyük önem taşımaktadır.

Çeşitli kanser aşılarda geliştirilmiş olup, bu aşılarda kullanılan antijenlerin taşıma yöntemlerine göre farklılık göstermektedir. Bu yöntemler arasında kanser antijenlerinin protein ya da sentetik peptit formunda sunulması, tümör antijeni içeren hücre tabanlı taşıma (örneğin, modifiye edilmiş tümör hücreleri veya antijen yüklü dendritik hücreler) ve kanser antijenlerini kodlayan DNA/RNA bazlı taşıyıcılar (örneğin, plazmidler, RNA veya viral vektörler) yer almaktadır.

Peptit ve protein bazlı aşılarda

Peptit bazlı aşılarda, üretim açısından nispeten kolaydır; ancak etkili bir bağışıklık yanıtı sağlamak için genellikle güçlü bağışıklık düzenleyicilerle birlikte kullanılması gerekmektedir. Ayrıca, bu tür aşılarda etkinliği, bireylerin insan lökosit antijeni (HLA) haplotipine bağlı olarak sınırlı bir grupta etkili olabilir (DeMaria & Bilusic, 2019). Erken dönem peptit bazlı aşılarda inceleyen bazı faz 3 çalışmaları, belirli TAA'lar veya TSA'lara karşı bağışıklık yanıtları oluşturmuş olsada, belirgin bir klinik fayda sağlayamamıştır (Hollingsworth & Jansen, 2019). Bu klinik etkisizlik, kullanılan peptitlerin ve bağışıklık düzenleyicilerin özelliklerine bağlı olabilir. Ayrıca, erken peptit aşılarda, güçlü ve uzun süreli anti-tümör bağışıklık tepkileri

oluşturmak için gereken antijen sunumunu destekleme açısından yetersiz olduğu düşünülmektedir (Dag Taskesenligil & Unver, 2023).

Erken peptit aşılarının temel sınırlamalarından biri, kısa peptitlerin (<15 amino asit), sitotoksik T lenfositlerini (STL'ler) hedeflemek için gerekli olan minimal epitop uzunluğuna sahipken, T yardımcı hücrelerini hedefleme yeteneğine sahip olmamasıdır (DeMaria & Bilusic, 2019). Bu kısa peptit epitopları, profesyonel olmayan antijen sunan hücreler (ASH) tarafından taşınır ve bu da etkili bir bağışıklık yanıtının oluşumunu sınırlandırabilir (Bijker et al., 2008). Ancak, profesyonel olmayan ASH'ler, iltihaplanmamış lenfoid organlarda dolaşır ve sitotoksik T lenfositleri optimal şekilde başlatmak ve aktive etmek için gerekli kostimülatör sinyalleri vermez, bu da tolerasyon gelişimine yol açar (Morse et al., 2021). Dahası, profesyonel ASH'ler (DH; dentritik hücre) tarafından kısa peptitlerin çapraz sunumu, sentetik uzun peptitlere kıyasla daha az verimli veya uzun süreli değildir (Faure et al., 2009). Dolayısı ile sentetik uzun peptitlerle aşılama, minimal uzunluktaki epitoplardan daha güçlü ve kalıcı T hücresi yanıtları oluşturmaktadır (Bijker et al., 2008; Zwaveling et al., 2002). Bu avantajlar nedeniyle, modern sentetik peptit aşı tasarımları genellikle en az bir uzun peptit kullanmaktadır (Bijker et al., 2008; Calvo Tardón et al., 2019) bu da minimal uzunluktaki peptit yapılarına kıyasla önemli bir gelişmedir.

Doğal TAA dizisindeki amino asidi değiştirme (epitop geliştirme), ASH'lere bağlanma kararlılığını artırmak için mantıklı bir şekilde uygulanabilir ve bu da T hücrelerine başarılı antijen sunumu olasılığını artırır (Kumai, Fan, et al., 2017; Kumai, Kobayashi, et al., 2017) Peptitlerin amfipatik özelliklerinin artırılması, immünojenik etkilerini de güçlendirebilir. Bir örnek olarak, BiVax peptit/poliyinozinik-polisitidilik asit (poly I) alt birim aşısının geliştirilmesi verilebilir (Cho et al., 2013). Son araştırmalar, yardımcı T hücrelerinin güçlü ve kalıcı bağışıklık yanıtlarının tetiklenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Kumai, Lee, et al., 2017; Spitzer et al., 2017). Özellikle, T yardımcı hücre tip 1'in hedef alınmasının en etkili yaklaşım olduğu düşünülmektedir. Bu hücrelerin, anti-tümör bağışıklık yanıtlarını başlatma ve sürdürme konusunda oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, yardımcı T hücre tip 2'nin belirli durumlarda neoplastik dönüşümü destekleyebileceği bildirilmiştir (H.-J. Kim & Cantor, 2014). İlk peptit aşı tasarımları yalnızca sitotoksik T lenfositleri hedeflerken, modern sentetik peptit aşıları, immünojeniteyi artırmak ve klinik etkinliği iyileştirmek amacıyla genellikle hem sitotoksik T lenfositleri hem de yardımcı T lenfositleri hedeflemektedir (Maslak et al., 2018).

Ne yazık ki, protein bazlı aşılar (idiotip aşıları dahil) klinik uygulamalarda büyük ölçüde başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu durum, kısa peptitlerin dendritik hücreler (DH'ler) tarafından

işlenip sunulma verimliliğinin, proteinlere kıyasla daha düşük olmasından kaynaklanabilir (Rosalia et al., 2013). Bu bulgular, immünojenitesi artırılmış sentetik uzun peptitler, nanopartikül bazlı alternatif peptit taşıma platformları ve daha etkili aşı düzenleyicileri gibi geliştirilmiş peptit aşılara yönelik rasyonel bir temel oluşturmuştur.

Hücresel aşılar

Yaygın olarak araştırılan hücresel kanser aşıları, tümör (neo)antijenleriyle yüklenmiş dendritik hücreler (DH'ler), modifiye edilmiş otojen kanser hücreleri ve alojenik tümör hücre hatlarını içerir. Hücresel aşılar, tedavi amaçlı kanser aşılarının ilk geliştirilmiş türlerindendir. FDA tarafından onaylanan ilk terapötik kanser aşısı olan sipuleusel-T, otojenik kan hücrelerinden elde edilmiş, prostatik asit fosfataz antijeni ile yüklenmiş ve GM-CSF ile desteklenmiş bir aşıdır. 2010'da metastatik kastrasyon direnci gösteren prostat kanseri için onaylanmış olan sipuleusel-T, IMPACT çalışmasının (NCT00065442) faz 3 sonuçlarına dayanarak, plaseboya göre genel sağkalımı (OS) anlamlı şekilde artırmıştır (Kantoff et al., 2010). Buda, tedavi edici kanser aşılarının erken klinik doğrulamasını sağlamıştır. Aynı zamanda sipuleusel-T, androjen reseptörü sinyal yolu inhibitörlerini (ASPIs) içeren mevcut tedavi yelpazesinde etkili bir tedavi seçeneği olmaya devam etmektedir. Prostat kanseri olan erkeklerin sipuleusel-T tedavisinin, birinci basamaktaki tedavi veya herhangi bir basamaktaki tedavi olarak ASPIs tedavisiyle karşılaştırıldığında iyileşmiş genel sağkalım (OS) ile ilişkilendirildiği bulunmuştur (McKay et al., 2020). Öte yandan, otojen tümör hücrelerine dayalı hücresel aşılar, birkaç önemli denemede aynı başarıyı gösterememiştir. Bu aşılar ya hedeflerine ulaşamamış ya da klinik açıdan anlamlı sonuçlar vermediği için erken bir şekilde sonlandırılmıştır. Bu başarısızlığın muhtemel bir nedeni, ısıtılmış tümör hücreleri veya tümör hücresi lisatlarındaki immün sistemi baskılayan bileşiklerin varlığı olabilir (Graner et al., 2004).

Genetik aşılar

Virüsler veya plazmidler, tümör antijenlerini (TAA) kodlayan DNA veya RNA için vektör görevi görebilir (DeMaria & Bilusic, 2019; Hollingsworth & Jansen, 2019; Maeng & Berzofsky, 2019) Plazmid vektörlü aşılarda, nükleik asidin kendisinin immünostimülasyon özelliklerine sahip olması nedeniyle doğrudan gelen bağışıklık sistemini güçlendirici bir etkisi vardır ve bu da doğrudan gelen bağışıklık yanıtını tetikler (Klinman et al., 1997). Bu platformun sağladığı diğer faydalar arasında daha yüksek stabilite, üretim kolaylığı, hücre içi antijen ifadesinin tetiklenmesi ve tam uzunluktaki genler kullanıldığında HLA kısıtlamalarının ortadan kalkması sayılabilir. Bu avantajlara rağmen, şu ana kadar DNA veya RNA aşılarının ileri düzey

araştırması sınırlıdır. HLA-B7 ve β 2 mikroglobulin için DNA dizileri içeren Allovectin-7® DNA aşısı, ileri evre melanoma hastalarında yapılan bir faz 3 çalışmasında kemoterapiye kıyasla objektif yanıt oranını veya OS'yi iyileştirmemiştir ve bu da geliştirme programının sonlandırılmasına yol açmıştır. O zamandan bu yana, DNA ve RNA taşıma tekniklerinde (örneğin elektroporasyon) birçok gelişme sağlanmış ve daha yeni nesil nükleik asit aşıları, erken aşama araştırmalarda denenmiştir (Morse et al., 2021).

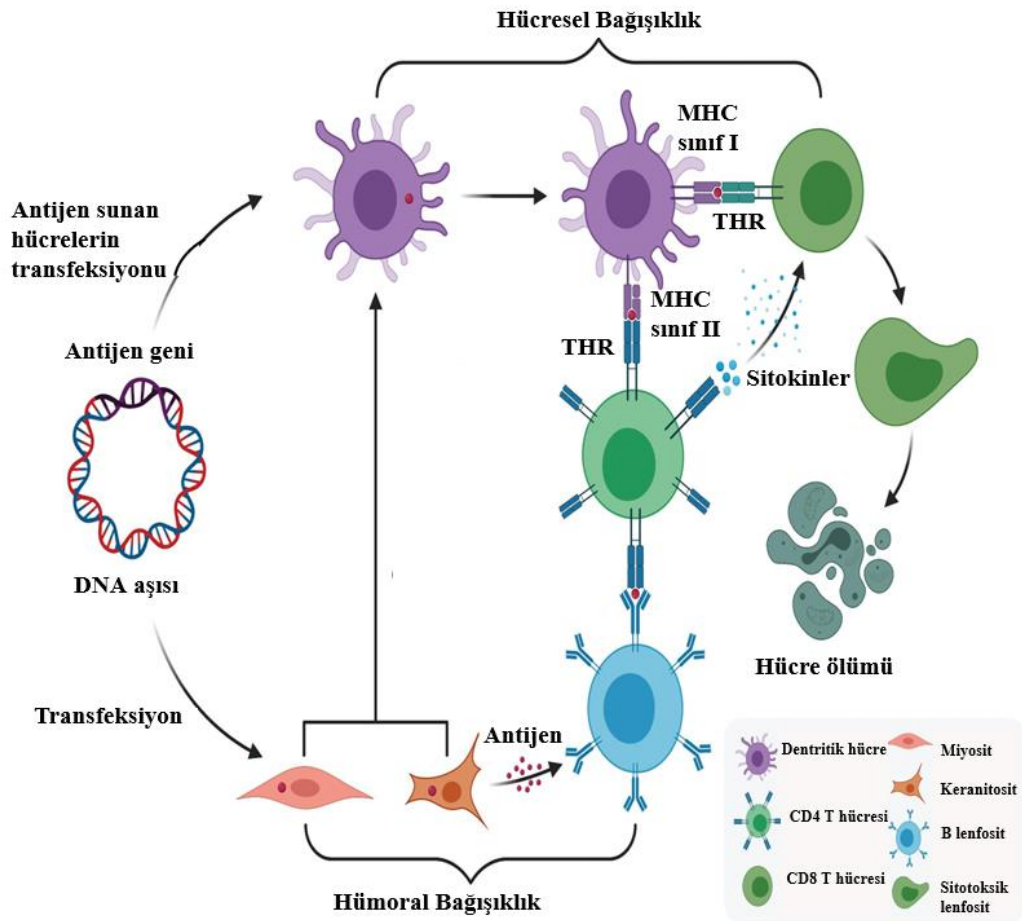
Erken dönem nükleik asit tabanlı aşı tasarımlarının ana sınırlamaları, nükleik asidin DH'ler ve diğer hücreler tarafından düşük transfüzyon verimliliği veya bozulma nedeniyle yetersiz bir şekilde alınmasıdır (Hollingsworth & Jansen, 2019) ve bu durum, klinik denemelerde gözlemlenen düşük immünojeniteye yol açmıştır. DNA veya RNA tabanlı aşılar için, transfüzyon oranlarını ve immünojeniteyi iyileştirmek adına bir dizi güncelleme yapılmıştır. Bu iyileştirmeler arasında elektroporasyon, sonoporasyon, nanoparçacıklar, gen tabancaları, mikron iğne dizileri, iğnesiz enjeksiyonlar ve liposomal kapsülleme bulunmaktadır (Lim et al., 2020; Teixeira et al., 2020).

Servikal intraepitelyal neoplazi tedavisinde plaseboya göre daha yüksek regresyon oranları gösteren DNA tabanlı bir aşı, şu anda servikal lezyonları tedavi etmek için iki faz 3 çalışmasında değerlendirilmektedir (REVEAL 1, NCT03185013; REVEAL 2, NCT03721978). Erken dönem araştırmaları, elektroporasyon kullanarak DNA tabanlı aşılarda farklı katı tümörler üzerindeki etkinliğini test etmektedir. Faz 1 çalışmalarda, RNA tabanlı aşılar, elektroporasyon ve RNA-lipopleksler kullanılarak, sistemik DH hedeflemesi için umut verici anti-tümör etkinlik göstermiştir (Morse et al., 2021).

Nükleik asit tabanlı aşılarda immünojenitesini artırmaya yönelik diğer yöntemler, Lopes ve ark. tarafından yakın zamanda incelenmiştir (Lopes et al., 2019). İmmün toleransı kırmak ve birden fazla TAA'yı hedeflemek için DNA aşıları, zenoantijenler veya kimera proteinler kodlayan aşılar üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Lopes et al., 2019). Hayvan modellerinde, kimera DNA aşıları potansiyel anti-tümör etkiler indüklemiştir (Soong et al., 2013), bunlardan biri köpek melanomasının tedavisi için onaylanmıştır. Çok sayıda insan klinik denemesi, aynı anda birden fazla antijenin sunulmasıyla geniş bir T hücre yanıtı indüklemeyi amaçlayan polipeptid DNA aşılarını değerlendirmektedir (Lopes et al., 2019).

DNA aşısı; aşı olarak kullanılan bir DNA dizisi ve bu dizinin ekspresyonunu gerçekleştiren bir plazmit DNA'nın, rekombinant DNA teknolojisi ile bir araya getirilerek oluşturulan rekombinant DNA'dır. İlgili DNA dizisini taşıyan plazmit DNA ile konakçı hücrelere, immünojenik antijenleri kodlayan fragmentler ya da genler taşınmaktadır. Bu yaklaşımla humoral ve hücreli bağışıklığın her ikisinde de etkili bir şekilde immün cevap

oluşturulur (Silveira et al., 2017; Yang Lee et al., 2018) (Şekil 1). Bu aşı formülasyonu, genetik materyalin konakçı hücre çekirdeği içine yerleşmesini sağlar. Çekirdeğe ulaştıktan sonra vektörde bulunan memeli promotorü varlığında genin ya da genlerin transkripsiyonu tetiklenir ve konak hücre bir ekspresyon makinesi olarak kullanılır. Antijen sunan hücreler genetik materyali alan en büyük hedef hücrelerdir (L. Li & Petrovsky, 2016). Genin translasyonundan sonra oluşan protein ya da protein fragmenti, antijen sunan hücrelerin içerisinde $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin tanıyabileceği şekilde parçalanarak taşıdıkları MHC sınıf I ve II molekülleriyle $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerine sunulurlar (Duerr et al., 2020; Ingolotti et al., 2010)



Şekil 1. DNA aşısının hümmoral ve hüresel bağışıklığı uyarması

(Qin et al., 2021)'den Türkçe'ye çevrildi.

Geleneksel canlı ya da zayıflatılmış aşılarda kıyaslandığında; DNA aşıları, mikroorganizmalarla bulaşın olmaması, hüresel ve hümmoral bağışıklığı uyarması, tek aşıda farklı antijenleri kodlayan vektörün tasarlanabilmesi, büyük ölçekte ve düşük maliyetli üretimin gerçekleştirilebilmesi ve depolama sırasında stabilitesinin yüksek olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Özellikle aşı bilimi alanında depolama, aşı içeriğinin kalitesini yüksek oranda koruduğu için önemli bir faktördür. Bu nedenle aşılarda içeriğini korumak ve canlılığını

sağlamak için soğuk koruma gereklidir. Dolayısıyla DNA aşıları soğutmaya daha az ihtiyaç duyduğundan oldukça pratik ve kararlıdır (Silveira et al., 2017; Xu et al., 2014)

"Moleküler klonlama," yani rekombinant DNA moleküllerinin oluşturulması, yaşam bilimlerinde büyük ilerlemelere öncülük etmiştir. DNA manipülasyonu, rekombinant DNA teknolojisinin uygulama alanlarının ve karmaşıklığının üstel bir şekilde artmasıyla birlikte kolay hale gelmiştir. Gen klonlama, birden fazla DNA parçasının sorunsuz bir şekilde birleştirilmesi veya değiştirilebilir gen kasetlerinin kullanılmasıyla hızlı ve esnek bir şekilde gerçekleştirilerek gen işlevinin anlaşılmasında bir patlamaya yol açmıştır. Yakın gelecekte, sentetik biyoloji teknikleriyle yeni bir paradigma ortaya çıkabilir ve bu teknikler, herhangi bir in siliko tanımlı DNA yapısının *in vitro* kimyasal sentezi yoluyla gen terapisi vektörlerinin, rekombinant protein üretim süreçlerinin ve yeni aşılarda daha hızlı bir şekilde oluşturulmasını ve tekrarlanmasını kolaylaştırabilir (Ashwini et al., 2016).

Virüsler, virüs DNA'sı veya RNA'sının dendritik hücrelerin (DH'ler) tanıma reseptörlerini tetikleyerek aktive edilmesine olanak tanıdığı için aşı geliştirmede umut verici bir platform olarak kabul edilmektedir. Ancak, virüs vektörlü aşılarda, örneğin PROSTVAC ve PANVAC ile yapılan çalışmalarda olduğu gibi, tek başlarına tutarlı klinik faydalar sağlamamıştır (Larocca et al., 2011). Örneğin, PROSTVAC-VF adlı bir virüs vektör aşısı, metastatik kastrasyon dirençli prostat kanseri hastalarında gerçekleştirilen bir faz 2 çalışmasında OS (overall survival) faydası göstermiştir ancak bu olumlu bulgu, sonraki bir faz 3 çalışmasında teyit edilememiştir. Faz 3 çalışmasının araştırmacıları, PROSTVAC-VF'nin tek başına yeterli bağışıklık yanıtı üretmediği ya da bağışıklığın immün baskılayıcı bir mikro ortam tarafından engellendiği spekülasyonunda bulunmuşlardır. PROSTVAC-VF'nin kontrol noktası inhibitörleri ve/veya diğer kanser aşılılarıyla yapılan kombinasyon çalışmaları halen devam etmektedir (NCT02933255, NCT04020094, NCT03532217, NCT03315871) (Madan, Bilusic, et al., 2012). Ancak, yakın tarihte gerçekleştirilen bir faz 2 denemesi, viral aşılarda kontrol noktası inhibitörleriyle birlikte yumuşak doku sarkomunda sağkalım üzerinde beklenen faydayı sağlamadığını ortaya koymuştur. PANVAC aşısının pankreas kanseri üzerindeki klinik araştırmalar ise sınırlı sayıda yapılmaktadır (NCT00669734) (Van Der Burg et al., 2016).

Diğer kanser aşı türleri

Önceden açıklanan terapötik kanser aşılardaki aksine, kanser tedavisinde kullanılan bazı aşılarda, anti-tümör bağışıklığı oluşturmak için tanımlanmış tümör antijenlerini sunmaz, ancak yine de bağışıklık yanıtı oluştururlar. Örneğin, bazı mesane kanseri türlerinin tedavisinde onaylı olan *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG) ile intravezikal immünoterapiler (yani aşılama), BCG'nin tümör-spesifik T hücrelerinin aktivasyonunu ve tükenme durumunu

iyileştirdiğini gösteren son verilerle kanıtlanmış olsada, BCG immünoterapisinin etki mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır (Ott & Wu, 2019).

Bağışıklık hücresi infüzyon terapisi

Bağışıklık hücresi infüzyon terapisi olan hücresel immünoterapi, hastanın T lenfositlerini kullanarak kanser antijenlerini tanıyacak şekilde genetik olarak düzenlenmiş, *in vitro* olarak genişletilmiş ve ardından antijen spesifik T hücresi bağışıklığını uyarıp güçlendirmek amacıyla hastaya enjekte edilen bir kanser immünoterapisi yaklaşımıdır (Blumenschein et al., 2022).

Kimerik antijen reseptörü T (CAR-T) hücre tedavisi (CAR-T hücre tedavisi)

CAR-T hücre tedavisi, hücresel immünoterapide umut verici bir yaklaşım olsada, NSCLC’de etkisi yeterli bulunmamaktadır. Bunun temel sebebi, uygun antijen hedeflerinin bulunmamasıdır (Jie et al., 2021; Wallstabe et al., 2019). NSCLC hastalarında yüksek düzeyde eksprese edilen akciğer spesifik X (LunX) baz alınarak, LunX’i hedefleyen CAR-LunXT hücreleri oluşturulmuş ve LunX pozitif tümör hücrelerini öldürebildiği gösterilmiştir (Wallstabe et al., 2019). DLL3 hedefleyen bir CAR, fare akciğer kanseri modelinde etkili olmuştur (Jaspers et al., 2023). Ancak, katı tümörlerin heterojen yapısı ve mikroçevresi, CAR T hücre tedavisinin etkinliğini sınırlayan önemli engeller oluşturabilmektedir. Lokal tedavi ile birleşen CAR T immünoterapisi, tümör mikroçevresini (TME) düzenleyerek tedavi etkinliğini artırabilir. Mikrodalga ablasyonu, TME’yi şekillendirip AXL-CAR T hücrelerinin etkinliğini artırırken, fototermal-nanokatalitik nanoenzimler B7-H3 CAR T hücrelerinin aktivasyonunu ve infiltrasyonunu artırarak terapötik engelleri iyileştirmiştir (Cao et al., 2022; Zhu et al., 2021).

Tümör infiltrasyonu yapan lenfositler (TIL'ler)

TIL’lerin adaptif hücre transferi (AHT), immün kontrol noktası inhibitörleri ile tedavi edilen NSCLC hastalarında klinik etki göstermiş ve TIL-AHT’ye yeniden ilgi uyandırmıştır (Shah et al., 2022). *In vitro* olarak genişletildiğinde, TIL’ler tümör hücrelerini öldürebilmektedir (Lipp et al., 2022). PIK-93 ve anti-PD-L1 antikorlarının kombinasyonu, tümör büyümesini inhibe ederek TIL’lerin (tümör infiltrasyonlu lenfositler) sayısını artırmıştır (Lin et al., 2023). Etkinlik ve güvenlik açısından, TIL’ler metastatik akciğer kanseri için potansiyel bir tedavi seçeneği sunabilir (Creelan et al., 2021).

Akciğer kanseri immünoterapisinde onkolitik virüsler (OV'ler)

Onkolitik virüsler (OV’ler), tümör hücrelerini seçici şekilde hedefleyerek güçlü antitümör bağışıklık yanıtları tetikleyebilen, doğal ya da mühendislik yoluyla üretilmiş

enfeksiyöz patojenlerdir (Lahiri et al., 2023; Sun et al., 2022) Örneğin, onkolitik parainfluenza virüsü, akciğer kanseri tedavisinde potansiyel taşıyan bir ajan olarak öne çıkmaktadır (Varudkar et al., 2021). Akciğer kanseri tedavisinde, onkolitik influenza virüsü enfeksiyonunun ve B7-H3 immün kontrol noktası inhibitörünün kombinasyonu, sinerjik bir onkolitik etki ile birlikte bağışıklık modülasyonu sağlamıştır (Masemann et al., 2021). IL-10 ve onkolitik adenovirüs Ad-hTERT'in kombinasyonu, tümördeki CD8⁺ T hücrelerinin sayısını artırarak anti-Lewis akciğer kanseri üzerinde önemli bir etki yaratmıştır (D. Chen et al., 2021). Onkolitik adenovirüs ve ekstraselüler veziküller içinde kapsüllenmiş paklitaksel, insan akciğer kanseri üzerindeki hayvan ksenograft modellerinde tümör büyümesini azaltabilmiştir (Garofalo et al., 2018). Modifiye onkolitik miksoma virüsü ile düşük doz cisplatinin kombinasyonu, bağışıklık hücresi infiltrasyonu ile ilişkili sitotoksiteyi indükleyerek akciğer kanseri hastalarında hayatta kalma oranını önemli ölçüde artırmıştır (Kellish et al., 2019).

Akciğer kanseri için immün kontrol noktası inhibitörleri (ICIs)

Akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan immün kontrol noktası inhibitörleri (ICIs), PD-1, PD-L1, sitotoksik T-lenfositleri ile ilişkili protein (CTLA-4) ve diğer inhibitörlerin kullanımını içeren bir dizi ajanı kapsar (S. Wang et al., 2023). İmmün kontrol noktası inhibitörlerine dayalı çok sayıda klinik deneme yapılmış ve güçlü antitümör etkinlik göstermiştir. İlginç bir şekilde, immün kontrol noktası inhibitörleri tedavisi altında, tümör drenajı yapan lenf düğümleri benzersiz bir yanıt modeli göstermiştir; bu da akciğer kanseri tedavisinde immünoterapinin etkinliğini potansiyel olarak artırmak için kullanılabilir olduğunu göstermektedir (H. Yang et al., 2022). Statinler, PD-L1 ifadesini baskılayabilir ve immün kontrol noktası blokaj tedavisiyle kombinasyonu, akciğer kanseri tedavisinin etkinliğini artırabilir (Mao et al., 2022). Ayrıca, erastin, PD-L1'e duyarlılığı artırarak akciğer kanseri ilerlemesini etkili bir şekilde inhibe edebilir (Tang et al., 2023). FOXM1'in hedef alındığı küçük interferans RNA knockdown veya tiostrepton tedavisi, NSCLC tümörlerinde PD-L1 seviyelerini önemli ölçüde düşürebilir. Hayvan modellerinde yapılan araştırmalar, bu tedavilerin tümör büyüklüğünü küçültebileceğini ortaya koymuştur (Madhi et al., 2022). Ancak, immün kontrol noktası aktivitesinin baskılanması, inflamasyonla ilgili yan etkilere neden olabilir ve bu da sağlıklı dokulara zarar verebilir (Tiu et al., 2022). Bu nedenle, ICI'lerin NSCLC hastalarını tedavi etmedeki etkinliği ve güvenliği dikkatlice değerlendirilmelidir (M. Zhang et al., 2022).

Kanser Aşılarının Tasarımı

Akademi ve endüstri tarafından yıllarca geliştirilen terapötik kanser aşılarının sınırlı başarısı, beklentilerin neden karşılanmadığını ve başarılı geliştirme önündeki engellerin nasıl aşılabileceğini sorgulamaktadır. Antijen immünojenliği, antijen sunumu ve kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden nasıl kaçtığı konusundaki anlayıştaki ilerlemeler, önceki çalışmaların suboptimal antijen hedefleri ve aşı tasarımlarını kullandığını göstermektedir (Schlom, 2012). 2016'da Melief ve arkadaşları, kanser aşılarının başarılı olması için gerekli nitelikleri belirlemişlerdir (Van Der Burg et al., 2016). Kısaca, bu nitelikler, sitotoksik ve yardımcı T lenfositlerin iki mekanizma ile geniş çapta uyarılmasının önemini vurgulamaktadır: (1) her iki T hücresi popülasyonunu da uyaran uygun antijenlerin seçimi ve (2) tümör antijenlerinin aktive edilmiş DH'lere (dentritik hücre: antijen sunan hücre (ASH)) yoğun şekilde iletilmesini sağlayan mantıklı aşı tasarımları. Dışarıdan alınan tümör antijenlerinden türetilen epitoplar, sırasıyla MHC sınıf I ve MHC sınıf II moleküllerine yüklenebilir, bu da sitotoksik ve yardımcı T lenfositleri uyarmaktadır (Melief et al., 2015). Son on yıl içinde, terapötik kanser aşıları, daha etkili immünojenite sağlamak, uygun antijenleri seçmek ve yapısal tasarımlarını geliştirmek amacıyla iyileştirilmiştir.

Uygun antijen seçimi

Kanser aşıları, etkili bir tedavi için doğru antijenlerin seçilmesine dayanır. Bu seçim, bağışıklık yanıtını güçlendirir, kanser kök hücrelerini hedef alarak nüksü önler ve normal hücrelere zarar vermez (Hollingsworth & Jansen, 2019). Ancak, uygun antijenleri belirlemek zordur çünkü çok fazla potansiyel antijen vardır. Ortak TAA'lar (tümör spesifik antijenler), genellikle kanser hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak ifade edilen proteinlerdir. Bu antijenler, aşıların geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Melief et al., 2015). Öne çıkan örneklerden biri WT1 proteini olup, hedef alan aşılar bazı erken aşama çalışmalarda olumlu sonuçlar göstermiştir. Bununla birlikte, tümörler kendilik proteomuna benzer özellikler taşıyabilen mutasyonlar içerdiğinden, bağışıklık sistemi bu mutasyonlara karşı daha güçlü bir yanıt verebilir (Cheever et al., 2009).

Neoantijenler, kanser hücrelerindeki genetik değişikliklerden kaynaklanır ve kanserin özgül bir özelliği olan bu antijenler bağışıklık sistemi tarafından daha iyi tanınır. Bu antijenlerin tespiti için gelişmiş genetik analizler kullanılır ve bu süreç hızla ilerlemektedir (Gubin et al., 2015). Erken aşama klinik çalışmalar, kişiselleştirilmiş neoantijen aşılarının güvenli olduğunu ve bağışıklık yanıtlarını artırabileceğini göstermektedir. Ancak, tümörlerin mutasyon yükü düşük olduğunda bu tedavi yönteminin etkinliği daha belirsizdir. Bununla birlikte, bu tür aşılar gelecekte kanser tedavisinde büyük bir potansiyel taşımaktadır (Duperret et al., 2019).

Neoantijen aşılarının optimizasyonu

Neoantijen aşılarının iyileştirilmesi amacıyla pek çok araştırma halen devam etmektedir. Hangi mutasyona uğramış peptitlerin en güçlü anti-tümör T hücresi yanıtlarını tetikleyeceğini daha doğru tahmin etmek için etkin maliyet ve verimli iş akışları araştırılmaktadır (Tran et al., 2019). Ayrıca, DNA tabanlı neoantijen aşılarının güçlü sitotoksik Tlenfositleri ile yönlendirilen anti-tümör yanıtları oluşturabileceği ve tümör ilerlemesini geciktirebileceği yönünde ön klinik verilerle desteklenen yenilikçi neoantijen aşı tasarımları da incelenmektedir (Duperret et al., 2019). Ayrıca, yeni tanı almış glioblastoma hastalarında hem TAA'lar hem de neoantijenlerin birleştirilmesiyle yapılan bir yaklaşım, antijenik hedef karışımlarının, merkezi bellek sitotoksik ve yardımcı T hücreleri tarafından sürdürülebilir anti-tümör yanıtları sağlayabileceğini göstermektedir (Hilf et al., 2019).

Adjuvanların rolü

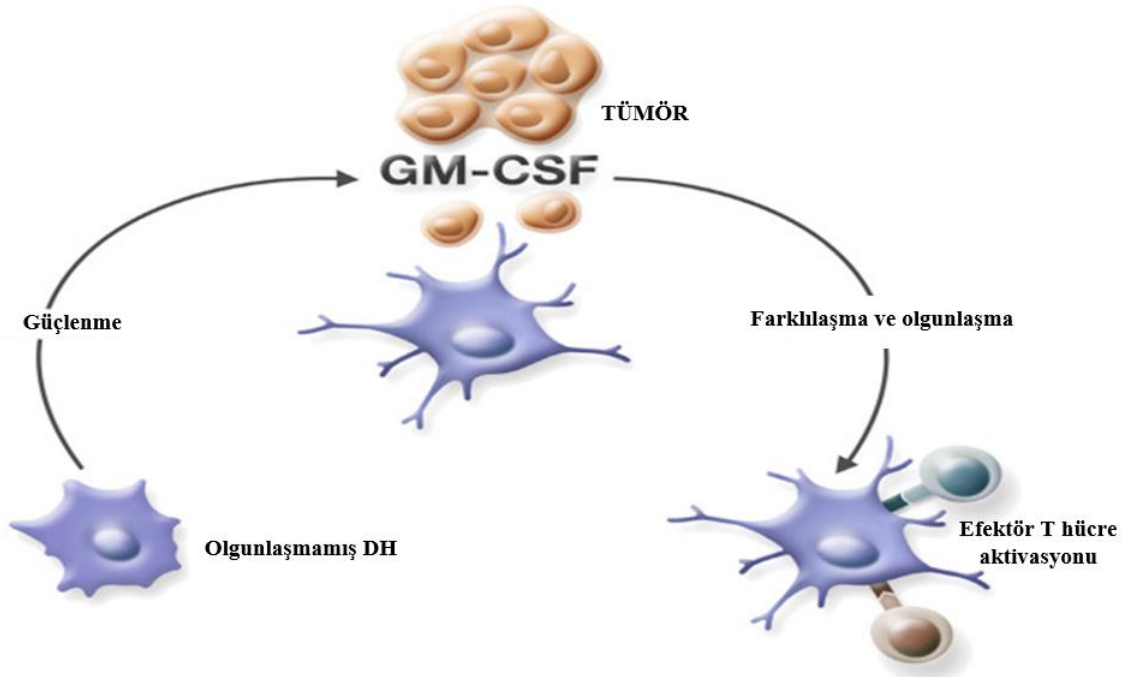
Etkili kanser aşıları, bağışıklık sistemini aktive etmek için antijen sunumu ve dendritik hücreleri (DH) kullanır. Ancak, DH'lerin olgunlaşmasının ve işlevlerinin baskılanması, kanserin bağışıklık sisteminden kaçmasına neden olur (Bowen et al., 2018). Ayrıca, bazı DH alt grupları olgunlaşmamış olup, bağışıklık sistemine kendilik toleransı mesajları gönderir. Bu nedenle, immünoestimülatör adjuvanlar içermeyen aşılar, bağışıklık sistemini zayıflatabilir. DH'leri aktive eden adjuvanlar, etkili kanser aşıları için kritik bir bileşendir (Wilson et al., 2004).

Kanser aşılarının geliştirilmesinde dikkate değer bir ilerleme, bağışıklık sistemi uyandırabilen patern tanıma reseptörlerini (TLR'ler, NLR'ler, RLR'ler vb.) aktive eden adjuvanların kullanımınıdır. Özellikle peptit bazlı aşılar için bu adjuvanlar önemlidir, çünkü peptit antijenleri bağışıklık sistemine tehlike sinyali vermez (Melief & van der Burg, 2008; Schlom, 2012) Bu sinyalin eksikliği durumunda, bağışıklık sistemi etkili bir anti-tümör yanıtı veremez. TLR agonistleri gibi adjuvanlar hem preklinik hem de klinik çalışmalarda olumlu sonuçlar vermiştir. Peptit antijenleri ve TLR agonistlerinin birlikte verilmesi, DH aktivasyonunu ve tümör karşıtı yanıtları artırmıştır. Ancak, hangi adjuvanın en uygun olduğu konusunda hala belirsizlikler bulunmaktadır (Bonam et al., 2017; Hollingsworth & Jansen, 2019).

Adjuvan Olarak GM-CSF

Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), 2.5 kb uzunluğunda ve dört ekzon içeren bir mRNA tarafından kodlanmaktadır. 23 kDa ağırlığında, glikozillenmiş ve monomerik bir protein olarak salgılanmaktadır (Farrar et al., 1988). İnsan GM-CSF'si, sinyal peptidi içeren

bir öncü formdan türetilmektedir. Bu sitokin, makrofajlar, mast hücreleri, T hücreleri, fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi farklı hücre türleri tarafından üretilir ve bağışıklık yanıtı ile inflamasyon süreçlerinde rol oynar. Normal şartlar altında, GM-CSF seviyesi düşük kalırken, bağışıklık tepkileri sonucu bu seviye önemli ölçüde artabilmektedir. GM-CSF; uygun ortak uyarıcı sinyallerle birlikte T hücre reseptörünün antijenle bağlanmasından sonra aktifleşen T hücreleri tarafından üretilmektedir. GM-CSF'nin T hücreleri üzerindeki etkilerinin büyük bir kısmının, antijen sunan hücreler (ASH'ler) aracılığıyla dolaylı yoldan gerçekleştiği düşünülmektedir. Aynı zamanda GM-CSF'nin, dentritik hücrelerinde (DH) içinde bulunduğu ASH'lerin gelişiminde ve olgunlaşmasında kritik olduğu gösterilmiştir. GM-CSF'nin bağışıklık sisteminde *in vivo* olarak en çok çalışılan etkileri, T hücreleri ve ASH'ler arasındaki etkileşimin kritik olduğu anti-tümör bağışıklığıdır. Bu etkileşimin sonucu, DH'ler tarafından bir "tehlike" veya "tolerojenik" bir sinyalin alınmasına bağlı olarak kanser hücrelerinin kaderi belirlenmektedir (Shi et al., 2006). Diğer yandan, GM-CSF'nin makrofajlar, nötrofiller, antijen sunan hücreler ve T hücrelerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve aktive olmasını tetiklediği saptanmıştır (Wada et al., 1997) (Şekil 2).



Şekil 2. GM-CSF'nin dentritik hücre olgunlaşmasını ve efektör T hücre aktivasyonunu uyarması

(Kaufman et al., 2014)'den Türkçe'ye çevrildi.

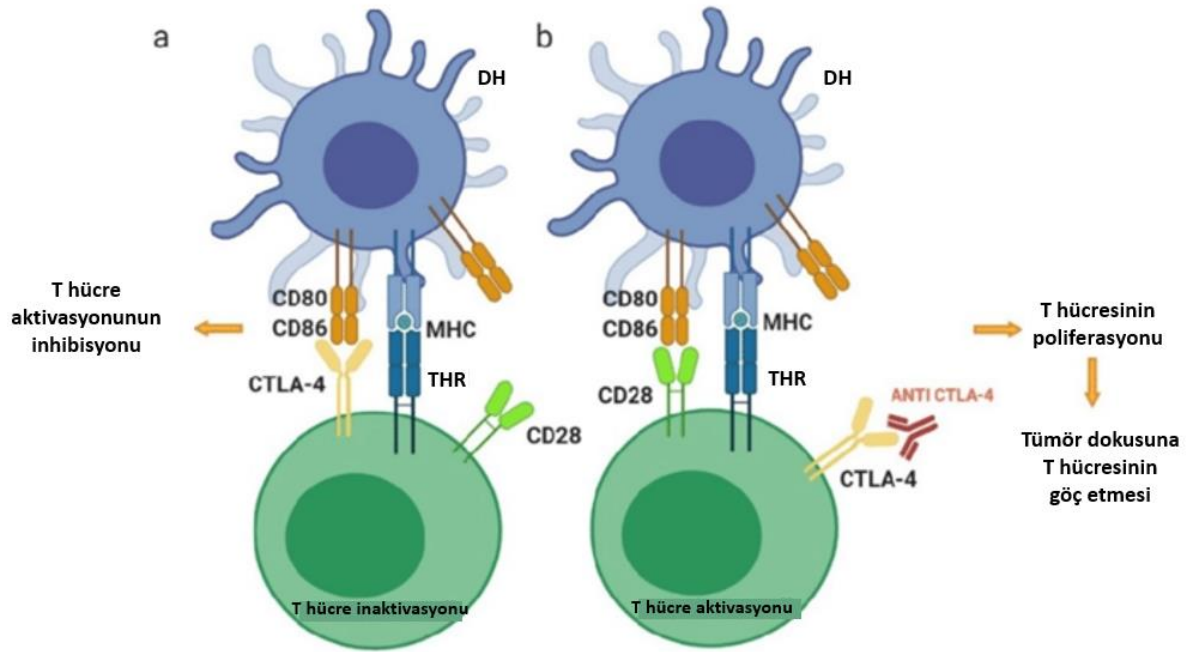
GM- CSF'yi adjuvan olarak kullanan bazı kanser DNA aşılıları şunlardır; Shi ve ark. (2006); GM-CSF'nin, boşaltılan lenf düğümündeki antijen sunucu hücre yoğunluğunu ve antijene özgü T hücrelerinin sıklığını ve IFN- γ salgılama miktarını artırarak oto-immün bir yanıtı, bir anti-tümör yanıtına dönüştürdüğünü belirtmişlerdir (Shi et al., 2006). Ruan ve ark.

(2017); daha önce çalıştıkları Müsin-1 ve VEGFR2 genini klonlayarak yapmış oldukları DNA aşısının etkinliğini arttırmak için başka bir plazmite GM-CSF adjuvan genini klonlayarak iki plazmitten oluşan bir DNA aşısı tasarlamışlardır. İntramuskuler olarak enjekte ettikleri alojenik akciğer kanseri modeli oluşturulan farelerde önceki çalışmalarına kıyasla tümör hacminin daha fazla küçüldüğünü ve farelerin daha uzun süre hayatta kaldığını belirtmişlerdir (Ruan et al., 2017). Bu sonuçlar ışığında ve GM-CSF proteininin yukarıda belirtilen özelliklerinden dolayı GM-CSF geni veya proteini, moleküllerin aşı çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında GM-CSF geni, güçlü bir adjuvan olarak bağışıklık sistemini destekleyerek immün yanıtı artırmak amacıyla pVAX1 içerisine klonlandı.

İmmün Kontrol Noktası İnhibitörü Olarak CTLA-4

Sitotoksik T-lenfosit antijeni (Ag)-4 (CTLA-4; CD152); T lenfositlerin yüzeyinde ifade olan, immün kontrol noktası olarak işlev gören bir yüzey proteinidir (Hodi et al., 2010). CTLA-4 aracılı immün kontrol noktası, lenf düğümlerinde ve diğer ikincil lenfoid organlarda (SLO'lar) yer alan ve antijeni tanıyan naif T hücrelerinin hazırlık aşaması sırasında T hücrelerinin antijenlere ilk yanıtı esnasında indüklenmektedir (Pardoll, 2012). T hücre aktivasyonu sırasında, hem CD4⁺ yardımcı T hücreleri hem de CD8⁺ sitotoksik T hücreleri üzerinde bulunan T hücre reseptörü (THR), antijen sunan hücreler (ASH'ler) üzerindeki majör histo-uyumluluk kompleks (MHC) moleküllerinde yer alan antijenlere bağlanır. Bu bağlanma, T hücre aktivasyonu için ilk sinyali sağlamaktadır. Ancak bu sinyal, T hücrelerini etkin bir şekilde aktive etmek için yeterli değildir. T hücre yüzeyinde ifade olan bir başka reseptör molekül ise CD28 molekülüdür. T hücrelerinin efektör hale gelebilmesi için yukarıda anlatılan bağlanmaya ek olarak ikincil uyarılar denen uyarıları da alması gerekmektedir (Rowshanravan et al., 2018) hücrelerinin bu ikincil uyarıları alabilmesi için ASH'lerin yüzeyinde bulunan B7 molekülünün, T hücre yüzeyindeki CD28 reseptörüne bağlanması gerekmektedir. Sağlıklı bireylerin T hücrelerinde bulunan CD28 reseptörü, yine T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CTLA-4 molekülünden daha fazla ve daha önce ifade olarak T hücre yüzeyine ekzositoz ile yerleşir. Ancak kanserli bireyin T hücrelerinde ise bu durum tam tersidir. Bu durumda kanserli bireyin T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CTLA-4 molekülü, CD28 molekülünden daha fazla ve daha önce ifade olacağından ASH'lerin yüzeyindeki B7 moleküllerine bağlanarak CD28:B7 bağlanmasını dolaylı olarak engellemiş olur (Glaffig et al., 2018; Qureshi et al., 2011) Böylece T hücreleri gerekli ikincil uyarıları alamadıkları için aktive olup efektör hale geçemezler ve kanser hücreleriyle savaşamazlar (Şekil 3). Kanser T hücrelerinde neden olduğu bu anormal durumun üstesinden gelip tekrar T hücrelerinin aktive olabilmesi için CTLA-4 bağışıklık sistemi kontrol noktasının blokajlanması düşünülmüştür. Yani kanserli bireyin T hücrelerinin aktive

olup tekrar efektör hale gelebilmesi için CTLA-4:B7 bağlanmasının, anti-CTLA-4 antikoruna ile engellenmesi gerekmektedir. CTLA-4:anti-CTLA-4 bağlanması gerçekleştiğinde serbest kalan CD28 reseptörü, sağlıklı bireyde olduğu gibi B7 molekülüne bağlanır. Sonuçta T hücre aktivasyonu tamamlanır ve ardından T hücresi efektör hale geçer (Jacobs et al., 2008; Yokosuka et al., 2010) (Şekil 3). CTLA-4 antikorunun kullanımı ile tümör ve immüno-supresif TME (tümör mikroçevre)'ye karşı bağışıklık tepkilerinden yararlanma kanser immünoterapisi için yeni bir çağ açmıştır (Leach et al., 1996; Sharma & Allison, 2015). CTLA-4 antikor (Ab) ilacı, ipilimumab, 2011 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kanser tedavisi için onaylanan ilk bağışıklık kontrol noktası blokaj (ICB) ilacıdır ve çok sayıda hastada faydalı olmuştur (Snyder et al., 2014; Thompson & Allison, 1997).



Şekil 3. CTLA-4 ve T hücre arasındaki ilişki; a) T hücre inaktivasyonu, b) T hücre aktivasyonu

(Alard et al., 2020)'den Türkçe'ye çevrildi.

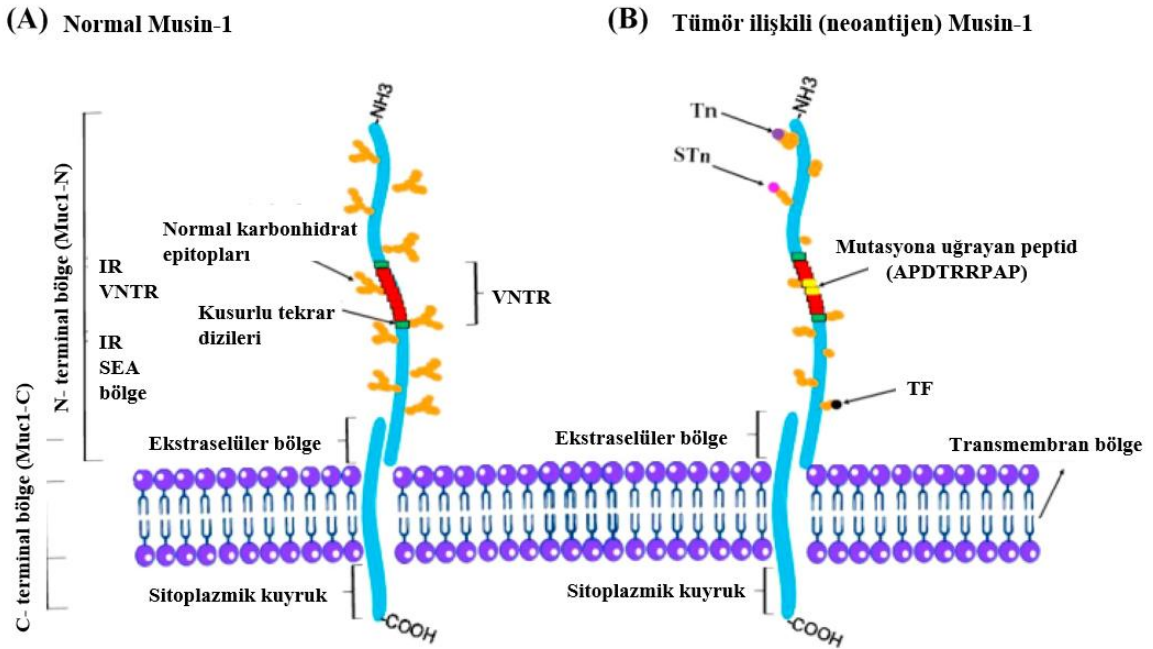
CTLA-4 antikoruna veya CTLA-4 genini bağışıklık kontrol noktası blokajlaması (ICB) olarak kullanan bazı kanser aşısı çalışmaları şu şekildedir. Mai ve ark. (2016) prostat kanseri fare modellerine uygulanmak üzere spesifik antijen olan PSCA ve immün blokajlamayı yapacak CTLA-4 genini içeren DNA aşısı tasarlamışlardır. Bu DNA aşısının farelerde sadece yüksek seviyede anti-PSCA antikoruna üretmekle kalmayıp aynı zamanda PSCA spesifik sitotoksik T hücre cevabını artırmıştır. Ayrıca CTLA-4 ve PSCA genini birlikte taşıyan DNA aşısının, sadece PSCA genini taşıyan DNA aşısına kıyasla farelerde tümör büyümesini daha güçlü bir şekilde engellediğini belirtmişlerdir (Mai et al., 2016). Öte yandan Zhao ve ark.

(2017), böbrek kanseri fare modellerinde G250 genini ve CTLA-4 antijeninin ekstraselüler domainini birlikte ifade eden bir DNA aşısıyla G250'ye spesifik T hücre sayısının arttığını belirtmişlerdir. Aynı şekilde G250 ve CTLA-4 antikorlarının da oldukça fazla arttığını belirtmişlerdir. Aynı zamanda tümör büyümesinin inhibisyonunun sadece G250 veya sadece CTLA-4 ifade eden plazmitle aşılana farelere kıyasla G250 ve CTLA-4 ifade eden plazmitle aşılana farelerde çok daha güçlü olduğunu göstermişlerdir (Zhao et al., 2017). Kos ve ark. (2019), ise pVAX1 vektörüne cilt kanserine karşı spesifik immün cevabın artmasını sağlayan ovalbumin (OVA) genini ve IL-2 adjuvan genini klonlayarak yapmış oldukları DNA aşısıyla birlikte immün sistem blokajını inhibe eden CTLA-4 ve PD-1 antikorlarını da kullanmışlardır. Böylece intramusküler olarak aşılana cilt kanseri modeli oluşturulan farelerde OVA proteinine spesifik CD8⁺ T hücrelerinin sayısının artmış olduğunu belirtmişlerdir. Ancak CTLA-4 ve PD-1 antikorlarının uygulanmadığı sadece pVAX1-OVA DNA aşısının uygulandığı fare grubunda ise CD8⁺ T hücrelerinin tümör bölgesine ulaşmadığını göstermişlerdir (Kos et al., 2019). CTLA-4 aşı çalışmalarıyla ilgili literatür taraması bize; CTLA-4'ün aşı uygulamalarının sadece antikor formunda değil, CTLA-4 geninin vektöre klonlanarak DNA aşısı olarak uygulandığında da antikor olarak uygulanan çalışmalarda ki gibi aynı etkiyi yaptığını göstermiştir. Çünkü DNA aşısında bulunan CTLA-4 geni de aşı uygulandıktan sonra hücre içerisinde CTLA-4 proteinine dönüşür. Vücutta CTLA-4 proteinini yabancı olarak algılayıp bu proteine karşı anti-CTLA-4 antikoru üretir. Vücudun kendisi tarafından üretilen bu antikor, ticari olarak üretilen ve şuan da tedavi amaçlı kullanılan ipilimumab^R antikoru gibi aynı amaçla kullanılabilir (Snyder et al., 2014). Bu sonuçlar ışığında ve CTLA-4 proteininin yukarıda belirtilen özelliklerinden dolayı CTLA-4 geni veya proteini, moleküllerin aşı çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında CTLA-4 geni, T hücrelerinin aktivasyonunu tamamlayarak onların etkili hale gelmesini sağlamak amacıyla; pVAX1-GMCSF içerisine klonlandı.

Ortak Tümör İlişkili Antijen Olarak Muc-1 Proteini

Mucin-1(Muc-1) proteini; akciğer, meme, pankreas, böbrek, kadın üreme sistemi ve mide'nin çoğu glandüler epitel hücresinin sadece apikal yüzeyinde ifade olan yüksek oranda glikozillenen, moleküler ağırlığı 200 kDa'dan büyük olan bir transmembran proteinidir (Gendler et al., 1990). Mucin-1 geni; akciğer kanseri, yemek borusu kanseri, mide kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri ve diğer kanser türlerinde anormal derecede ifade olmaktadır (Hayes et al., 1986; Safi et al., 1991). Mucin-1'in biyolojik yapısı, birbirine kovalent bağla bağlı olmayan C-terminal ve N-terminal fragmentinden oluşmaktadır. Membran yüzeyinde bulunan N-terminal fragmenti; sinyal peptidi (30-90), değişken sayıdaki ardışık tekrar dizileri olan VNTR (Variable number tandem repeat bölgesi) bölgesini içermektedir (Henderson et al.,

1998). Her VNTR; 20 amino asidin (HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA)/ (VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG) değişken sayıda tandem tekrarlarını (VNTR; 20-120 tekrar) içeren bir tip I transmembran proteindir ve tekrar dizileriyle çevrili kusurlu diziler içermektedir (Creaney et al., 2008). VNTR bölgesi; T lenfositlerin bağlanması için gerekli epitoplara (PDTRPA) içerdiğinden immünoterapi için potansiyel bölgedir. Ayrıca serin ve treonin kalıntıları açısından zengindir (Gendler et al., 1991; Y. F. Gong et al., 2017). Müsin proteinlerinin yüksek oranda glikozilasyonu; bu proteinlere yüksek yoğunluk ve hidrodinamik hacim sağlar, bu da proteinin biyolojik fonksiyonu için oldukça gereklidir (Y. S. Kim, 1992). Ancak malign tümörlerde aşırı ekspresyona uğrayan Müsin-1 geni yetersiz glikozilasyona uğrar (Şekil 4). Dolayısıyla bu peptit geninin aşırı ifadesi ve yetersiz glikozilasyonu, bu geni tümör ilişkili antijen olarak teröpic açıdan potansiyel hedef yapmaktadır (Braun et al., 1998; Y. Li & Cozzi, 2007).



Şekil 4. Normal musin-1 ve tümör ilişkili musin-1 proteininin farklılıkları.

(Tong et al., 2024)'den Türkçe'ye çevrildi.

Müsin-1 geni ile yapılan bazı DNA aşı çalışmaları şu şekildedir. Zhang ve ark. (2018), immün sistem blokajını kontrol eden PD-1 antijen genini tümör antijen geni olan Müsin-1 VNTR ve survivin genleriyle birlikte klonlayarak kolon ve akciğer kanserine karşı oluşturdukları DNA aşısının, önceki çalışmalarında kullandıkları Müsin-1 ve survivin içeren DNA aşısına kıyasla PD-1'in olduğu DNA aşısının tümör baskılamasını %17'den %30'a çıkardığını ve CD8⁺ T hücre sayısını ise 6,5 kat arttırdığı bildirmiştir (Liu et al., 2018). Aynı zamanda Zhang ve ark. (2008), Müsin-1 VNTR ve IL-2 genleriyle kombinledikleri DNA aşısının, farelerde hem humoral hemde hücrel bağışıklığı artırdığını ve bu DNA aşısının

Müsin-1' i çok fazla ifade eden tümörlere karşı koruyucu ve tedavi edici özellikte olduğunu da belirtmişlerdir (S. Zhang et al., 2008). Yine Zhang ve ark. (2008), 9 tekrarlı Müsin-1 VNTR peptid genini VR ökaryotik ekspresyon vektörüne klonlayarak DNA aşısı kontraktı tasarlamışlardır. Bu DNA aşısı kontraktı Lewis lung carcinoma (LLC) hücre hattına lipofektamin aracılığıyla aktarılmıştır. Aşısı kontraktıyla transfekte olan LLC hücreleriyle C57/BL6 fareleri aşılanmıştır. Böylece farelerde akciğer kanseri tümör modeli oluşturmuşlardır. Tümör baskılamasının, boş vektörle aşılanan farelere kıyasla ilgili geni bulunduran DNA aşısıyla aşılanan farelerde olduğunu belirtmişlerdir (ZHANG et al., 2008). Bununla birlikte Zhang ve ark. (2012), kolon kanseri için yaptıkları bir başka çalışmalarında Müsin-1 VNTR peptid genini içeren DNA aşısıyla aşılanan gönüllü hastaların serumlarında spesifik antikor seviyesinin %18,5 arttığını bildirmişlerdir (Y. Q. Wang et al., 2012). Diğer yandan Wang ve ark. (2014), Müsin-1 VNTR peptid genini adenoviral vektöre klonlayarak oluşturdukları DNA aşısını farelere DDA/MPL olarak adlandırılan lipid nanopartikülünü kullanarak uygulamışlardır. Uygulama sonucunda antijene spesifik T hücrelerinin salgıladığı IFN- γ seviyesinin 2 kat arttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda cilt kanseri tümör modeli oluşturulmuş farelerde, DNA aşısına spesifik immün cevap olarak tümör büyümesinin %60 oranında inhibe olduğunu göstermişlerdir (Y. Wang et al., 2014). Aynı şekilde Gong ve ark. (2017)' de; pVAX1 ekspresyon vektörüne Müsin-1 VNTR peptid dizisini klonlamışlardır. Ayrıca bu peptid dizisinin (GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH) C terminal ve N terminal bölgesine ayrı ayrı PDTRP aminoasit dizisini de ekleyerek pVAX1 vektörüne klonlamışlardır. C terminal ve N terminal bölgesine ayrı ayrı eklenen PDTRP aminoasit dizisinin T hücre aktivasyonuna olan etkisine bakmışlardır. C terminal bölgeye eklenen aminoasit dizisinin hem *in vivo*'da hemde *in vitro*'da daha güçlü immün yanıtı tetiklediğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde C terminal bölgeye eklenen aminoasit dizisinin spesifik CD8⁺ T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ üretimini de arttırdığını göstermişlerdir (Y. F. Gong et al., 2017). Bu sonuçlardan yola çıkılarak ve Muc-1 proteinlerinin yukarıda bahsedilen özelliklerinden dolayı Muc-1/ Muc-1 VNTR geni veya proteini, moleküllerin aşısı çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında Müsin-1 VNTR (Muc1-VNTR) peptid dizisi; tümörle ilişkili bir antijen olarak aşının etkinliğini artırmak amacıyla DNA aşısı kontraktlarını oluşturmak için pVAX1-CTLA4-GMCSF içerisine klonlandı.

Deney Hayvanlarının Temel ve Uygulamalı Bilimlerdeki Rolü

Temel biyoloji (örneğin, enfeksiyon hastalıkları, immünoloji, onkoloji, nöroloji, endokrinoloji ve davranış bilimleri) çalışmalarında kullanılan modeller, temel ve uygulamalı bilimlerde hayvan modellerinin en iyi araçlar olduğunu ortaya koymuştur. Çoğu tanınmış

araştırma merkezi/institüsü, hayvan modellerini geliştirmek ve sürdürmek için tam donanımlı hayvan tesislerine sahiptir. Diğer enstitüler ise yüksek düzeyde bilimsel araştırma merkezi statüsü kazanmak için hayvan tesislerini kurma aşamasındadır.

Hayvan modelleri ve insanlarla benzerlik

Uygun bir hayvan modeli geliştirmek için anatomi ve fizyoloji bilgisi şarttır. İnsana genetik veya taksonomik olarak uzak olan türler bile, hücre sinyalizasyonu, gelişim biyolojisi ve nörobiyolojinin temel ilkelerini incelemek için kullanılabilir. Bir hayvan modeli insanla ne kadar uyumluysa, fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerinin insan süreçlerine benzerliği de o kadar artar. Bu benzerlik derecesi "sadakat" kavramıyla tanımlanır. İnsana çok yakın olan yüksek sadakatli hayvan modelleri, genellikle büyük avantajlar sunar; ancak bu tür modelleri geliştirmek oldukça karmaşıktır. Buna rağmen, patofizyolojinin temel sorularını çözmek için en avantajlı modellerden biridir (Pandey & Dvorakova, 2019) .

Hayvan modellerinin türleri

Hayvan modelleri, kullanımlarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

a. Keşifsel Modeller

Biyolojik sistemlerdeki mekanizmaları anlamayı hedefler. Temel araştırmalarda veya hastalıklı ya da anormal biyolojik işlevlerle ilişkili mekanizmalar üzerinde çalışmak için kullanılır (Balls, 2013).

b. Açıklayıcı Modeller

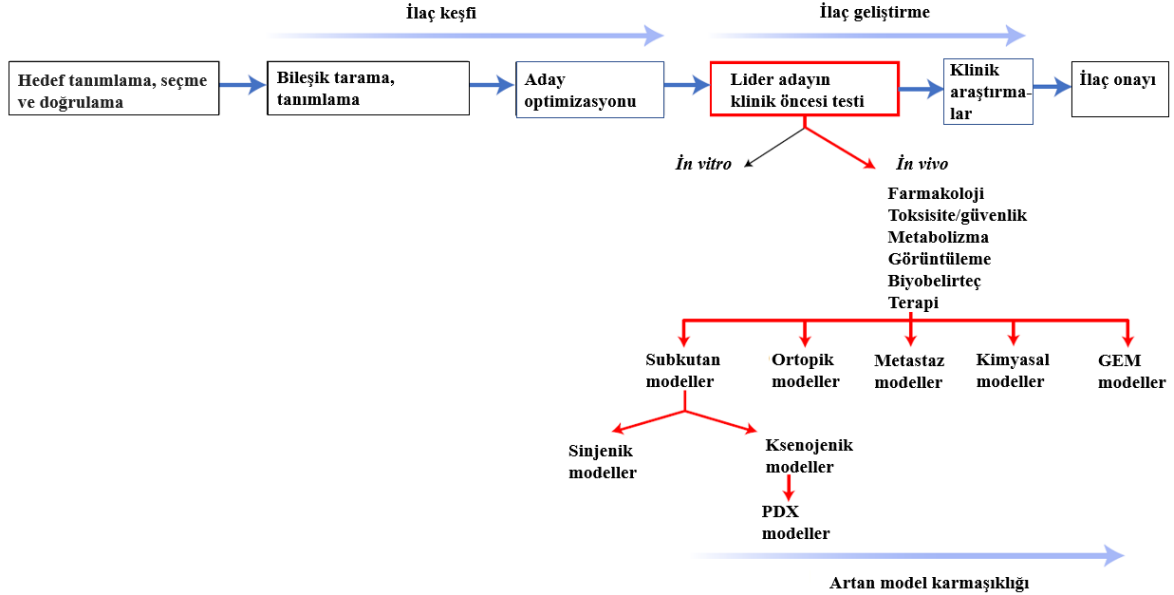
Zorlu biyolojik problemleri çözmeyi amaçlar. Bu model sistemi sadece hayvan kullanımına dayanmak zorunda değildir; karmaşık mekanizmaları çözmek için fiziksel, biyoenformatik veya matematiksel model sistemleri de olabilir (Balls, 2013).

c. Öngörücü Modeller

Preklinik ve uygulamalı araştırmalarda sıklıkla tercih edilen, insanlarda potansiyel etkileri incelemek amacıyla tasarlanmış özel bir hayvan modelidir. Aynı zamanda tedavilerin etkisini keşfetmek, tedavi değerlendirmesi, farmakokinetik/farmakodinamik incelemeler ve ilaçların toksisite değerlendirmesi için kullanılır (Andes & Craig, 2002; Lodise & Drusano, 2014)

Herhangi bir hastalık için ilaç geliştirme süreci ve subkutan tümör modelleri

Herhangi bir hastalık için ilaç geliştirme süreci, birçok aşamadan oluşan, yıllar sürebilen ve yüz milyonlarca liraya mal olabilen bir süreçtir (Ireson et al., 2019).



Şekil 5. Klinik öncesi kanser ilacı geliştirme

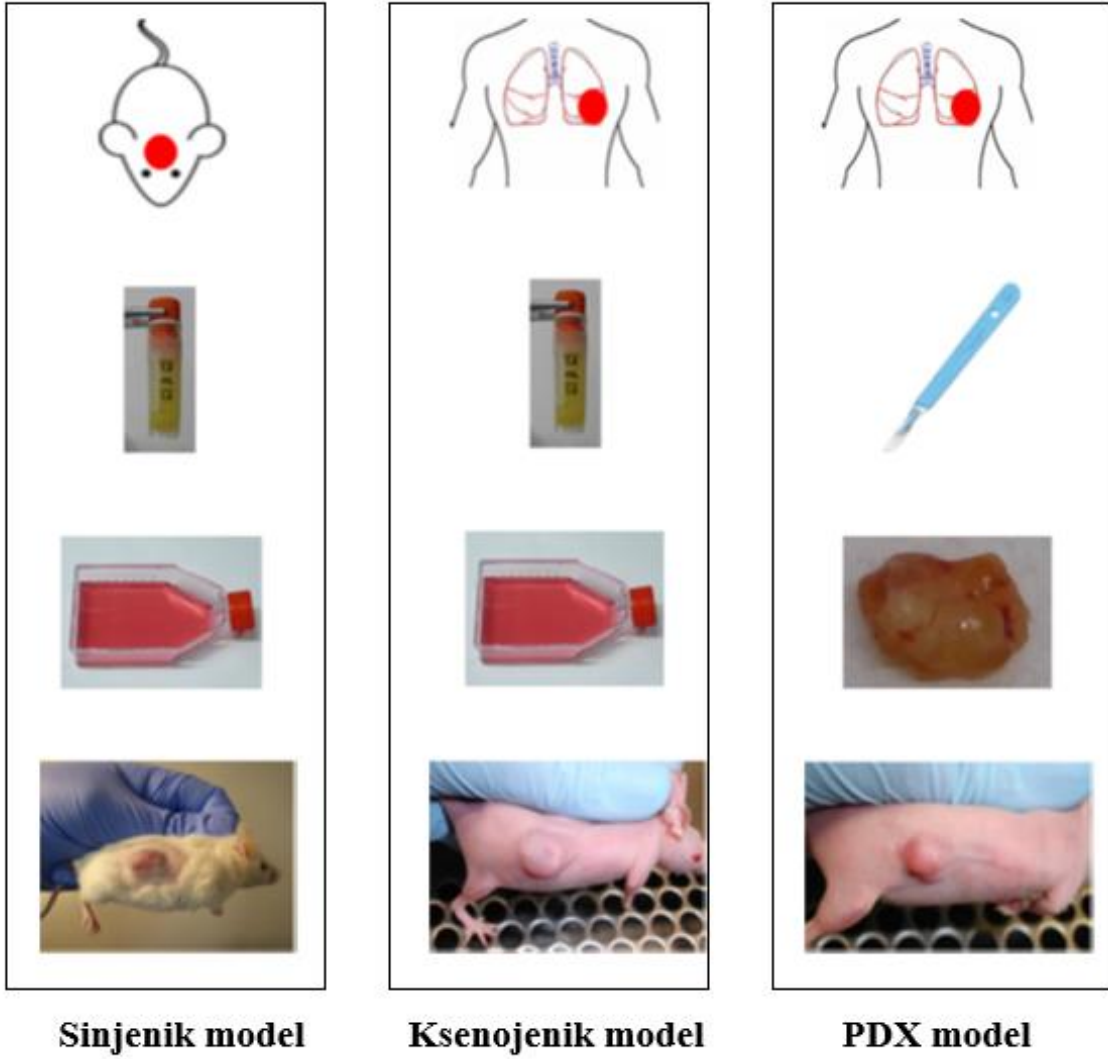
(Stribbling & Ryan, 2022)’den Türkçe’ye çevrildi.

İlaç geliştirme sürecinin ilk adımları, hücresel bir hedefin belirlenmesi, seçilmesi ve doğrulanmasını içerir. Bunu, bileşik kütüphanelerinin taranması gibi yöntemlerle potansiyel ilaç adaylarının belirlenmesi ve en umut verici adayların kimyasal veya biyolojik optimizasyonu takip eder. Sürecin sonunda, başarılı klinik çalışmaların (Faz I–III) ardından yeni bir ilacın düzenleyici kurumlar tarafından onaylanması yer alır (Herter-Sprrie et al., 2013). İlaç adaylarının prelinik analizleri, süreç boyunca *in vitro* ve *in vivo*’yu kapsayan başlangıçtan son aşamaya kadar uzanan bir değerlendirme içerir. Bu çalışmalar arasında toksikoloji/güvenlik, farmakokinetik, metabolizma, farmakoloji, biyobelirteç etkileri ve terapötik etkinlik yer alır; tümör modelleri, özellikle son üç çalışma türünde en kritik rolü oynar (Damia & D’Incalci, 2009).

Tümör modelleri kurulum açısından karmaşık olabilir, ancak bu modeller, tümör büyümesi, metastaz ve tedavinin etkileri hakkında ilaç geliştirme ve klinik çalışmalara ışık tutabilecek değerli bilgiler sağlayabilir. Subkutan tümör modeli, uygulanması kolay bir yöntemdir ve genellikle daha gelişmiş tümör modellerine geçmeden önce tercih edilir (A. S. Ahmad et al., 2015; Morton & Houghton, 2007). Özellikle, *in vitro* farmakolojik profilinin çıkarıldığı aynı insan veya fare tümör hücre hatları genellikle farelerde subkutan olarak nakledilebilir ve büyütülebilir. *In vitro* ve *in vivo* biyolojik etkilerin karşılaştırılması, bu süreçte

önemli bir aşamadır. Subkutan tümörler, 2D ortamdan daha karmaşık bir 3D yapıya sahip olup, ilaç dozları, hedef inhibisyonu ve tümör büyümesi gibi fenotipik etkilerin ilişkileri daha ayrıntılı bir şekilde incelenebilir. Bu modeller, ilaç endüstrisinde sıkça kullanılan ilk tümör modeli olarak kabul edilir, çünkü çoğu prelinik kanser araştırmasına yeni başlayanlar için başlangıç aşaması sağlar (Gengenbacher et al., 2017). Tümörler genellikle ya hücrelerin deri altına enjeksiyonu ya da katı tümör parçalarının deri altındaki kas boşluğuna yerleştirilmesiyle oluşturulur. Tümör hücreleri farelerden kaynaklanıyorsa, genetik olarak özdeş bir fare suşuna implante edildiklerinde model "sinjenik," farklı bir fare suşuna implante edildiklerinde ise "alojenik" olarak adlandırılır. Tümör hücreleri insan kökenliyse, model "ksenograft" olarak adlandırılır (tümör hücreleri veya dokusu bir donörden farklı bir türe nakledilir) (A. S. Ahmad et al., 2015). **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**

Hücre hatlarının laboratuvar koşullarında çoğaltılmasıyla elde edilen deri altı tümörler, “hücre hattı temelli ksenograftlar (CDX)” olarak isimlendirilir. Buna karşın, “hasta kaynaklı ksenograftlar (PDX)”, *in vitro* kültür veya genişleme yapılmaksızın doğrudan insan hastalardan alınan taze tümör dokusuyla başlatılır. Yalnızca sinjenik tümörler, tam bağışıklık sistemi yetkin farelerde başarılı bir şekilde büyüyebilir (Şekil 5). Subkutan tümör modellerinin oluşturulması Şekil 6’da gösterilmiştir (Gengenbacher et al., 2017).



Şekil 6. Subkutan modellerin farklı tipleri
(Stribbling & Ryan, 2022)’den Türkçe’ye çevrildi.

Avantajlar ve sınırlamalar:

- Bu modeller, kanser ve onun özgül özellikleri hakkında mevcut bilgilerimizin çoğunun temelini oluşturmakla birlikte, çoğunlukla *in vitro* kültürlerde ya da farelerde subkutan olarak yetiştirilen tümör hücre hatlarına dayanmaktadır (Sikder et al., 2003).
- Subkutan tümör modelleri, özellikle sinjenik olanlar, genellikle düşük maliyetlidir ve kurulumu kolaydır; fareye yalnızca bir tümör hücresinin enjekte edilmesi gerekir. Farklı sayılarda hücre enjekte edilmesi durumunda, tümörler genellikle 1-3 hafta içinde hızla büyüyerek deneylerin kısa sürede sonuçlanmasına olanak tanır. Ayrıca, tümörler deri altına yerleştiği için boyutları gözle görülür şekilde izlenebilir ve ölçüm yapılabilir (Frese & Tuveson, 2007).
- Bu modellerin en büyük dezavantajı, tümörlerin doğal gelişim alanı dışında büyümesidir. Klinik koşullarda, örneğin meme tümörleri memede, akciğer tümörleri akciğerde, prostat tümörleri prostatta gelişir; ancak subkutan büyüyen tümörler, çevre

doku etkilerinin gözlemlenmesini engeller. Subkutan tümörler, orijinal yerlerinde büyümediklerinden daha hızlı büyür ve basitlikleri, tümör büyümesinin farklı aşamalarını incelemeyi zorlaştırır (Klein, 2009). Ayrıca, insan tümör ksenograftları bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde büyütüldüğü için, ev sahibi bağışıklık sistemi ve inflamasyonun tümör büyümesi ve tedaviye yanıt üzerindeki rolü değerlendirilemez veya immünmodülatör ilaçlar test edilemez (Sharpless & Depinho, 2006).

Başka sınırlamalar şunlardır:

- Enjekte edilen hücrelerden tümörlerin gelişme oranı (başarı oranı) farklı tümör hücre hatları arasında değişiklik gösterebilir (Fidler & Kripke, 2015).
- Tümör büyüme hızı, aynı deney grubundaki bireysel fareler arasında önemli ölçüde değişebilir ve bu durum deney tasarımında dikkate alınmalıdır (Fidler & Kripke, 2015).
- Klinik hastalarda kanserle ilgili ölümler, çoğunlukla ana tümörün büyümesinden ziyade, metastazların uzak organlara yayılması ve burada büyümesi nedeniyle görülür. Ancak subkutan tümör modelleri genellikle metastaz üretmediğinden, bu modeller metastatik hastalıkların gelişimini ya da tedavi süreçlerini incelemek için uygun değildir (Spano et al., 2012).

Bazı istisnalar vardır:

- Fare Lewis akciğer karsinomu, sinjenik bir model olarak büyütüldüğünde subkutan bölgeden akciğerlere ve akciğer metastazlarının tedavisini incelemek için kullanılabilir (Bugge et al., 1997).

PDX modelleri ve CDX modelleri karşılaştırması

Hasta kaynaklı ksenograft (PDX: Patient-Derived Xenograft) modelleri, hücre hattı kaynaklı modellere (CDX: Cell Line-Derived Xenograft) göre daha karmaşık olmasına rağmen, primer tümörün histolojik yapısını, heterojenliğini ve gen ekspresyon profilini daha doğru bir şekilde temsil eder (Hidalgo et al., 2014; Tentler et al., 2012). Bu şekilde, *in vitro* koşullarda yapılan seçimler engellenmiş olur ve dolayısıyla fenotipik değişikliklerin (örneğin, plastik kültür kaplarında hızlı büyüme gibi) oluşması engellenir (DeRose et al., 2011).

PDX modelleri, CDX'lerden daha iyi bir şekilde hasta yanıtını tahmin edebilir (Siolas & Hannon, 2013) ve kişiselleştirilmiş tıpta önemli bir rol oynayabilir. Ancak PDX modelleri oluşturma süreci pahalı, zaman alıcı ve teknik olarak zordur. Ayrıca, PDX'lerin geliştirilmesi sırasında insan tümör mikroçevresi hızla fare mikroçevresiyle değişir; bu durum, tümör mikroçevresini hedef alan ajanların test edilmesini etkileyebilir (Delitto et al., 2015).

Biyolüminesans teknolojisi

Subkutan modellerde biyolüminesans tümör hücrelerinin kullanılması, tümör biyolojisi ve ilaç testleri hakkında bilgi sağlar. Örneğin, tümörlerin metastaz yapmasını izlemek veya tedavi edilen hücrelerin yanıtını değerlendirmek için kullanılabilir. Ancak biyolüminesans görüntüleme, özel ekipman gerektirir ve bazı durumlarda bağışıklık tepkilerini artırabilir (Baklaushev et al., 2017; Day et al., 2014)

Kanser Tedavisi için Fare Modellerinin Seçimi

Kanserin karmaşık biyolojisini yansıtan binlerce tümör hücre hattı mevcuttur ve bunlar, kanser türlerinin büyümesi, metastazı ve tedaviye yanıtını incelemek için yaygın olarak kullanılır. Bu hücre hatları, genellikle preklinik deneylerde kullanılır. Subkutan tümör modeli kurmak, bu tür işlemlere aşına olmayanlar için zorlayıcı olabilir, ancak genel protokoller çoğu kanser türüne uygulanabilir. İnsan akciğer adenokarsinom hücre hatları için geliştirilen adımlar, diğer tümör türleri için de başarıyla uyarlanmıştır ve bu protokol, subkutan tümör hücre enjeksiyonu içeren modellerin çoğunda geçerlidir (Olson et al., 2018).

Deney tasarımı

Fare modelinin seçimi

Farelerin, Charles River, Envigo veya Jackson Laboratory gibi saygın ve güvenilir tedarikçilerden temin edilmesi gerekmektedir. Bu, farelerin refahı, sağlık durumu ve genetik altyapısına daha fazla güven duyulmasını sağlar. Subkutan tümör modelinin türü, hangi fare türünün kullanılacağını belirleyen en önemli faktördür (Olson et al., 2018).

Eğer bir sinjenik model gerekiyorsa, uygun genetik uyuma sahip inbred fare türleri tercih edilmelidir; en yaygın olarak kullanılanlar C57Bl/6 ve Balb/c'dir. C57BL/6 fareleri hem dayanıklı hem de nispeten kolay üretilir olmaları nedeniyle en çok tercih edilen laboratuvar kemirgenidir (Prochazka et al., 1992). Bu tez çalışmasında, belirtilen nedenlerden dolayı sinjenik tümör modeli oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla, LLC1 fare akciğer kanseri hücre hattı ve C57BL/6 fareleri kullanılmıştır.

Eğer bir ksenograft modeli gerekiyorsa, bağışıklık sistemi baskılanmış fareler gereklidir. Bağışıklık baskılaması sırasına göre kullanılan fare türleri şunlardır: Athymic nude fareler, ağır kombine immün yetmezlikli (SCID) fareler, nonobez diyabetik/ağır kombine immün yetmezlikli (NOD/SCID) fareler ve NOD SCID gamma (NSG) fareleri (interlökin 2 reseptör gama genindeki ek mutasyon nedeniyle) (Floersheim et al., 1980).

NSG fareleri, olgun T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü hücre aktivitelerinin çoğundan yoksundur ve doğuştan gelen bağışıklık ile sitokin sinyal yollarında birçok eksiklik taşır. Bu tür fareler, bağışıklık sistemindeki en büyük eksikliklere sahip olup, genellikle en yüksek tümör tutunma oranını gösterirler. Ancak, birçok insan tümör hücre hattı için bağışıklık sistemi baskılanmış nude ve SCID fareler de yeterli olabilir (Floersheim et al., 1980).

Tümör hücrelerinin seçimi

Tümör hücrelerinin temin edilmesi, daima güvenilir kaynaklardan, örneğin Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) ya da Avrupa Doğrulanmış Hücre Kültürleri Koleksiyonu (ECACC) gibi yerlerden yapılmalıdır. Bu şekilde, hücrelerin patojenlerden arındırılması sağlanırken, kimlik doğrulaması da kısa tandem tekrar (STR) profillemesi ile yapılmalıdır. Kullanım öncesi, hücre hatları çapraz kontaminasyon ve yanlış tanımlama açısından test edilmelidir. Bu tür doğrulamalar, Uluslararası Hücre Hattı Doğrulama Komitesi (ICLAC) Yanlış Tanımlanmış Hücre Hatları Kaydı üzerinden çevrimiçi olarak gerçekleştirilebilir (Holliday & Speirs, 2011; Prasad & Gopalan, 2015)

Doku kültürü sırasında enfeksiyonların önlenmesi için aseptik tekniklerin uygulanması gerekmektedir. Mikoplazmalar, kültürlerde yaygın enfeksiyon kaynaklarıdır. Bu bakteriler, hücre duvarı içermeyen, submikrometre boyutlarında ve çoğu antibiyotiğe dirençli olup, insan (örneğin *Mycoplasma orale*) ve hayvan (örneğin *Acholeplasma laidlawii*) kaynaklı olabilir. Mikoplazmalar, hücrelerde metabolizmayı bozabilir, proliferasyonu yavaşlatabilir ve kromozomal anormallikler oluşturabilir; bu da tümör büyümesi ve sonuçların doğruluğunu olumsuz etkileyebilir (Nikfarjam & Farzaneh, 2012).

Enfeksiyon riski, serum veya medyumun 0,1 µm filtrelerle filtrasyonu ile azaltılabilir. Kültürdeki hücreler, mikoplazma enfeksiyonlarına karşı periyodik olarak taranmalıdır. Lonza Mycoalert Mikoplazma Tespit Kiti gibi kitler, bu testi hızlı ve pratik bir şekilde yapmayı sağlar ve yaygın mikoplazma türlerini tespit edebilir (Stribbling & Ryan, 2022).

Tümör hücrelerinin in vivo kullanımı

Büyük bir fare grubuna tümör hücreleri enjekte etmeden önce, seçilen hücrelerin gerçekten *in vivo* tümör oluşturduğunu ve hedeflenen gen veya yolları ifade ettiğini doğrulamak çok önemlidir. Bu, ilaç keşif sürecinin erken aşamalarında belirlenmelidir. Yeni bileşiklerin ve hedeflerin erken aşama araştırmaların da hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerde aynı hücre hattının kullanılması yararlı olabilir. Bu yaklaşım, kültür ortamından tüm hayvana taşınan etkilerin daha iyi anlaşılmasını sağlar (X. Zhang et al., 2013).

Son dönemde, hücre hatlarının moleküler analizlerindeki gelişmeler (örneğin, <https://depmap.org>), araştırmacıların klinik örneklerle en uygun gen ekspresyon profiline sahip hücre hatlarını belirlemelerini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, mevcut literatür (örneğin, PubMed) ve hücre tedarikçilerinin sağladığı web kaynakları, hücre hattının tümör oluşum kapasitesi hakkında önemli bilgiler sunabilir. Yeni bir subkutan tümör modeli oluşturmak için, farklı hücre sayılarıyla 4-5 fareye enjeksiyon yaparak bir pilot deney düzenlenmelidir. Eğer model daha önce kullanılmışsa, yayınlanmış literatürden referans alarak uygun hücre sayısı aralığı belirlenebilir. Çoğu tümör hücre hattı için fare başına $0,5-10 \times 10^6$ hücre sayısı uygundur (Dall et al., 2015).

Enjeksiyon sonrası, tümör büyümesi her grup farede 60 gün boyunca izlenerek, tümörlerin 1-3 hafta içinde iyi bir şekilde yerleşmesini sağlayacak uygun hücre sayısı belirlenmelidir. Nadiren, tümörler kendiliğinden gerileyebilir; 60 günlük gözlem süresi, bunun değerlendirilmesini sağlar. Kendiliğinden yüksek düzeyde tümör gerilemesi gösteren bir fare modeli, yeni bileşiklerin anti-tümör etkilerini değerlendirmek için pratik olmayacaktır. Ancak, yalnızca ara sıra gerileme meydana geliyorsa, tam ölçekli bir deneyde tümör hücreleri enjekte edilen fare sayısı artırılabilir (Ström et al., 2012).

Tümör hücrelerinin enjeksiyonu

Tümör hücreleri %100 PBS, salin veya doku kültürü ortamında hazırlanarak enjekte edilebilir; tümü, katı bir subkutan tümör büyümesiyle sonuçlanabilir. Tümör büyümesini teşvik etmek için, hücrelerin bazal membran bileşenleriyle zenginleştirilmiş bir ortamda süspansiyon halinde bulunması, başarılı tümör gelişimini destekleyebilir. Bu amaçla en yaygın kullanılan hazırlık Matrigel'dir. Matrigel, Engelbreth-Holm-Swarm fare sarkoma hücreleri tarafından salgılanan, laminin, kollajen IV ve büyüme faktörleri gibi birçok ekstraselüler matriks proteini açısından zengin jelatinimsi bir proteindir.

Matrigel, tümör hücrelerini besler ve enjeksiyondan sonra tümör tutunma ve büyüme oranlarını artırır (Fridman et al., 1991; Mullen et al., 1996). Matrigel'in, ~ 4 °C'de sıvı hale gelmesi ve enjeksiyon sonrası 37 °C'de katılaşması gibi kullanışlı özellikleri vardır. Bu yöntem, hücrelerin düzgün bir şekilde yerleşmesini sağlayarak daha homojen yapıda bir tümör oluşumuna katkı sağlar. Matrigel'in yanı sıra, Geltrex, Cultrex ve HyStem gibi benzer matrisler de kullanılabilir.

Enjeksiyon noktası

Tümör hücrelerinin subkutan bölgeye enjekte edileceği yer, gerçekleştirilecek deneyin amacına göre belirlenir. Beş ana subkutan bölge şunlardır: Yan bölge, alt sırt, üst sırt (omuz bıçakları arasında), arka bacak, meme yağı pedi (dördüncü inguinal meme altı).

Biyobelirteç veya terapi çalışmalarında tümör büyütmek için yan bölge veya alt sırt genellikle tercih edilir; bu bölgelerdeki tümörler, fareleri sedasyona veya anesteziye gerek kalmadan kolayca gözlemlenebilir ve ölçülebilir. Üst sırt, görüntüleme çalışmaları için uygun bir bölgedir. Meme yağı pedi, genellikle meme kanseri hücrelerinin büyümesini, yayılmasını ve tedaviye karşı verdiği yanıtları araştırmak için tercih edilir (Tomayko & Reynolds, 1989).

Subkutan tümör boyutunun ölçülmesi

Tümör boyutları, genellikle bir kumpas yardımıyla en pratik şekilde belirlenir. Bu aletlerin iki ana türü vardır: kadranlı ve elektronik. Deney süresi boyunca kullanılan kumpas seti sabit kalmalıdır. Tümörler hem iki boyutlu hem de üç boyutlu olarak ölçülebilir; üç boyutlu ölçümler, en doğru hacim bilgisini sunar. Tümörün en uzun boyutu (L, uzunluk), buna dik açıyla ölçülen genişlik (W, genişlik) ve yüksekliği (H, derinlik) ölçülür. Yüksekliği ölçerken genellikle zorluk yaşanabilir, ancak farenin deri kısmını güvenli bir şekilde tutmak (scruffing) bu işlemi kolaylaştırır. Tümör boyutları, bir ondalık basamağa kadar kaydedilmelidir. Örneğin, 3,19 mm genişliğindeki bir tümör 3,2 mm olarak rapor edilmelidir (Tomayko & Reynolds, 1989).

Birçok farklı denklem tümör hacmini belirlemek için kullanılmıştır, ancak deney içi ve deneyler arası veri tutarlılığını sağlamak için aynı denklem kullanılmalıdır. Elipsoidin hacmi için kullanılan denklem $[V = (L \times W \times H) \times 0,52]$ yaygın bir şekilde tercih edilir ve çeşitli tümör şekilleri ve boyutları için kütle ve hacmi en iyi şekilde temsil ettiği gösterilmiştir. Tüm farelerde ve tüm zaman noktalarında tümör boyutlarının aynı araştırmacı tarafından ölçülmesi gerekir. Araştırmacıya özgü ölçüm farklılıkları deneylerde önemli varyasyona yol açabileceğinden bundan kaçınılmalıdır. Ek olarak, tümör ölçümlerini yapan araştırmacının, her grubun hangi tedavi aldığını bilmemesi (blinding) önyargıyı önleyecektir (Tomayko & Reynolds, 1989).

Tüm *in vivo* deneylerde genellikle bir maksimum tümör boyutu belirlenir; bu boyuta ulaşıldığında fare insancıl bir yöntemle ötenazi edilmelidir. Maksimum ortalama tümör çapı ~15 mm olarak önerilmiş olsada, kurumsal yönergeler ve etik inceleme kurulları fare refahını artırmak için daha küçük bir boyut önerebilir. Bir fareye her iki tarafına tümör enjekte ediliyorsa, bu iki tümörün toplam boyutu, tek bir tümör için öngörülen maksimum boyuttan

daha büyük olmamalıdır. Tüm tümör boyutlarını ve ilgili hacimleri kaydetmek için elektronik tablolarda (örneğin, Microsoft Excel) kayıt tutulmalıdır (Stribbling & Ryan, 2022).

Farelere bileşik uygulaması

İlaç dozu, uygulama yöntemi ve takvimi mümkün olduğunca klinik durumu yansıtacak şekilde belirlenmelidir. İlaçlar genellikle üç ana şekilde uygulanır: ağız yoluyla (oral gavaj), intraperitoneal enjeksiyon veya intravenöz enjeksiyon. Daha az sıklıkla, ilaçlar içme suyuna veya yiyeceğe sabit bir konsantrasyonda eklenir ve doz, tüketilen su veya yiyecek miktarına göre hesaplanır. Bazı durumlarda tedavi, doğrudan tümör bölgesine intratümoral enjeksiyonla veya cilde topikal olarak yapılabilir (Tomayko & Reynolds, 1989).

En uygun dozlama için steril su, salin veya PBS gibi çözücüler tercih edilmelidir çünkü bunlar fareler tarafından iyi tolere edilir ve formülasyona bağlı yan etkiler riski düşüktür. İlaçlar, nötr pH'lı çözeltilerde çözünmediğinde, daha karmaşık formülasyonlar gerekebilir. Örneğin, bir çözeltinin pH veya ozmolaritesi değiştirilerek, dimetil sülfoksit (DMSO), etanol, polietilen glikol (PEG) gibi çözücüler eklenebilir ya da siklodekstrinler kullanılabilir (Stribbling & Ryan, 2022).

Bazı ilaçlar, çözelti yerine süspansiyon şeklinde hazırlanabilir. Sulu tamponlardaki ilaç süspansiyonları ve çözeltileri, intravenöz dahil her türlü uygulama için güvenlidir. Ancak, DMSO veya PEG içeren gibi karmaşık formülasyonlar genellikle oral veya intraperitoneal uygulamalar için uygundur. Yeni bileşiklerin formülasyonları, preklinik testlerde genellikle bireysel olarak optimize edilir. İdeal olarak, ilaç, klinik uygulamayı taklit eden bir yöntemle (örneğin, ağız yoluyla alınan ilaçlar için gavaj) uygulanmalıdır. Ancak, henüz oral biyoyararlanımı kanıtlanmamış ilaçlar genellikle intraperitoneal olarak verilmelidir (Tomayko & Reynolds, 1989). Fare modellerinde aşı uygulamaları ise, aşının türüne ve hedeflenen bağışıklık yanıtına göre farklılık göstermektedir. Genellikle intraperitoneal (i.p.), subkutan (s.c.) veya intramüsküler (i.m.) yollar tercih edilir. DNA aşıları çoğunlukla intramüsküler olarak 10–100 µg dozda, 50–100 µL hacimde uygulanır. Bağışıklık tepkisini artırmak amacıyla adjuvan veya immünomodülatörler eklenebilir. Aşılama protokolleri genellikle 1-2 hafta aralıklarla uygulanan 2-3 dozdan oluşur. Uygulama sonrası bağışıklık yanıtı ve tümör gelişimi izlenir, hayvan refahı gözetilir (Maira-Litrán, 2017).

Farelerin tutulması

Farelerin uygun şekilde yerleştirilmesi, subkutan fare tümör modelinin başarılı bir şekilde kurulması için kritik bir adımdır. Fareleri düzgün bir şekilde sabitleyebilmek hem tümör hücrelerinin subkutan enjeksiyonu hem de test bileşiklerinin uygulanması (intraperitoneal, oral

veya subkutan) ve tümör hacminin doğru şekilde ölçülmesi için gereklidir. Farelerin doğru tutulması hem fareler hem de araştırmacılar için stresi azaltır.

Anesteziklerin kullanımı en aza indirgenmelidir, çünkü bu maddeler tümör gelişimini etkileyebilir. Örneğin, inhalasyon anestezi ajanı olan izofloran, bağışıklık sistemi aktivitesini azaltarak tümör büyümesini teşvik edebilir. Bununla birlikte, lidokain ve bupivakain gibi lokal anesteziklerin tümör büyümesini inhibe edici etkiler gösterebileceği belirtilmiştir (Huitink et al., 2010).

Fare refahı ve ötenazi

Hayvanların iyi olma hali, fareler veya diğer türlerle yapılan tüm deneylerde en öncelikli husus olmalıdır. Deney sırasında refahı olumsuz etkileyen belirtiler (örneğin, kilo kaybı, göz, kulak ve burundan akıntı, ishal, kaşeksi vb.) gözlemlendiğinde fare insancıl bir şekilde ötenazi edilmelidir.

Fare ötenazisi için önerilen iki aşamalı yöntem, ilk olarak fareyi karbondioksit maruz bırakarak veya anestezik pentobarbital ile aşırı doz vererek öldürmek, ardından ölümün fiziksel bir yöntemle (örneğin, servikal dislokasyon veya büyük bir kan damarını keserek eksanguinasyon) doğrulanmasını içerir (Stribbling & Ryan, 2022).

Atık yönetimi

Bütün laboratuvar çalışmaları, ulusal ve yerel sağlık ile güvenlik düzenlemelerine sıkı bir şekilde riayet edilerek gerçekleştirilmelidir. Kullanılan iğne, neşter bıçağı gibi kesici atıklar uygun bir plastik kaba konulmalı ve bertaraf edilmek üzere laboratuvarında saklanmalıdır. Hayvan dokuları gibi biyolojik atıklar genellikle plastik torbalara konur, -20 °C’de saklanır ve bertaraf edilir. Atıkların imhası sırasında çevreye zarar vermeyen yöntemler tercih edilmelidir (MacCallum, 2010).

MATERYAL VE METOD

Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 1’de verildi.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Cihazların İsimleri, Marka ve Model Bilgileri

Cihaz Adı	Marka-Model
Çeker ocak	Tolkim
Elektroforez güç kaynağı	Bio-rad, Power pac universal power supply
Elektroforez yürütme tankı	Bio-rad, WideMini-Sub Cell GT
Flow (Akım) sitometri cihazı	Beckman Coulter CytoFLEX
Hassas Terazı	Shımadzu
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph
Isıtmalı, çalkalamalı inkübatör	JSR, JSSI300C
Işık mikroskobu	ZEISS Primo Star
İnkübatör	NUAIRE
Kemilüminesans jel dökümantasyon sistemi	Bio-Rad Gel Doc XR+
Mikrobiyoloji biyogüvenlik kabini	ESCO, Laminar flow cab
Mikrodalga fırın	Arçelik, MD574S
Mikroplaka floresan spektrofotometre	Agilent, Cary Eclipse
Mikroplaka spektrofotometresi (ELISA Okuyucu)	Biotek Epoch
Mikrosantrifüj	VWR, Microstar 12
Mini santrifüj	IKA mini G
Otoklav	HMC Hirayama
PCR cihazı	Bio-rad CFX96 TOUCH REAL TIME PCR
pH metre	Mettler Toledo
Saf su cihazı	Millipore Direct-Q 8 UV
Santrifüj	HETTİCH, Rotofix 32A- Beckman Coulter
Sıcaklık kontrollü çalkalayıcı	Eppendorf, Thermomixer C
Su banyosu	Memmert, WNB14
Ters ışık mikroskobu	ZEISS Primovert
Ultrasonik yıkama banyosu	Isolab
UV-görünür spektrofotometre	Shimadzu, UV-1800 240V
Vorteks	Heidolph

Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve kitler Tablo 2’de verildi.

Tablo 2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Kitler

Kimyasal/Kit Adı	Marka
Agaroz	Sigma
Amfisilin	Sigma Aldrich
Asetik asit (CH ₃ COOH)	Merck
Kanamisin	Sigma Aldrich
CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	Invitrogen™

Tablo 2. devamı ...

Kimyasal/Kit Adı	Marka
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
DMEM/F12 (glukoz ve L-glutamin içeren besiyeri)	Gibco
PureLink™ Expi endotoksin içermeyen maksi plazmit saflaştırma kiti	Invitrogen
Etanol (EtOH)	Isolab
Fast Digest <i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , <i>XbaI</i> , <i>Xho</i>	ThermoFisher
Fenol/kloroform/izoamil alkol	Sigma Aldrich
Fetal sığır serumu (FBS)	Capricorn
Fosfat tampon (PBS)	Sigma Aldrich
Gliserol	Isolab
Gümüş nitrat (AgNO_3)	Merck
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma Aldrich
Jel yükleme boyası	ThermoFisher
Jel yükleme boyası	SNP
GeneRuler 100 bp plus DNA belirteci	ThermoFisher
Kloroform	Sigma Aldrich
LB agar	LAB/Neogen
LB broth	LAB/Neogen
MEGAquick-spin™ total fragment DNA saflaştırma kiti	IntronBiotechnology
UltraPure™ DNase/RNase içermeyen distile su	Invitrogen
Paraformaldehit	Sigma Aldrich
Penisilin-streptomisin	Gibco
Phusion High-Fidelity DNA polimeraz	ThermoFisher
PureLink® hızlı jel ekstraksiyon kiti	Invitrogen
PureLink-Hi-Pure plazmit DNA saflaştırma mini kiti	Invitrogen
RedSafe™ Nükleik asit boyama çözeltisi	IntronBiotechnology
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma Aldrich
50X TAE (Tris bazı, asetik asit ve EDTA)	Thermo
Tris-EDTA tampon	Multicel
Tripsin-EDTA	Gibco

Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponların Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan besiyeri, çözelti ve tamponların hazırlanışı Tablo 3'te verildi.

Tablo 3. Çalışmada Kullanılan Besiyeri, Çözelti ve Tamponların Hazırlanışı

Adı	Hazırlanışı
%1 SDS	0,5 g SDS tartılıp 50 ml saf suda çözöldü.
1XPBS	0,03 KCl, 1,2 gr NaCl, 0,036 gr KH_2PO_4 ve 0,213 gr Na_2PO_4 140 mL saf su içerisinde çözöldü. Otoklavlanarak steril edildi.

Tablo 3. devamı ...

Adı	Hazırlanışı
1XPBST	140 mL 1XPBS içerisine 75 µL Tween-20 eklendi ve çözeltinin son hacmi 150 mL'ye tamamlandı.
%5'lik bloklama çözeltisi	1,5 gr yağsız süt tozu 20 mL 1XPBST içerisinde çözülür. Son hacim 30 mL'ye tamamlandı.
TAE (1X)	50X TAE, saf su ile seyreltilerek 1 L, 1X TAE hazırlandı.
Tespit çözeltisi	60 mL saf su, 30 mL etanol ve 10 mL asetik asit karıştırılarak hazırlandı.
Redüksiyon çözeltisi	4,8 g sodyum asetat, 45 mL etanol ve 80 mL saf su karıştırılarak bir çözelti hazırlandı. Çözeltinin pH'ı asetik asit ile 6'ya ayarlandı. Daha sonra, çözeltiye 150 mg sodyum tiyosülfat eklenip tamamen çözünmesi sağlandı. Ardından, çözeltiye 3 mL glutaraldehit eklendi ve toplam hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlandı.
Boyama çözeltisi	100 mg gümüş nitrat, 100 mL saf su ve 30 µL formaldehit karıştırılarak hazırlandı.
Yıkama çözeltisi 1	3,75 g sodyum klorür, 270 mL saf su ve 120 µL formaldehit karıştırılarak hazırlandı.
Yıkama çözeltisi 2	1 mL gliserol ve 12,5 mL asetik asit eklenerek hazırlandı.

Tasarlanan Primerler ve Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri

GM-CSF, CTLA-4 ve Muc1-VNTR genlerine özgü restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini içeren primerler (GMCSF-F, GMCSF-R, CTLA4-F, CTLA4-R, Muc1VNTR-F ve Muc1VNTR-R), uygun erime sıcaklıkları (T_m) hesaplanarak www.thermofisher.com (T_m calculator) aracılığıyla tasarlandı (Tablo 4).

Tablo 4. Tasarlanan Primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Taq Pol. T _m (°C)	HF Pol. T _m (°C)	%GC	Uzunluk (bp)
<i>Xho</i> I-GMCSF-F	5'-ATTCTCGAGATGTGGCTGCAGA -3'	55,27	62,4	48,0	23
<i>Xba</i> I-GMCSF-R	5'- ATTCTAGATCACTCCTGGACTGG -3'	55,27	60,0	48,0	23
<i>Not</i> I-CTLA4-F	5'- AATTGCGGCCGCATGGCTTGCTGGG-3'	65,85	76,0	65,0	26

Tablo 4. devamı ...

Primer Adı	Primer Dizisi	Taq Pol. Tm (°C)	HF Pol. Tm (°C)	%GC	Uzunluk (bp)
<i>XhoI</i> -CTLA4-R	5' AATTCTCGAGGGGACCTGGGTTAGAC-3'	61,12	65,0	54,0	26
Muc1VNTR-F	5'- ACTCACTATAGGGCGAATTG -3'	55.0	55,0	57,0	20
Muc1VNTR-R	5'- ATTTCCCGACTGGAAAGCG -3'	57.0	57,0	57,0	19

pVAX1, pVAX1-GMCSF, pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF plazmitlerini taşıyan doğru bakteri transformantlarını belirlemek ve ilgili vektörlere yerleştirilen genlerin nükleotid dizisini PCR ile belirlemek için Tablo 5'te verilen primerler kullanıldı.

Tablo 5. pVAX1'e Ait Primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Tm (°C)	%GC	Uzunluk (bp)
CMV-F	5' - CGCAAATGGGCGGTAGGCGT -3'	57.93	65.0	20
BHG-R	5' - TAGAAGGCACAGTCGAGG -3'	50.32	56.6	18

Vektör DNA'ya ilgili genleri yerleştirmek amacıyla, www.restrictionmapper.org adresinden analiz edilerek hedef gen bölgesini kesmediği belirlenen *XhoI*, *XbaI*, *EcoRI* ve *NotI* enzimleri seçildi ve bu enzimlerin tanıma dizileri Tablo 6'da verildi.

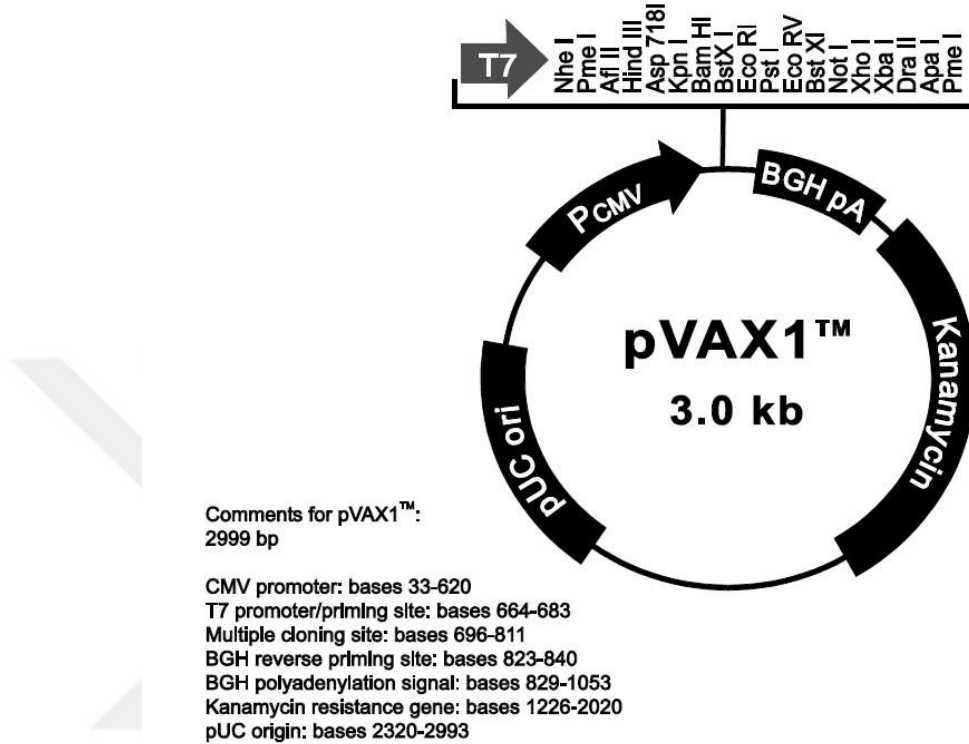
Tablo 6. Kesim Enzimlerinin Tanıma Dizileri

Enzim	Hedef bölge
<i>EcoRI</i>	5'-G ^A AATTC-3'
<i>NotI</i>	5'- GC ^A GGCCGC3'
<i>XhoI</i>	5'-C ^A TCGAG-3'
<i>XbaI</i>	5'-T ^A CTAGA-3'

DNA Aşı Vektörü (pVAX1)

pVAX1, DNA aşılarının geliştirilmesinde kullanılmak üzere tasarlanmış 3.0 kb'lık bir vektör DNA'dır. Vektör, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 22 Aralık 1996'da yayınlanan "Plazmid DNA Aşılarında Önleyici Bulaşıcı Hastalık Endikasyonları için Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar" belgesiyle tutarlı olacak şekilde yapılmıştır (Gatina et al., 2021). Bu vektör; *Escherichia coli*'de yüksek kopya sayısı replikasyonuna ve çoğu memeli hücresinde ilgili proteinin yüksek seviyede geçici ifadesine izin verir. pVAX1'de çok çeşitli memeli hücrelerinde yüksek düzeyde ekspresyon için insan sitomegalovirüsü (CMV) promotörü, istenilen genlerin transkripsiyonu için T7 promotör bölgesi, ilgili genlerin eklenilmesi için farklı restriksiyon enzimlerini bulunduran çoklu klonlama bölgesi, mRNA'nın verimli transkripsiyon sonlandırması ve poliadenilasyonu için sığır büyüme hormonu (BGH) poliadenilasyon sinyali ve *E. coli*'de seçim için kanamisin direnç geni, *E. coli*'de yüksek kopya

sayısına ulaşması ve çoğalması için pUC orijini bulunmaktadır. Ayrıca memeli hücre hattında transfeksiyonun ve ekspresyonun bir pozitif kontrol olarak kullanım için pVAX1' e β -galaktosidaz geni dahil edilmiştir. İyi tasarlanmış olan bu vektör DNA aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Y. Li & Cozzi, 2007; Mukherjee et al., 2001) pVAX1 haritası Şekil 7' deki gibidir.



Şekil 7. pVAX1 haritası
(Invitrogen)'den alınmıştır.

Kompetan *E. Coli* JM109 Hücrelerinin Hazırlanması ve Transformasyonu

LB agar besiyerinde üretilen *E. coli* hücreleri, 10 mL LB sıvı besiyerine aktarılıp inoküle edildi ve 37 °C'de 150 rpm hızında gece boyunca çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, bu kültürden 500 μ L alınarak 50 mL taze LB sıvı besiyerine eklendi ve aynı koşullarda inkübasyona devam edildi. Hücre yoğunluğu OD₆₀₀ değeri 0,5 seviyesine ulaştığında kültür buz üzerine alındı. Steril bir falkon tüpüne 44 mL kültür aktarılıp 6000 rpm'de, +4 °C'de 8 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çöken hücreler, buz gibi soğutulmuş 50 mM CaCl₂ çözeltisinin 20 mL'si ile nazikçe resüspanse edildi. Ardından, 10 mL'lik hücre süspansiyonu ayrı bir steril tüpe aktararak buz üzerinde 20 dakika bekletildi ve ardından 6000 rpm'de, +4 °C'de 8 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra, buzda soğutulmuş 1,25 mL CaCl₂ çözeltisi eklenerek hücreler yeniden süspansiyon haline getirildi. Hazırlanan süspansiyon, 100 μ L'lik alikuatlar halinde bölüştürülerek kompetan *E. coli* hücreleri transformasyon işlemine kadar buz üzerinde muhafaza edildi (Mendes et al., 2015).

Firmadan temin edilen ve ilgili genleri içeren plazmitler (pMA-GMCSF, pMA-CTLA4 ve pMA-Muc1VNTR), 50 ng/5 µL konsantrasyonunda olacak şekilde, buz üzerinde bekletilen kompetan bakteri hücrelerine eklendi. Karışım nazikçe çalkalanarak homojen hale getirildikten sonra tüp, buz üzerinde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Hücreler, ısı şoku uygulanması amacıyla çalkalama yapılmadan 42 °C’de 30 saniye tutuldu. Ardından, hızlı bir şekilde buz üzerine alınıp 2 dakika bekletildi. Steril koşullarda, önceden ısıtılmış 250 µL S.O.C besiyeri tüpe eklenerek hücrelerin toparlanması sağlandı. Çalkalamalı inkübatörde, 37 °C’de 225 rpm hızında 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, önceden ısıtılmış LB-ampisilin plaklarına transformasyon karışımlarından 150 µL yayıldı ve petri kapları 37 °C’de bir gece inkübe edilerek kolonilerin büyümesi gözlemlendi (Mendes et al., 2015). Inkübasyon sonrası antibiyotikli besiyerinde gelişen kolonilerden 1’er tane seçilerek plazmit izolasyonu için LB sıvı besiyerine inoküle edilerek 37°C’de 150 rpm’de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün OD₆₀₀:2,0-3,0 arasında bakterilerden plazmit izolasyonu yapıldı. Bu esnada herbir ilgili plazmiti taşıyan bakterilerden stok almak için 800 µL kültür sıvısı üzerine saf gliserol’den 200 µL eklenerek karışım vortekslendi.

***E. coli* Hücrelerinden Plazmit İzolasyonu**

pMA-GMCSF, pMA-CTLA4 ve pMA-Muc1VNTR’ı taşıyan *E. coli* hücrelerinin ‘GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (THERMO-k0502)’ protokolüne göre izolasyonu yapıldı. İzolasyon için, öncelikle gece boyu LB sıvı besiyerinde büyüyen hücreleri çöktürmek için hücreler steril falkona aktarıldı. Ardından 6800g’de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. RNase A içeren 250 µL resüspanسیون tamponu peletlerin üzerine eklendi. Hücre süspanسیونları homojen olana kadar hafifçe alt üst edildi ve sonra vortekslendi. Karışımın üzerine 250 µL lizis tamponu eklendi. Karışım vorteksleme yapılmadan 5 kez alt üst edildi. Daha sonra oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edildi. Inkübasyonun ardından karışımın üzerine 350 µL nötralizasyon tamponu eklendi. Karışım homojen olana kadar 5 kez alt üst edildikten sonra 12.300g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar kolona yüklendi ve 12,300g’de 1 dakika santrifüj edildi ve atık uzaklaştırıldı. Daha sonra kolona 500 µL yıkama tamponu eklenerek 12.300g’de 1 dakika santrifüj edildi ve atık uzaklaştırıldı. Yıkama işleme tekrarlanarak atık tekrar uzaklaştırıldı. Kolondaki solüsyonları uzaklaştırmak için kolon 12.300g’de 1 dakika boş olarak santrifüj edildi. Ardından kolonlar steril 1500 µL’lik yeni ependorf tüpe aktarıldı. Kolonlara 50 µL elüsyon tamponu eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyondan sonra 12,300g’de 2 dakika santrifüj edildi. Saflaştırılan plazmit DNA’ların konsantrasyonu ve saflığı, nanodrop spektrofotometrede belirlendi. Plazmitler -20 °C’ de saklandı.

%1 konsantrasyonda hazırlanacak şekilde tartılan agaroz, belirlenen hacimdeki (80-100 mL) 1X TAE tamponuna eklendi ve mikrodalga fırında kaynatıldı. Çözelti 40 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, son konsantrasyonu 0,5 µg/mL olacak şekilde RedSafe™ nükleik asit boyama solüsyonu (iNtRON) ilave edildi. Jel tamamen katılaştıktan sonra, DNA içeren örnekler DNA yükleme boyası ile karıştırıldı ve kuyucuklara dikkatlice yerleştirildi. Elektroforez, belirteç (marker) ile birlikte 60 V'de 90 dakika boyunca çalıştırılarak DNA bantlarının ayrışması sağlandı. Jel sonuçları, kemilüminesans jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad Gel Doc XR+) ile görüntülendi ve Image Lab 6.1 programı ile işlenerek kaydedildi (Akuta et al., 2022).

GM-CSF Geninin Klonlanması

GM-CSF geninin PCR ile amplifikasyonu

GM-CSF geninin çoğaltılması amacıyla tasarlanan primerler (GMCSF-F ve GMCSF-R) (Tablo 4), uygun PCR koşulları (Tablo 7 ve **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**) eşliğinde kullanıldı. Kalıp DNA olarak pMA-GMCSF (Invitrogen) tercih edilirken, Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz enzimi ile amplifikasyon gerçekleştirildi. Ayrıca, primerlerin optimum bağlanma sıcaklığını belirlemek için gradyan PCR yöntemi uygulandı. GM-CSF geninin jel elektroforezinde yürütülmesi yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi (Akuta et al., 2022).

Tablo 7. GM-CSF Geninin Gradyan PCR ile Amplifikasyonu

PCR karışım içeriği	Miktar (µL)
pMA-GMCSF	1 (10 ng)
dNTP mix (10 mM)	1,6
MgCl ₂ (50 mM)	0,3
GMCSF-F primer (10 pmol/µL)	1
GMCSF-R primer (10 pmol/µL)	1
5xPhusion HF tamponu	4
ddH ₂ O	10,9
HF DNA polimeraz	0,2
Toplam hacim	20

Tablo 8. Gradyan PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	98	30
	94	10
35	55-61-62	30
	72	35
1	72	300
	4	∞

PCR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ve fenol-kloroform ekstraksiyonu

Elektroforez işleminin ardından NFW (nükleaz free water; nükleaz içermeyen su) ile iyice yıkanarak hazırlanan jel kesme aparatı ile UV ışığı altında belirtece karşı uygun yerde bant veren PCR ürünleri, jel kesme aparatıyla kesilerek alındı. 2 mL'lik ependorf tüpte toplandı. Toplanan jelin üzerine 500 µL BNL tamponu eklendi ve vortekslendi. 55 °C'ye ısıtılmış su banyosuna ependorf tüp konuldu. Ependorf tüp 3 dakika bir vortekslenerek 10 dakika boyunca su banyosunda bekletildi. Tamamen eriyen jel, MEGAquick-spin™ toplama kolonuna transfer edildi ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek atık uzaklaştırıldı. 750 µL yıkama tamponu eklenerek 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve atık uzaklaştırıldı. Daha sonra kolon boş olarak 18.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi. Ardından kolonun filtrelili içi yeni steril 2 µL ependorfa yerleştirildi. Daha sonra kolonun ortasına 40 µL elüsyon tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi. İnkübasyon süresinin ardından 18.000 g'de 3 dakika kolon santrifüj edildi. Elüsyondaki PCR ürününün konsantrasyonu ve saflığı, nanodrop spektrofotometrede belirlendi.

PCR ile elde edilen ürün, *XbaI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi. **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.** da verilen kesim reaksiyon karışımı hazırlanarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından, enzimlerin inaktivasyonunu sağlamak amacıyla numuneler sırasıyla 65 °C'de 20 dakika ve 80 °C'de 5 dakika bekletildi.

Tablo 9. PCR Ürünü Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	11,56
10xFast Digest Tamponu	2
GM-CSF	14,44 (200ng)
Fast Digest <i>XhoI</i>	1
Fast Digest <i>XbaI</i>	1
Toplam hacim	30

Çift enzim kesimi yapılan DNA örneği, steril saf su ile toplam 100 µL'ye tamamlandı. Daha sonra, hacmin yarısı kadar fenol/kloroform/izoamil alkol (25/24/1) karışımı eklenerek 20 saniye vortekslendi. Numune, oda sıcaklığında 14.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst faz dikkatlice temiz bir tüpe aktarıldı. Üst fazın 1/10'u kadar 3 M sodyum asetat ve 2,5 katı hacminde saf etanol eklenerek karışım homojenize edildi. Ardından, 14.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Elde edilen pelet oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 20 µL TE tamponunda çözüldü.

Vektör DNA (pVAX1)'nın kesimi ve jelden ekstraksiyonu

PCR ürünleri kesilip saflaştırıldıktan sonra, vektör DNA da aynı restriksiyon enzimleri (*XhoI* ve *XbaI*) kullanılarak parçalandı ve 5' uçtaki fosfat gruplarının uzaklaştırılması amacıyla CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) enzimi ile işleminden geçirildi. Tablo 10'da belirtilen reaksiyon karışımları, 37 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra, enzim inaktivasyonu için sırasıyla 65 °C'de 20 dakika ve 80 °C'de 5 dakika tutuldu. Sonrasında, 1 µL CIAP eklenerek 37 °C'de 30 dakika daha inkübe edildi. Kesim işleminin doğrulanması ve saflaştırılmış plazmitin elde edilmesi için agaroz jel elektroforezi yukarıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Tablo 10. Vektör DNA Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	14
10xFast Digest Tamponu	2
pVAX1	2 (1µg)
Fast Digest <i>XhoI</i>	1
Fast Digest <i>XbaI</i>	1
Toplam hacim	20

Kesim reaksiyonunun ardından, %1 agaroz jel elektroforezi ile yürütülen örnekler jelden ayrıştırıldı. Bu işlem sayesinde hem CIAP enzimi uzaklaştırıldı hem de kesilen vektör DNA saf hale getirildi. Vektör DNA'nın jel ekstraksiyonu, PCR ürünlerinin saflaştırılmasında kullanılan 'PureLink® Quick Gel Extraction Kit' ile gerçekleştirildi. Elde edilen vektör DNA'nın konsantrasyonu ve saflık seviyesi, nanodrop spektrofotometre kullanılarak analiz edildi.

Ligasyon reaksiyonu ve *E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu

Vektöre aktarılacak GM-CSF geni ve pVAX1, uygun restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra Tablo 11'de belirtilen ligasyon reaksiyon karışımına, gen ve vektör DNA eşit hacimde olacak şekilde eklendi. Toplam hacmi 20 µL olacak şekilde hazırlanan bu karışım, 16 °C'de 16 saat süreyle inkübe edilerek ligasyon işlemi tamamlandı. Elde edilen ligasyon ürünlerinin bakteri hücrelerine transformasyonu yukarıda belirtildiği gibi yapıldı (Mendes et al., 2015). Ligasyon reaksiyonunda aşağıdaki eşitlik kullanıldı.

$$\text{Vektör Miktarı (ng)} \times \frac{\text{Vektöre yerleşen gen uzunluğu}}{\text{Vektör DNA' nın uzunluğu}} \times 3 = \text{Vektöre yerleşen gen miktarı (ng)}$$

Tablo 11. Ligasyon Reaksiyonu

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
10xLigasyon Tamponu	4
GM-CSF	6,52 (65,27ng)
pVAX1	5,8 (150 ng)

Ligaz	1,5
NFW	2,18
TOPLAM	20

Koloni PCR

İnkübasyonun ardından, kanamisin antibiyotik direnci taşıyan kolonilerden rastgele seçilenler, GM-CSF genine ve pVAX1'e özgü primerler kullanılarak koloni PCR ile analiz edildi (Shirvani et al., 2019). PCR sonucunda elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi.

Gene ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR

Koloni PCR için kullanılan karışımın bileşenleri ve PCR koşulları Tablo 12 ve Tablo 12'te belirtilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yukarıda belirtildiği gibi yürütülerek görüntülendi. Gen primerleri (GMCSF-F ve GMCSF-R) ile gerçekleştirilen koloni PCR sonuçlarına dayanarak seçilen 5 koloni (1, 13, 14, 15 ve 16) ile pVAX1'e özgü primerler (CMV-F ve BHG-R) kullanılarak yeni bir koloni PCR gerçekleştirildi. İkinci bir koloni PCR için kullanılan reaksiyon karışımının bileşenleri ve PCR koşulları da Tablo 12 ve Tablo 12'te belirtilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde daha önce yukarıda belirtildiği gibi yürütülerek görüntülendi.

Tablo 12. Koloni PCR için Reaksiyon Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (µL)
dNTP mix (10 mM)	1
GMCSF-F / CMV-F primer (10 pmol/µL)	1
GMCSF-R / BHG-R primer (10 pmol/µL)	1
10xPCR tamponu	1,2
ddH ₂ O	7,3
Taq DNA polimeraz	0,5
Toplam hacim	12

Tablo 13. PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	98	30
35	98	10
	55	30
	72	35
1	72	300
	4	∞

Muhtemel rekombinant plazmitlerin dizi analizi ile doğrulanması

pVAX1 vektörüne eklenen dizinin doğruluğunu teyit etmek için, LB-kanamisin sıvı besiyerinde çoğaltılan 13 numaralı koloniden plazmit izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon işlemi, 'GeneJET Plasmid MiniPrep Kit' (THERMO-k0502) protokolüne uygun şekilde

yapıldı. Saflaştırılan rekombinant plazmit DNA'ların konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre ile ölçüldü ve agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek görüntülendi. Elde edilen rekombinant plazmitler (pVAX1-GMCSF), vektör spesifik primerler (CMV-F ve BHG-R) kullanılarak çift yönlü Sanger dizi analizi için MedSan-Tek firmasına (İstanbul) gönderildi.

CTLA-4 Geninin Klonlanması

CTLA-4 geninin PCR ile amplifikasyonu

CTLA-4 geninin çoğaltılması amacıyla tasarlanan primerler (CTLA4-F ve CTLA4-R) (Tablo 4) ile uygun PCR koşulları (Tablo 14 ve Tablo 14) eşliğinde kullanıldı. Kalıp DNA olarak pMA-CTLA4 (Invitrogen) tercih edilirken, Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz enzimi ile amplifikasyon gerçekleştirildi. Ayrıca, primerlerin optimum bağlanma sıcaklığını belirlemek için gradyan PCR yöntemi uygulandı. Amplifiye edilen CTLA-4 geninin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve görüntülenmesi 'GM-CSF Geninin Klonlanması' basamağındaki gibi gerçekleştirildi (Akuta et al., 2022).

Tablo 14. CTLA-4 Geninin Gradyan PCR ile Amplifikasyonu

PCR karışım içeriği	Miktar (μL)
pMA-CTLA4	5 (10 ng)
dNTP mix (10 mM)	1,6
MgCl ₂ (50 mM)	0,3
CTLA4-F primer (10 pmol/μL)	1
CTLA4-R primer (10 pmol/μL)	1
5xPhusion HF tampon	4
ddH ₂ O	6,9
HF DNA polimeraz	0,2
Toplam hacim	20

Tablo 15. Gradyan PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	98	30
35	98	10
	62 -64,5	30
	72	45
1	72	300
	4	∞

PCR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ve fenol-kloroform ekstraksiyonu

Elektroforez işleminin ardından PCR ürünlerinin jelden ekstrakte edilmesi, ekstrakte edilen PCR ürününün konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi 'GM-CSF Geninin Klonlanması' basamağındaki gibi gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen PCR ürünü, *NotI* ve *XhoI* enzimleri ile kesildi. Tablo 16'daki gibi hazırlanan kesim reaksiyon karışımı, 37 °C'de 30

5 dakika inkübe edildikten sonra, enzim aktivitesini durdurmak amacıyla 80 °C’de 5 dakika bekletildi. *XhoI* ve *NotI* enzimleriyle kesilen DNA solüsyonu, steril saf su eklenerek 100 µL’ye tamamlandı ve ardından fenol-kloroform yöntemiyle ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi saflaştırıldı.

Tablo 16. PCR Ürünü Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	19,55
10xFast Digest Tamponu	2
CTLA-4	6,45 (200ng)
Fast Digest <i>XhoI</i>	1
Fast Digest <i>NotI</i>	1
Toplam hacim	30

Vektör DNA (pVAX1-GMCSF)’nın kesimi ve jelden ekstraksiyonu

PCR ürünlerinin kesimi ve saflaştırılmasının ardından vektör DNA (pVAX1-GMCSF)’da aynı enzimlerle (*XhoI* ve *NotI*) Tablo 17’deki gibi hazırlanan karışım kullanılarak kesildi. Reaksiyon sonucunda kesim işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini teyit etmek ve kesilen plazmiti jelden ekstraksiyonla saf olarak elde etmek için agaroz jelde yürütüldü ve jelden ekstrakte edildi. Elüsyondaki vektör DNA’nın konsantrasyonu ve saflığı, nanodrop spektrofotometrede belirlendi. Tüm bu işlemler ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 17. Vektör DNA Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	10,82
10xFast Digest Tamponu	2
pVAX1-GMCSF	5,18 (1µg)
Fast Digest <i>XhoI</i>	1
Fast Digest <i>NotI</i>	1
Toplam hacim	20

Ligasyon reaksiyonu ve *E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu

CTLA-4 geni ve pVAX1-GMCSF, Tablo 18’de verilen reaksiyon karışımı için eşit hacimde olacak şekilde ilave edildi. Son hacmi 30 µL olan karışım, 16 °C’de 16 saat süre ile inkübe edilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünlerinin bakteri hücrelerine transformasyonu ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi yapıldı (Mendes et al., 2015).

Tablo 18. Ligasyon Reaksiyonu

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
10X Ligasyon tamponu	5
CTLA-4	5,94 (59,42ng)
pVAX1-GMCSF	13,84 (90 ng)
Ligaz	2
NFW	3,22
TOPLAM	30

Koloni PCR

İnkübasyonun ardından, kanamisin antibiyotik direnci taşıyan kolonilerden rastgele seçilenler, CTLA-4 genine ve pVAX1-GMCSF'ye özgü primerler kullanılarak koloni PCR ile analiz edildi (Shirvani et al., 2019). PCR sonucunda elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi yürütülerek görüntülendi.

Gene ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR

Koloni PCR için kullanılan karışımın bileşenleri ve PCR koşulları Tablo 19 ve Tablo 20’de belirtilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan koloni PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Bu koloni PCR sonucuna göre belirlenen kolonilerden (1, 2 ve 3 numaralı koloniler) CTLA-4 ve pVAX1’e ait primerler (CMV-F ve CTLA4-R) kullanılarak iki farklı sıcaklıkta (59 ve 60 °C) koloni PCR uygulandı. PCR bileşenleri ve koşulları Tablo 19 ve Tablo 20’de gösterildi. Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Tüm bu işlemler ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 19. Koloni PCR için Reaksiyon Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (µL)
dNTP mix (10 mM)	1
CTLA4-F primer / CMV-F primer (10 pmol/µL)	1
CTLA4-R primer (10 pmol/µL)	1
10xPCR tamponu	1,2
ddH ₂ O	7,3
Taq DNA polimeraz	0,5
Toplam hacim	12

Tablo 20. PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	98	30
	98	10
35	63/59-60	30
	72	45

Tablo 20. devamı ...

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	72	300
	4	∞

Muhtemel rekombinant vektörlerin dizi analizi ile doğrulanması

pVAX1-GMCSF'ye entegre edilen dizinin doğruluğunu teyit etmek amacıyla yapılan tüm işlemler, "GM-CSF Geninin Klonlanması" bölümünde yer alan 'Muhtemel rekombinant vektörlerin dizi analizi ile doğrulanması' basamağındaki gibi gerçekleştirilerek teyit edildi.

Muc1-VNTR Dizisinin Klonlanması

Muc1-VNTR dizisinin PCR ile amplifikasyonu

Muc1-VNTR dizisi 5' ve 3' uçlarına sırasıyla *EcoRI* ve *NotI* restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini içerecek şekilde temin edildi. Muc1-VNTR dizisinin amplifikasyonu için dizayn edilen primerler (Muc1 VNTR-F ve Muc1 VNTR-R) (Tablo 4) ile uygun PCR protokolü (Tablo 21 ve Tablo 22) ve kalıp DNA olarak rekombinant pVAX1-CTLA4-GMCSF kullanıldı. Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz enzimi ile amplifikasyon gerçekleştirildi. Ayrıca, primerlerin optimum bağlanma sıcaklığını belirlemek için gradyan PCR yöntemi uygulandı. Amplifiye edilen Muc-1 VNTR dizisinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ve görüntülenmesi 'GM-CSF Geninin Klonlanması' basamağındaki gibi gerçekleştirildi (Akuta et al., 2022).

Tablo 21. Muc1-VNTR Dizisinin Gradyan PCR ile Amplifikasyonu

PCR karışım içeriği	Miktar (µL)
pMA-Muc1-VNTR	1,7 (10 ng)
dNTP mix (10 mM)	1,6
MgCl ₂ (50 mM)	0,3
Muc1 VNTR-F primer (10 pmol/µL)	1
Muc1 VNTR-R primer (10 pmol/µL)	1
5xPhusion HF tamponu	4
ddH ₂ O	10,2
HF DNA polimeraz	0,2
Toplam hacim	20

Tablo 22. Gradyan PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	98	30
	98	10
35	55-56-57	30
	72	18
1	72	300
	4	∞

Muc1-VNTR dizisinin klonlanması için yukarıda belirtilen şekilde yapılan gradyan PCR sonucuna göre belirlenen sıcaklıkta dizayn edilen primerler (Muc1VNTR-F ve Muc1VNTR-R) (Tablo 4) ile uygun PCR protokolü (Tablo 21 ve Tablo 22) kullanılarak Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz enzimi ile PCR yapıldı. PCR işleminden sonra elde edilen PCR ürününün jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmesi ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi gerçekleştirildi (Akuta et al., 2022).

PCR ürünlerinin jelden ekstraksiyonu, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi ve fenol-kloroform ekstraksiyonu

Elektroforez işleminin ardından PCR ürünlerinin jelden ekstrakte edilmesi, ekstrakte edilen PCR ürününün konsantrasyonunun ve saflığının belirlenmesi ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi gerçekleştirildi. Ekstrakte edilen PCR ürünü, *EcoRI* ve *NotI* enzimleri ile kesildi. Tablo 23’deki gibi hazırlanan kesim reaksiyon karışımı, 37 °C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra, enzim aktivitesini durdurmak amacıyla 80 °C’de 5 dakika bekletildi. Kesilen DNA solüsyonu, steril saf su eklenerek 100 µL’ye tamamlandı ve ardından fenol-kloroform yöntemiyle ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi saflaştırıldı.

Tablo 23. PCR Ürünü Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon Karışım İçeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	2
10xFast Digest Tamponu	2
Muc1-VNTR	24 (200ng)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1
Fast Digest <i>NotI</i>	1
Toplam hacim	30

Vektör DNA (pVAX1-CTLA-4-GMCSF)’nın kesimi ve jelden ekstraksiyonu

PCR ürünlerinin kesimi ve saflaştırılmasının ardından vektör DNA (pVAX1-GMCSF)’da aynı enzimlerle (*EcoRI* ve *NotI*) Tablo 24’deki gibi hazırlanan karışım kullanılarak kesildi. Reaksiyon sonucunda kesim işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğini teyit etmek ve kesilen plazmiti jelden ekstraksiyonla saf olarak elde etmek için agaroz jelde yürütüldü ve jelden ekstrakte edildi. Elüsyondaki vektör DNA’nın konsantrasyonu ve saflığı, nanodrop spektrofotometrede belirlendi. Tüm bu işlemler ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 24. Vektör DNA Kesim Reaksiyonu Karışım İçeriği

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
ddH ₂ O	12,77
10xFast Digest Tamponu	2
pVAX1-CTLA-4-GMCSF	3,23 (1µg)
Fast Digest <i>EcoRI</i>	1

Fast Digest <i>NotI</i>	1
Toplam hacim	20

Ligasyon reaksiyonu ve *E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu

Muc1VNTR dizisi ve pVAX1-CTLA4-GMCSF, Tablo 25’de verilen reaksiyon karışımı için eşit hacimde olacak şekilde ilave edildi. Son hacmi 30 µL olan karışım, 16 °C’de 16 saat inkübe edilerek ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen ligasyon ürünlerinin bakteri hücrelerine transformasyonu ve ligasyon reaksiyonunda kullanılan eşitlik ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi yapıldı (Mendes et al., 2015).

Tablo 25. Ligasyon Reaksiyonu

Reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
10xLigasyon tampon	5
Muc1-VNTR	1,55 (15,56ng)
pVAX1-CTLA4-GMCSF	16,23 (250 ng)
Ligaz	2
NFW	5,22
TOPLAM	30

Koloni PCR

İnkübasyonun ardından, kanamisin antibiyotik direnci taşıyan kolonilerden rastgele seçilenler, Muc1VNTR dizisine ve pVAX1-CTLA4-GMCSF’ye özgü primerler kullanılarak koloni PCR ile analiz edildi (Shirvani et al., 2019). PCR sonucunda elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezinde ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi yürütülerek görüntülendi.

Gene ve vektör DNA’ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR

Koloni PCR için kullanılan karışımın bileşenleri ve PCR koşulları Tablo 26 ve Tablo 27’de belirtilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan koloni PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Bu koloni PCR sonucuna göre belirlenen kolonilerden (1, 2 ve 3 numaralı koloniler) Muc1VNTR ve pVAX1’e ait primerler (Muc1VNTR-R ve CMV-F) kullanılarak koloni PCR uygulandı. PCR bileşenleri ve koşulları yine Tablo 26 ve Tablo 27’de gösterildi. Elde edilen PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. Tüm bu işlemler ‘GM-CSF Geninin Klonlanması’ basamağındaki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 26. Koloni PCR için Reaksiyon Karışım İçeriği

PCR karışım içeriği	Miktar (µL)
dNTP mix (10 mM)	1
Muc1VNTR-F primer / CMV-F primer (10 pmol/µL)	1
Muc1VNTR-R primer (10 pmol/µL)	1
10xPCR tamponu	1,2
ddH ₂ O	7,3
Taq DNA polimeraz	0,5
Toplam hacim	12

Tablo 27. PCR Şartları

Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)
1	98	30
35	98	10
	56-57	30
	72	15-18
1	72	300
	4	∞
	4	∞

Muhtemel rekombinant vektörlerin dizi analizi ile doğrulanması

pVAX1-CTLA4-GMCSF'ye entegre edilen dizinin doğruluğunu teyit etmek amacıyla yapılan tüm işlemler, “GM-CSF Geninin Klonlanması” bölümünde yer alan ‘Muhtemel rekombinant vektörlerin dizi analizi ile doğrulanması’ basamağındaki gibi gerçekleştirilerek teyit edildi.

CHO (Çin Hamster Ovaryumu) Hücre Hattının Kültürü

Bu çalışmada elde edilen rekombinant plazmitlerin (pVAX1-GMCSF, pVAX1-CTLA4-GMCSF, pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF) memeli hücrelerinde ifade edildiğinin belirlenmesi için CHO (Çin hamster yumurtalığı) (ATCC®CCL-61) hücre hattı kullanıldı. CHO hücrelerinin büyütülmesi için yüksek glikoz içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 antibiyotik solüsyonu ile desteklenerek kullanıldı (J. Y. Kim et al., 2012). Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂ ve %90 nem içeren inkübatörde inkübe edildi. Uygun medyumda, 25 veya 75 cm² taban alanlı hücre kültür kaplarında büyütülen hücreler tripsin-EDTA solüsyonu (%0,125 tripsin, 5 dakika) ile toplandı ve thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. (Tait et al., 2004).

Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Elektroporasyon, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin plazma zarlarında geçici gözenekler oluşturan bir elektriksel transformasyon yöntemidir (Aycock & Davalos, 2019). Uygulanan elektrik alanı, hücre zarında mikroskobik gözenekler veya elektrogözenekler oluşturarak mikro

veya makromoleküllerin hücre içine ve/veya dışına geçişine izin verir (Ozyigit, 2020). Elektrikle indüklenen sulu gözeneklerin oluşumu, lipid çift tabakada su moleküllerinin ilk olarak çift tabakaya nüfuz etmesiyle başlar. Bu süreçte, kararsız hidrofobik gözenekler oluşur ve bitişik lipidler, polar baş gruplarını su moleküllerine yönlendirerek metastabil hidrofilik gözenekler oluşturur (C. Chen et al., 2006). Bu yeniden yönlendirme, sulu bir gözenek oluşturmak için gereken enerjinin transmembran voltajı arttıkça azalması ve büyük bir hidrofobik gözenek yerine büyük bir hidrofilik gözenek oluşturmanın daha az enerji gerektirmesi nedeniyle meydana gelir (Green & Sambrook, 2020).

Optimum elektrik darbeleri altında, elektrogözenekler yeniden kapatılabilir ve hücreler kurtarılabilir. Ancak, uygun olmayan elektrik akımları (örneğin, çok yüksek elektrik alan şiddeti) hücrelerin aşırı ısınmasına neden olarak hücre ölümüne yol açabilir. Elektrogözenek oluşumları, uygulanan elektrik alanın genliği ve darbe süresi ile ilişkili olduğundan, bu ısınma etkisi, nispeten yüksek genlikli kısa süreli darbeler veya iki kısa süreli darbe kullanılarak en aza indirilebilir (Mahnič-Kalamiza et al., 2012). Bu nedenle, elektrik alan şiddetine ve süresine bağlı olarak, süreç ya geri döndürülebilir (membrandaki elektrogözenekler yeniden kapatılabilir ve hücreler hayatta kalır) ya da geri döndürülemez (membran kapanamaz ve hücre sonunda ölür) olabilir (Kotnik & Weaver, 2016). Darbenin süresine bağlı olarak, yeniden kapanma süreci (>1 saniye) gözenek oluşumuna göre (milisaniye veya mikrosaniye) nispeten uzun bir süreçtir (Ozyigit, 2020).

Elektroporasyon, hızlı uygulanabilirliği, düşük maliyeti, birçok hücre tipine uygunluğu, çok sayıda hücreye uygulanabilirliği ve yüksek stabil transformasyon yüzdesi sağlaması gibi avantajları nedeniyle biyoloji, tıp ve biyoteknoloji alanlarında yaygınlaşan bir yöntemdir (Aycock & Davalos, 2019).

Aşı konstraktlarının CHO hücrelerine elektroporasyon ile transfeksiyonundan önce, laboratuvarımızda bulunan pCMV-GFP (Addgene kodu:11153) kullanılarak bir optimizasyon çalışması yapıldı. Bu çalışma sonucunda, aşı konstraktlarının en yüksek transfeksiyon etkinliğini sağlamak için uygun elektroporasyon koşulları belirlendi.

Yukarıda anlatıldığı gibi, flaska transfer edilerek bir gün boyunca inkübe edilen CHO hücreleri, transfeksiyondan bir gün önce toplandı ve hücre sayımı yapıldı. Daha sonra elektroporasyon aracılı transfeksiyon optimizasyonu için gruplar oluşturuldu (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**). Her bir grup için 2×10^6 hücre kullanıldı. Bu hücreler, 600 µl Opti-MEM besiyerinde süspanse edildi. 1, 3, 5, 7 ve 9 numaralı gruplara 2 µg pCMV-GFP eklendi. Hazırlanan karışımlar, 4 mm boşluğa sahip elektroporasyon kuvvetlerine aktarıldı. Kuvvetler, buz üzerinde 10 dakika bekletildikten sonra elektroporasyon cihazına yerleştirildi. Gruplara

uygulanan voltaj değerleri,Tablo 28’de belirtildiği şekilde ayarlanarak elektroporasyon işlemi gerçekleştirildi. Elektroporasyon işleminin ardından, 2 µg pCMV-GFP eklenmiş gruplara ait küvetler 10 dakika daha buz üzerinde bekletildi. Sonrasında, elektroporasyon işlemi uygulanan tüm gruplar, 5 ml DMEM-F12 besiyeri ile T25 hücre kaplarına ekildi. Hücreler, 37 °C’de, %5 CO₂ ortamında bir gün boyunca inkübasyona bırakıldı.

Tablo 28. Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon İçin 1. Optimizasyon şartları

	DNA miktarı (µg)	Hücre sayısı	Uygulanan voltaj
Kontrol	-	2x10 ⁶	-
1.grup	-	2x10 ⁶	250V
2.grup	2,0	2x10 ⁶	250V
3.grup	-	2x10 ⁶	275V
4.grup	2,0	2x10 ⁶	275V
5.grup	-	2x10 ⁶	300V
6.grup	2,0	2x10 ⁶	300V
7.grup	-	2x10 ⁶	325V
8.grup	2,0	2x10 ⁶	325V
9.grup	-	2x10 ⁶	350V
10.grup	2,0	2x10 ⁶	350V

Yapılan elektroporasyon işlemi ardından Tablo 29 ve

Tablo 30’daki şartlarda yukarıda ifade edildiği şekilde CHO hücrelerine yeniden elektroporasyon işlemi uygulandı.

Tablo 29. Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon İçin 2. Optimizasyon şartları

	DNA miktarı (µg)	Hücre sayısı	Uygulanan voltaj
Kontrol	-	2x10 ⁶	-
1.grup	-	2x10 ⁶	250V
2.grup	2,0	2x10 ⁶	250V
3.grup	-	2x10 ⁶	275V
4.grup	2,0	2x10 ⁶	275V

Tablo 30. Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon İçin 3. Optimizasyon şartları

	DNA miktarı (µg)	Hücre sayısı	Uygulanan voltaj
Kontrol	-	2x10 ⁶	-
1.grup	-	2x10 ⁶	250V

2.grup	0,25	2x10 ⁶	250V	
3.grup	-	2x10 ⁶	250V	
4.grup	0,50	2x10 ⁶	250V	
5.grup	-	2x10 ⁶	250V	
6.grup	0,75	2x10 ⁶	250V	
7.grup	-	2x10 ⁶	250V	Akış
8.grup	1,0	2x10 ⁶	250V	
9.grup	-	2x10 ⁶	250V	
10.grup	2,0	2x10 ⁶	250V	

sitometri analizi

Elektroporasyon işlemlerinin ardından, 48 saat boyunca 37 °C’de, %5 CO₂ ve %90 nem içeren inkübatörde inkübasyona bırakılan hücreler yukarıda belirtildiği şekilde toplandı ve 100 µL akış sitometri tamponu içinde süspansiyon edilerek akış sitometri cihazında analiz edildi.

CHO Hücrelerine pVAX1-GMCSF’nin Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyonu

Akış sitometri analizi sonucunda, pCMV-GFP’nin CHO hücrelerine elektroporasyon yoluyla transfeksiyonu için en uygun koşullar belirlendi ve en yüksek transfeksiyon etkinliği tespit edildi. Bu koşullara uygun olarak, yukarıda açıklanan yöntemle elde edilen rekombinant pVAX1-GMCSF CHO hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle aktarıldı. Elektroporasyon işlemi uygulanan hücreler, 5 ml DMEM-F12 medyumuna ile T₂₅ hücre kaplarına ekildi ve 37 °C’de, %5 CO₂ ortamında iki gün süreyle inkübasyona bırakıldı.

Uygulamadan 48 saat sonra CHO hücreleri toplandı ve 15g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler 1 mL PBS ile yıkandı. Elde edilen pellet, 3 mL 1xRIPA tamponu (içerisinde 3 µL, 1 mM PMSF olacak şekilde hazırlanmış) eklenerek süspansiyon edildi. Süspansiyon, 40 kez pipetaj yapıldıktan sonra 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Ardından 30 saniye vortekslenip 30 saniye buzda bekletildi. Bu işlem toplam 5 kez tekrarlandı. Elde edilen hücre lizatı, 1,5 mL’lik Eppendorf tüplerine alındı ve 14.000g’de, 4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Son olarak, süpernatantlar toplandı.

-20 °C’den alınan süpernatant tüpleri, 13.000 rpm’de, +4 °C’de 5 dakika santrifüj edildi. Her 2 mL örnek için 500 µL TCA (trikloroasetik asit) eklendi ve örnekler +4 °C’de 10 dakika bekletildi. Bekleme sonrasında, örnekler eppendorf tüplerine alınıp 13.000 rpm’de, +4 °C’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 200 µL soğuk aseton eklenerek süspansiyon edildi. Ardından, aynı koşullarda (13.000 rpm, +4°C’de 5 dakika) santrifüj işlemi tekrarlandı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlanarak toplamda iki kez soğuk aseton ile yıkama yapıldı. Son yıkamanın ardından, pelletler 95 °C’de ısı bloğunda inkübe edilerek asetonun uçması sağlandı. Kuruyan pelletlere, 40 µL 1,5X yükleme tamponu

eklendi ve pelletler pipetaj ile çözdürüldü. Çözünen pelletler hemen buza alınarak spinlendi ve ardından 95 °C’de veya kaynayan su banyosunda 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

Western blot analizi

Western blotlama (protein immunoblot olarak da bilinir), hücre veya doku lizatından elde edilen kompleks bir karışımda belirli bir proteinin tanımlanması ve miktarının ölçülmesi için altın standart bir yöntemdir (Hirano, 2012). Kısaca, doğal ya da denatüre edilmiş proteinler jel elektroforezi ile ayrılır, ardından protein bağlayıcı bir membrana transfer edilir ve daha sonra hedef protein, spesifik bir antikor kullanılarak tespit edilir (Bass et al., 2017). Diğer immünoblot tekniklerinde olduğu gibi, antikorlar, WB'nin doğruluğunu, tekrarlanabilirliğini ve özgüllüğünü garanti altına alan kilit bir rol oynar (B. Kim, 2017).

Western blotlama, yarı-kantitatif ve hata eğilimli bir teknik olmasına rağmen, doğru istatistiksel tasarım, normalizasyon yöntemi, geçerli referans proteinler ve doğru antikor seçimi gibi çeşitli faktörlerin kullanımı, sonuçların yorumlanmasını engelleyen sistematik hataları azaltabilir (Wu et al., 2014).

SDS-PAGE jelinde proteinlerin yürütülmesi

SDS-PAGE jeli hazırlamak için öncelikle elektroforez plakları ve aparatları saf su ve etanol ile temizlendi ve jel hazırlama tankına yerleştirildi. Cam plakalar arasına, Tablo 31’deki hazırlanan ayırma jeli pipet yardımıyla plakaların arasına 2/3 oranında dolduruldu. Jelin üst yüzeyinin düz olması için üzerine izopropanol eklendi. Ayırma jelin polimerleşmesi tamamlandıktan sonra, izopropanol uzaklaştırıldı. Ardından, polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yığma jeli ilave edildi ve izopropanol ile temizlenmiş tarak yığma jelinin üzerine yerleştirildi. Yığma jelin polimerleşmesi tamamlandıktan sonra, tarak dikkatlice çıkarıldı. Cam plakalar elektroforez tankına yerleştirildi ve üzerlerine 1X yürütme tamponu eklendi. Taraklar tank içinde çıkarıldıktan sonra, TCA ile çöktürülüp spinlenen örneklerden 20 µL alınarak her bir kuyuya yüklendi. Jel, ilk olarak 60V’de 30 dakika, ardından 120V’de 60 dakika, oda sıcaklığında çalıştırıldı.

Tablo 31: SDS Jelinin Hazırlanması

	Ayırma jeli	Yığma jeli
1 M Tris-HCl	2500	220
Akrilamid- bisakrilamid	2200	400
%10’luk SDS	100	15
TEMED	65	15
Saf su	1565	1225

Blotlama, bloklama, antikor ile muamele ve görüntülme işlemi

SDS-PAGE jelinde yürütülen proteinler PVDF membrana blotlandı. Bu işlem için jel, cam plakalar arasından çıkarıldıktan sonra musluk suyunda yıkanarak temizlendi ve ardından 1X Transfer tamponunda 5 dakika bekletildi. PVDF membranlar ise kullanılmadan önce metanolde 5 dakika çalkalanarak muamele edildi, ardından 1X Transfer tamponunda 5 dakika muamele edildi. Semidry blotlama işlemi için, cihazın platformuna sırayla şu şekilde katmanlar yerleştirildi:

1. Transfer tamponu ile ıslatılmış 2 parça blot kağıdı,
2. PVDF membran,
3. Jel,
4. Transfer tamponu ile ıslatılmış 3 parça blot kağıdı.

Blotlama cihazı, 25 V, 2,5 A ayarında 7 dakika çalıştırıldı. Blotlama işlemi tamamlandıktan sonra, membran dikkatlice alındı ve bantların bulunduğu yüzeye gelecek şekilde 10-15 dakika taze hazırlanmış PBST çözeltisinde çalkalanarak yıkandı. Bir jel için 250 mL PBST çözeltisi hazırlandı; bunun için 125 µL Tween-20 eklendi. Bu çözeltiden 30 mL ayrılarak, %5 yağsız süt tozu eklenip bloklama çözeltisi oluşturuldu. Bloklama çözeltisinden her bir antikor için 3 mL ayrıldı ve +4 °C'de saklandı. Membran, bloklama çözeltisi ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyonun ardından membran, PBST ile 2 kez, 5'er dakika yıkandı. Daha sonra, bloklama çözeltisine GM-CSF antikoruna olan Anti-Rat IgG H&L (HRP) 1:1000 oranında (yani 1 µL antikor 1 mL bloklama çözeltisi) eklendi ve membranın ön yüzü antikora gelecek şekilde, +4 °C'de bir gece karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyondan sonra membran, PBST ile yavaşça 5 kez, 5'er dakika çalkalanarak yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra, Femto ve Pico substratları (ECL reagent) kullanılarak antikorun kimyasal sinyal oluşturması sağlandı ve sonuçlar ChemiDoc™ Touch Imaging System ile görüntülendi.

Gümüş Boyama

CTLA-4 proteininin varlığını belirlemek için, yukarıda açıklanan yöntemle elde edilen rekombinant pVAX1-CTLA4-GMCSF aşı konstraktı, elektroporasyon yöntemiyle CHO hücrelerine aktarıldı. Daha sonra, yukarıda belirtilen prosedürlere uygun olarak CTLA-4 heterolog protein izolasyonu gerçekleştirildi ve SDS-PAGE analizi yapıldı. Analizin ardından jel, gümüş boyama yöntemiyle görüntüleme için aşağıdaki şekilde hazırlandı.

- SDS-PAGE'den çıkarılan jel, öncelikle saf su ile yıkandı. Daha sonra, Tablo 3' teki gibi hazırlanan tespit çözeltisi, jelin üzerine eklenerek 320 rpm'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından jel tekrar saf su ile yıkandı.
- Jel, Tablo 3'teki gibi hazırlanan redüksiyon çözeltisine konularak 320 rpm'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından jel, 5 dakika süreyle, 3 kez saf su ile yıkandı.
- Jel, Tablo 3' teki gibi hazırlanan boyama çözeltisinde 320 rpm'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından jel, 5 dakika boyunca 3 kez saf su ile yıkandı.
- Jel, Tablo 3' teki gibi hazırlanan yıkama çözeltisi 1'e konularak 320 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Ardından jelde bantlar belirginleşmeye başladığında, Tablo 3' teki gibi hazırlanan yıkama çözeltisi 2, jelin üzerine eklendi ve proteinin bulunduğu bant görüntülendi.

Rekombinant GM-CSF ve CTLA-4 proteinlerinin moleküler kütlelerini tahmin etmek için Rf (retardasyon faktörü) grafiği kullanıldı. Önce elektroforez jelindeki marker proteinlerin göç mesafeleri ölçüldü. Her bandın Rf değeri, göç mesafesinin toplam jel uzunluğuna oranı alınarak hesaplandı. Marker proteinlerin bilinen moleküler kütlelerinin logaritmaları ($\log_{10} \text{Mk}$) alınarak, Rf-log (Mk) ilişkisine dayalı bir dağılım grafiği oluşturuldu. Trendlere uygun regresyon doğrusu çizildi ve denklem elde edildi. İncelenen proteinin Rf değeri bu denklemde yerine yazılarak log (Mk) değeri bulundu; bunun antilogu alınarak yaklaşık moleküler kütle hesaplandı (Lee et al., 2020).

Aşı konstraktlarının elektroporasyon yöntemiyle CHO hücrelerine aktarılmasının ardından, bu hücrelerde aşı konstraktlarında yer alan genlerin kodladığı heterolog proteinlerin üretimi, western blot analizi ve gümüş boyama ile doğrulandı. Analizlerin tamamlanmasının ardından, *in vivo* hayvan deneylerine geçildi. Bu deneyler, hizmet alımı ile KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Ankara) tarafından gerçekleştirildi.

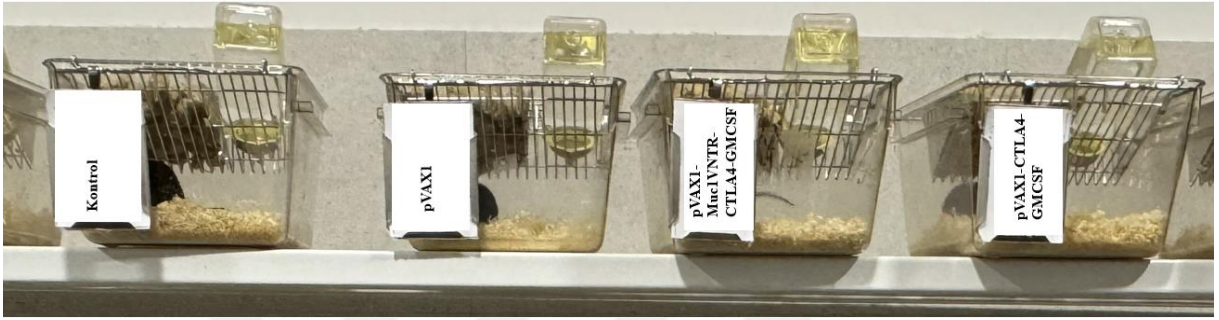
Çalışma kapsamında kullanılan 36 adet 220-295 g 4-6 haftalık *Mus domesticus* cinsi erkek fare, KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş. tarafından temin edilmiştir. Tüm fareler, deney süresi boyunca sabit sıcaklık ve ışık döngüleri ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, 12:12 saat karanlık/aydınlık döngüleri) olan kafeslerde tutularak hazır pellet yem ve çeşme suyu ile beslenmiştir. KOBAY DHL A.Ş. Yerel Etik Kurulu tarafından alınan 24.05.2024 tarih ve 719 onay no'lu karar ile çalışmamızın bütün aşamalarının etik kurallara uygun olduğu bildirilmiştir (Şekil 8).

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI (KOBAY DHL A.S. LOCAL ETHICS COMMITTEE APPLICATION APPROVAL)		
BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	Protokol Numarası (Protocol number)	719
	Protokol Adı (Protocol Name)	Akciğer Kanseri Karşı DNA Açısının Geliştirilmesi ve Fareler Üzerinde Tümöre Karşı Tedavi Edici Etkisinin Belirlenmesi <i>Development of DNA Vaccine Against Lung Cancer and Determination of Its Therapeutic Effect Against Tumors in Mice</i>
	Başvuru Tarihi (Application date)	06.05.2024
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı (Principal Investigator Name-Title)	Doç. Dr. Yağmur ÜNVER
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum (Principal Investigator Institution)	Atatürk Üniversitesi- Fen Fakültesi Atatürk University- Faculty of Science
	Yardımcı Araştırmacılar (Associate Researchers)	Prof.Dr. Serkan YILDIRIM Ezgi DAĞ TAŞKESENİĞİL
KARAR BİLGİLERİ (DECISION INFORMATION)	Onay Numarası (Confirmation number)	719
	Onay Tarihi (Approval date)	24.05.2024
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı (Approved Animal Type and Number)	57 adet, Erkek, C57BL6, Fare 57 pieces, male, C57BL6, Mice
	Onay Bilgileri (Confirmation Information)	Proje amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir. The project was examined in terms of purpose, justification, approach and method, and it was decided that there was no ethical objection to the realization of the study.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı (Ethics Committee Chairman) A.Begüm BUĞDAYCI	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı (Ethics Committee Vice President) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Dr. Öğretim Üyesi Dilek YÖYEN ERMİŞ	 e- imzalı/ e-signed
	Sorumlu Veteriner Hekim (Responsible Veterinarian)	 e- imzalı/ e-signed
	Orkun TARKUN	 e- imzalı/ e-signed
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ (KOBAY DHL, Inc. LOCAL ETHICS COMMITTEE MEMBERS)	Etik Kurul Üyesi Biyolog (Ethics Committee Member Biologist) Fatma Nur İNÇEH	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi Veteriner (Ethics Committee Member Veterinarian) Adnan ÇİTİRİK	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi Veteriner (Ethics Committee Member Veterinarian) Nege AYDEMİR	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Zeynep AYDIN TARAKÇI	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Ali VAROL	 e- imzalı/ e-signed
	Etik Kurul Üyesi (Ethics Committee Member) Adil KİŞ	 e- imzalı/ e-signed
		 e- imzalı/ e-signed
		 e- imzalı/ e-signed

Şekil 8. KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş. Yerel Etik Kurulu başvuru onay belgesi

In vivo Tümör Tedavisi

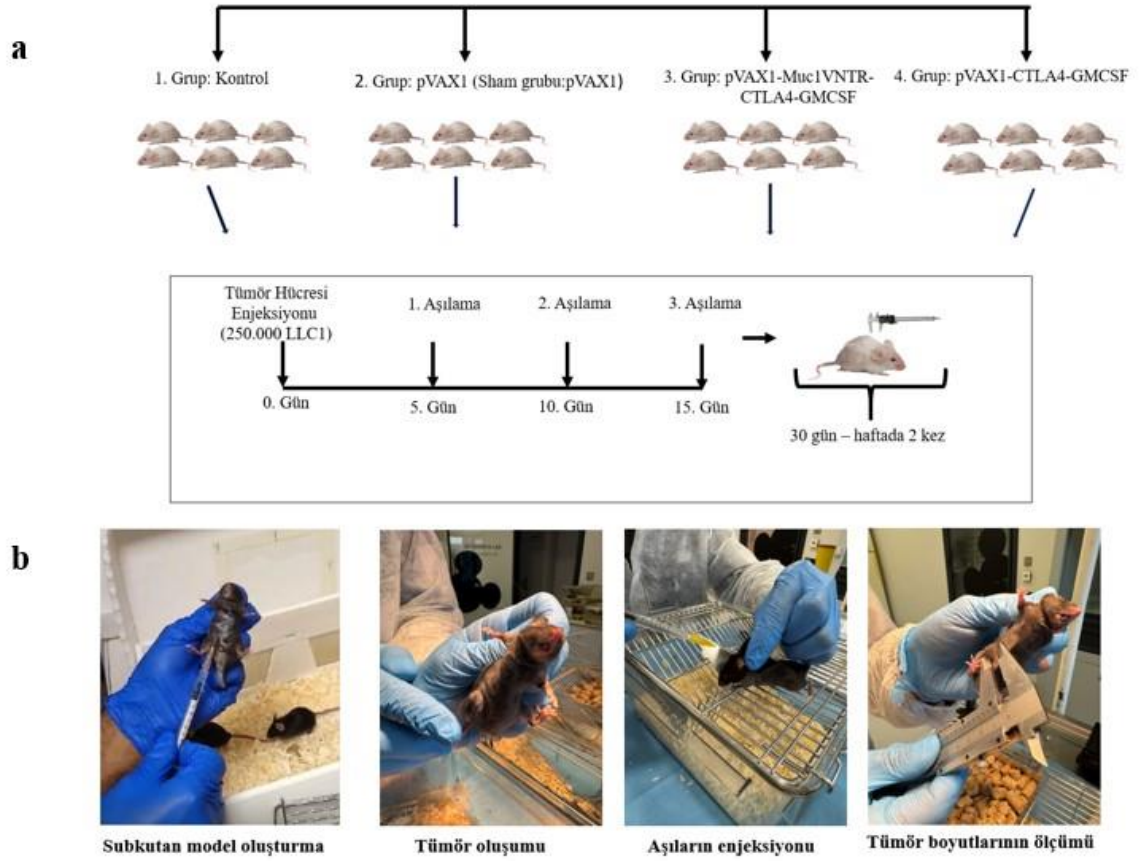
Çalışmada, 4-6 haftalık C57BL/6 erkek farelerden 24 adet kullanılarak 4 grup (n:6) oluşturuldu (Şekil 9). Farelerde LLC1 (ATCC: CRL-1642TM) fare akciğer kanseri hücre hattı kullanılarak sinjenik tümör modeli oluşturuldu. Bu amaçla, 24 fare 1 hafta boyunca karantinaya alındı. Karantina süresince LLC1 hücrelerinin büyümesi için, %10 fetal bovin serumu (FBS) içeren, yüksek glikoz içeriğine sahip Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kullanıldı (Nahler, 2009). Hücreler, %5 CO₂ ve %90 nem oranına sahip, 37 °C'de bir inkübatörde inkübe edildi.



Şekil 9. Tümör tedavi deneyi için gruplarının oluşturulması

Hücreler, uygun medyumda 25 cm² veya 75 cm² taban alanına sahip hücre kültür kaplarında büyütüldü. Toplama işlemi için %0,25 tripsin içeren solüsyon kullanılarak hücreler 5 dakika boyunca inkübe edildi ve ardından thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Sayım sonucunda, 3x10⁴ hücre 100 µL steril serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi. Daha sonra süspanse hücrelerin üzerine 1:10 oranında matrigel (Corning-354248) eklendi ve karışım pipetaj yapılarak hazırlandı. Pipetaj sırasında matrigelin donmaması için karışımın sıcaklığının 10 °C'nin üzerine çıkmamasına özen gösterildi.

Her bir fareye, hazırlanan 3x10⁴ hücrelik matrigel karışımı subkutan olarak karın bölgesine enjekte edildi. Enjeksiyondan 10 gün sonra ölçülebilir büyüklükte tümörler oluştu. Tümör gelişiminden 5 gün sonra, aşılama işlemi gerçekleştirildi. Her bir fareye, 100 µg olarak hazırlanan aşılarda intraperitoneal yolla farelerin ensesinden enjekte edildi. Aşılama, 5 gün arayla 3 doz olarak uygulandı. Son aşılamanın ardından, tümör boyutları (derinlik x genişlik x uzunluk) 30 gün boyunca haftada iki kez ölçüldü (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**). Çalışmada belirlenen gruplar ve uygulanan aşılama takvimi, Şekil 10**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.** da detaylı olarak gösterilmiştir.



Şekil 10. Tümör tedavi deneyi; a) Tümör tedavi deneyi için grupların oluşturulması ve aşılama takvimi, b) Tümör tedavi deneyi süresince yapılan uygulamalar

***In vivo* tümör tedavi deneyinin histopatolojik analizi**

Çalışma süresince ölen veya çalışma sonunda sakrifiye edilen farelerden deri, akciğer ve karaciğer dokuları toplandı. Bu dokular, histopatolojik inceleme amacıyla formaldehit içinde korunarak tarafımıza gönderildi.

Farelerden alınan deri, akciğer ve karaciğer doku örnekleri, %10 tamponlu formaldehit solüsyonu ile fikse edildi. Doku küçültme işlemi sırasında dokuların tam ortasından kesildi ve kasetlere yerleştirildi. Formaldehit kalıntılarını uzaklaştırmak için dokular 24 saat boyunca akan su altında yıkandı. Daha sonra, dokular sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinde birer saat bekletilerek doku takip cihazında dehidrasyon işlemine tabi tutuldu. Şeffaflaştırma aşamasında dokular, ksilol 1 ve ksilol 2'de birer saat bekletildi. Son olarak dokular, 57°C'de parafin 1 ve parafin 2'de bekletilerek parafinizasyon işlemi tamamlandı. Parafin bloklara gömülen dokulardan, rotary mikrotom cihazı (Leica RM2125 RT) kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler histolojik incelemeler için normal lamlara, immünohistokimyasal analizler için ise yapışkanlı lamlara aktarıldı.

Hematoksilen-eozin (HE) boyama yöntemi

Parafinle kaplanmış kesitlerden boyama öncesi parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, 57 °C sıcaklıkta bir saat inkübe edildikten sonra, ksilol 1 ve ksilol 2 serilerinde beşer dakika bekletilerek temizlendi. Ardından, kesitler sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve %70'lik alkol çözeltilerinde üçer dakika bekletildi ve ardından distile suda yıkanarak rehidrasyon sağlandı. Kesitler, hematoksislen boyasında beş dakika tutulduktan sonra bol çeşme suyunda yıkandı. Aşırı boyayı gidermek için asit alkolle dekolorizasyon işlemi yapıldı. Daha sonra kesitler, eozin boyasında bir dakika süreyle boyandı ve yeniden %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon tamamlandı. Son aşamada, kesitler ksilol 1 ve ksilol 2 çözeltilerinde üçer dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı. Boyama işlemi tamamlanan dokular, entellan yardımıyla lamellerle kapatılarak hazırlandı. Hematoksislen-eozin boyası uygulanmış preparatlar, Zeiss AXIO ALMANYA ışık mikroskobunda incelenerek kaydedilen patolojik bulguların fotoğrafları çekildi (Çavuşoğlu, 2016). Kesitler histopatolojik özelliklerine göre yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirilip istatistiksel değerlendirme yapıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Ki67 protein analizi için adheziv (poly-L-Lysin) kaplı lamlara alınan doku kesitleri, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi ve dehidratasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra, kesitler distile suda 5 dakika süreyle yıkandı. Ardından PBS (pH 7.2) ile 5-10 dakika yıkandı. Daha sonra %3'lük H₂O₂ ile 10 dakika muamele edilerek endojen peroksidaz inaktive edildi. Nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için kesitler, tüm primer ve sekonder antikolarla uyumlu olan Protein Blok çözeltisi ile 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, doku üzerindeki fazla blok çözeltisi döküldü, ancak yıkama yapılmadan primer antikor (Ki67 katalog no: ab15580) 1:100 UK oranında uygulandı. Kesitler, primer antikorla oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edildi. Primer antikor işleminden sonra kesitler PBS ile iki kez, her birinde 5 dakika olacak şekilde yıkandı ve ardından biotinle işaretlenmiş sekonder antikolarla oda sıcaklığında 10-30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemten sonra tekrar PBS ile yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz çözeltisinde 10-30 dakika süreyle bekletildi ve PBS ile yıkama işlemi tekrarlandı. Kromojen olarak 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) çözeltisi damlatılan kesitler, kromojen reaksiyonu tamamlanana kadar 5-10 dakika süreyle bekletildi. Zemin boyaması için kesitler Mayer's hematoksislen çözeltisinde 1-2 dakika süreyle bekletildikten sonra musluk suyu ile yıkandı. Son olarak, alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek temizlenen kesitler lamelle kapatıldı ve Zeiss AXIO ALMANYA ışık mikroskobuyla analiz edildi (Çavuşoğlu, 2016).

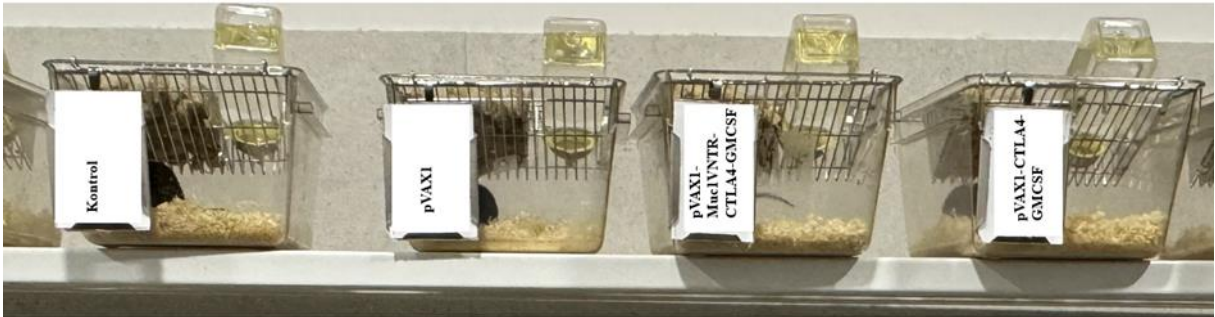
İstatistiksel Analiz

Histopatolojik incelemelerde istatistiksel analiz için SPSS 13.0 programı kullanıldı ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilerek veriler değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırılmada Duncan testi kullanıldı. Grup etkileşiminin saptanmasında non parametrik Kruskal-Wallis testi, gruplar arasındaki farklılıkları belirlenmesi için Mann Whitney U testi kullanıldı.

İmmunohistokimyasal boyama sonucu elde edilen resimlerden pozitif boyanmaların yoğunluğunu belirlemek amacıyla; her resimden 5 adet rastgele alan seçildi ve ZEISS Zen Imaging Software programında değerlendirmeleri yapıldı. Veriler, alan %'si için ortalama ve standart sapma (ortalama $\pm$ SD) cinsinden istatistiksel olarak tanımlandı. Pozitiflik veren immünoreaktif hücreleri ve immünopozitif boyanmış alanları sağlıklı kontrollerle karşılaştırmak için one-way ANOVA ve ardından Tukey testi yapıldı. Test sonucunda $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi ve veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu.

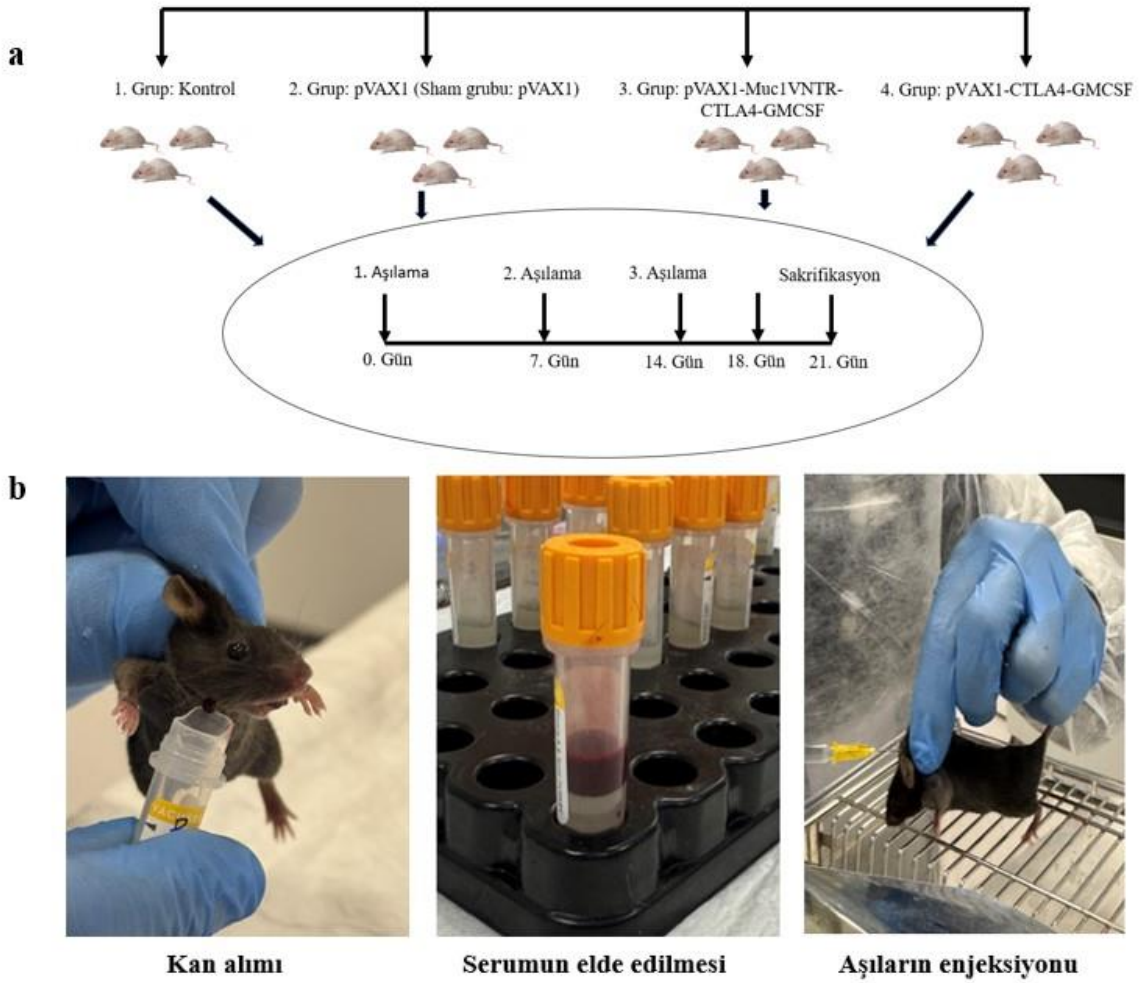
***In vivo* Bağışıklama Deneyi**

Çalışmada, 4-6 haftalık C57BL/6 erkek farelerden 12 adet kullanılarak 4 grup (n:3) oluşturuldu (Şekil 11). Her bir fareye, 100 μ g dozunda hazırlanan aşılar intraperitoneal yolla, enselerinden enjekte edildi. Aşılama işlemi, 1 hafta arayla toplam üç kez tekrarlandı.



Şekil 11. Bağışıklama deneyi için gruplarının oluşturulması

Her bir aşılama öncesinde, son aşılamadan 3 gün sonra ve son aşılamadan 1 hafta sonra farelerin fasiyal venlerinden 0,5 cc kan alındı. Kan örnekleri, serumu kandan kolayca ayırabilen jel içeren sarı kapaklı tüplerde toplandı. Aynı gruptaki farelerden alınan kan örnekleri birleştirildi. Tüplerdeki kanlar, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum, iki eşit kısma bölünerek alikuatlandı ve -80 °C'de saklandı (Şekil 12). pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF ve pVAX1-CTLA4-GMCSF aşılarında bulunan Muc1VNTR ve CTLA-4 genleri aracılığıyla farelerde üretilen proteinlere karşı, farelerden toplanan serumlarda spesifik antikorların (anti-Muc1VNTR ve anti-CTLA-4) varlığını belirlemek için ELISA ve western blot analizleri gerçekleştirildi. Çalışmada belirlenen gruplar ve uygulanan aşılama takvimi, Şekil 12'de detaylı olarak gösterilmiştir.



Şekil 12. Bağışıklama deneyi; a) Bağışıklama deneyi için grupların oluşturulması ve aşılama takvimi, b) Bağışıklama deneyi süresince yapılan uygulamalar

***In vivo* bağışıklama deneyinin histopatolojik analizi**

Ayrıca çalışma sonunda sakrifiye edilen farelerden karaciğer ve akciğer dokuları toplandı. Bu dokular, histopatolojik inceleme amacıyla formaldehit içinde korunarak tarafımıza gönderildi. Karaciğer ve akciğer dokularının histopatolojik analizi yukarıda anlatıldığı gibi yapıldı (Çavuşoğlu, 2016).

ELISA analizi

Enzime bağlı immünosorbent tahlili (ELISA), temel bilim araştırmalarında, klinik uygulama çalışmalarında ve teşhislerde yaygın olarak kullanılan immünolojik bir tahlildir. ELISA tekniği, antijen (yani hedef protein) ile ilgili antijene karşı birincil antikor arasındaki etkileşime dayanır. Antijenin varlığı, eklenen substratın enzime bağlı antikor katalizi yoluyla doğrulanır; bunların ürünleri, görsel incelemeyle niteliksel olarak veya bir lüminometre veya spektrofotometreden alınan okumalar kullanılarak niceliksel olarak tespit edilir. ELISA teknikleri genel olarak doğrudan, dolaylı, sandviç ve rekabetçi ELISA olarak sınıflandırılır;

bunların tümü antijenlere, antikorlara, substratlara ve deney koşullarına göre değişir. Doğrudan ELISA, enzimle konjuge primer antikorların antijen kaplı plakalara bağlanmasına dayanır. Dolaylı ELISA, antijen kaplı plakalara bağlanan birincil antikorlara özgü enzime bağlı ikincil antikorları tanıtır. Rekabetçi ELISA, birincil antikor için numune antijeni ile plaka kaplı antijen arasında bir rekabeti ve ardından enzime bağlı ikincil antikorların bağlanmasını içerir. Sandviç ELISA tekniği, antikorla önceden kaplanmış plakaya verilen bir örnek antijeni, ardından tespitin ve enzime bağlı ikincil antikorların antijen üzerindeki tanıma bölgelerine sıralı bağlanmasını içerir (Hayrapetyan et al., 2023). Serumlardaki muhtemel antikorların (anti-Muc1VNTR, anti-CTLA-4) varlığını tespit etmek için dolaylı ELISA tekniği kullanıldı. Bu amaçla, ticari olarak satın alınan saf Muc1 ve CTLA-4 proteinleri ELISA plakalarına immobilize edildi. Primer antikor olarak çalışmada toplanan serumlar, ikincil antikor olarak ise Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) antikor kullanıldı. Yöntemin detayları aşağıda verilmiştir. Bu aşama, hizmet alımı kapsamında Kobay firması tarafından gerçekleştirilmiştir.

- Plakaların hazırlanması:

ELISA plakalarının kuyucukları, CTLA-4 ve Müsin-1 VNTR proteinleri ile kuyucuk başına 1 µg olacak şekilde kaplandı. Kaplama için proteinler karbonat tamponunda (%0.159 a/h Na₂ CO₃ , %0.388 a/h NaHCO₃ , pH 9.6) çözündürüldü. Plaklar parafilm ile kaplanarak bir gece boyunca 4 °C'de inkübe edildi.

- Yıkama işlemi:

İnkübasyon sonrası plaklar, yıkama tamponu (%0.8 a/h NaCl, %0.02 a/h KCl, %0.144 a/h Na₂ HPO₄ , %0.024 a/h KH₂ PO₄ , %0.1 h/h Tween-20, pH 7.2) ile üç kez yıkandı.

Bloklama işlemi:

Kuyucuklara 50 µL bloklama çözeltisi (yıkama tamponu içerisinde %2 a/h BSA) eklendi ve plaklar 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.

- Primer antikor uygulaması:

Bağıışıklık kazandırılmış farelerden elde edilen serum, bloklama çözeltisi ile 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 ve 1:3200 oranlarında seyreltilerek primer antikor çözeltisi olarak kullanıldı. Plaklar 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaklar, yıkama tamponu ile dört kez yıkandı.

- Sekonder antikor uygulaması:

Kuyucuklara, bloklama çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında seyreltilmiş Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) sekonder antikor eklendi ve plaklar 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından plaklar dört kez yıkandı.

- Renk oluşturma:

HRP konjuge sekonder antikor substrat kiti kullanılarak kolorimetrik bir substrat hazırlandı. Bunun için:

- Kit bileşeni olan AP 25x renk oluşturma tamponundan 0.4 mL alınıp üzerine 9.6 mL deiyonize su eklenerek 1X çözeltisi hazırlandı.
- Kit bileşeni olan AP renk reaktifi A ve B çözeltilerinden 100 µL alınıp hazırlanmış olan 1X tampona eklendi ve kısa süre vortekslendi.
- Hazırlanan karışımdan her kuyucuğa 100 µL eklendi. Plaklar oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika inkübe edildi.

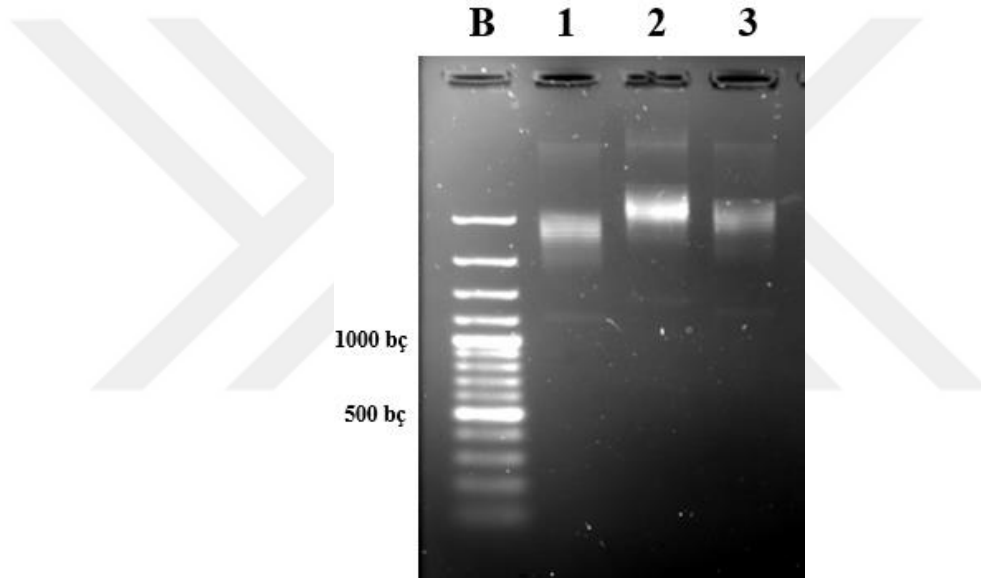
- Son işlem ve okuma:

İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 50 µL stop çözeltisi eklendi. Optik dansite değerleri ELISA plak okuyucusu ile 405 nm dalga boyunda ölçüldü.

ARAŞTIRMA BULGULARI

E. coli JM109 Hücrelerinin Transformasyonu ve Plazmit İzolasyonu

pMA-MUC1VNTR, pMA-CTLA4 ve pMA-GMCSF'nin kompetan *E. coli* JM109 hücrelerine transformasyonunun ardından koloni oluşumu gözlemlendi. Transformasyon işlemi sonrası besiyerinde gelişen kolonilerden rastgele seçilerek LB sıvı-ampisilin besiyerine aktarıldıktan sonra plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler (pMA-MUC1VNTR, pMA-CTLA4 ve pMA-GMCSF), agaroz jel üzerinde 60 V'de 90 dakika yürütülerek görüntülendi (Şekil 13).

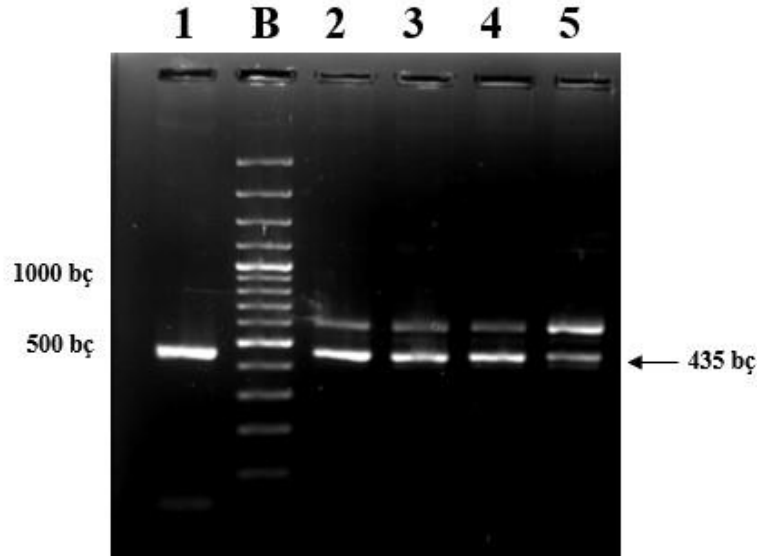


Şekil 13. İzole edilen plazmitlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü
(B; belirteç, 1. kuyu: pMA-MUC1VNTR, 2. kuyu: pMA-CTLA4, 3. kuyu: pMA-GMCSF)

GM-CSF Geninin Klonlanması

GM-CSF geninin gradyan PCR ile amplifikasyonu

GM-CSF geni, Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz enzimi kullanılarak gradyan PCR ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucunda 55 °C, 61 °C, 62 °C ve 63 °C sıcaklıklarında 435 baz çiftlik bantlar tespit edildi. En belirgin bantın 55 °C'de olduğu gözlemlendi. Bu bulgulara dayanarak, GM-CSF geninin DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılması için primer bağlama sıcaklığı olarak 55 °C seçildi (Şekil 14).



Şekil 14. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

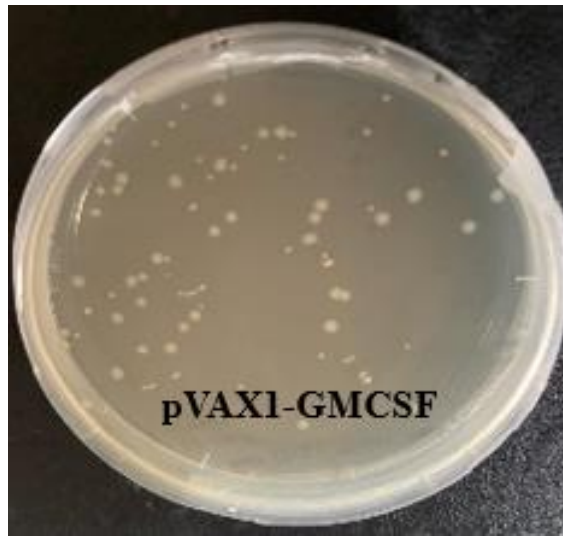
(B: Belirteç; 1-5. kuyular: 55 °C, 61 °C, 62 °C ve 63 °C’de gerçekleştirilen PCR ürünleri)

GM-CSF geninin ve pVAX1’in endonükleaz enzimleriyle kesilmesi

PCR ile elde edilen GM-CSF geni saflaştırıldı ve *XhoI* ile *XbaI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi. Aynı enzimlerle kesilen vektör DNA (pVAX1) da agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Elektroforez sonuçları, GM-CSF geninin ve vektör DNA’nın başarılı bir şekilde kesildiğini doğruladı.

***E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu**

Ligasyon ürünlerinin kompetan *E. coli* JM109 hücrelerine transformasyonunun ardından LB agar- kanamisin besiyerinde kolonilerin gelişimi Şekil 15’teki gibi gözlemlendi.

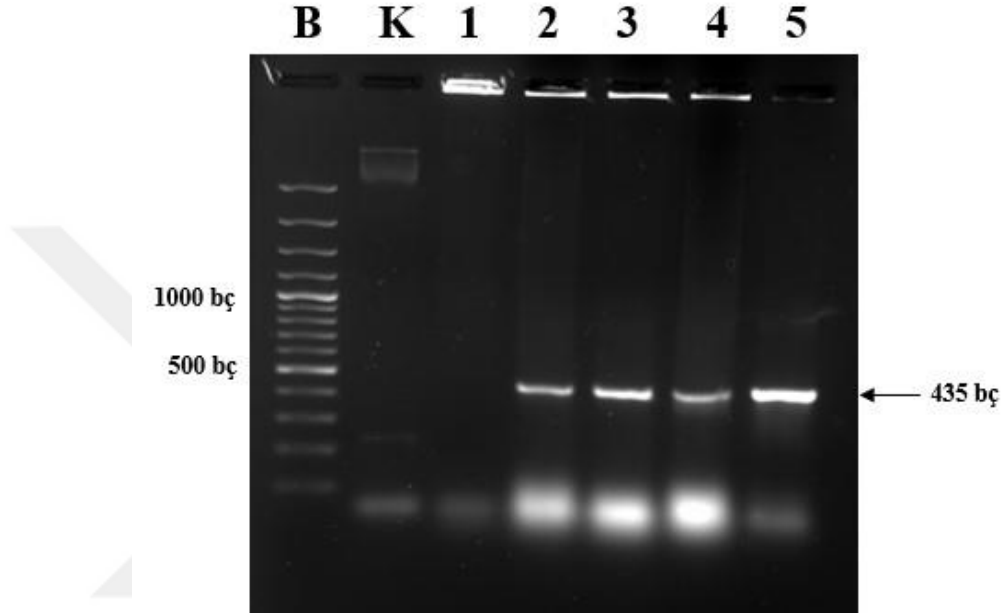


Şekil 15. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri

Geni taşıyan transformantların belirlenmesi

GM-CSF genine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR

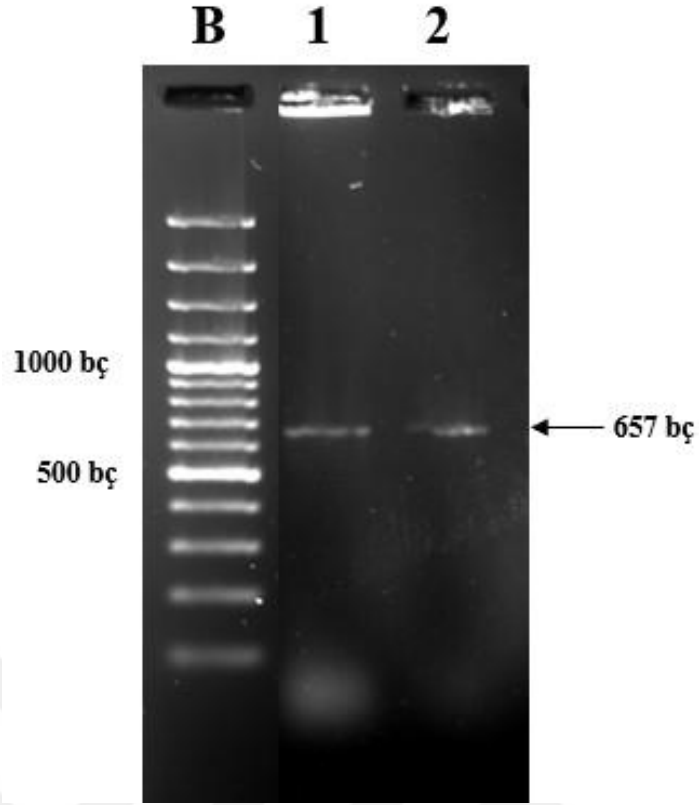
Transformasyon sonrasında besiyerinde gelişen kolonilerden 5 tane seçilerek gene ait primerler ile 55 °C'de koloni PCR yapıldı. Koloni PCR sonrasında elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde 60 V'de 90 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi (Şekil 16). Görüntüleme sonucu 2, 3, 4 ve 5 numaralı kuyularda 435 bp uzunluğunda bant görüldü.



Şekil 16. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

(B: belirteç; K: kontrol (pVAX1); 1-5. kuyular: 1, 13, 14, 15 ve 16 numaralı koloniler ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)

Ayrıca transformasyon sonrası gerçekleştirilen koloni PCR ile elde edilen sonuca göre seçilen 2 koloniden gen ve vektör DNA'ya ait primerler (CMV F ve GM-CSF R) kullanılarak 56,5 °C'de koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası koloni PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Beklenen boyutla (657 bp uzunluğunda) aynı uzunlukta bant görüldü (Şekil 17).



Şekil 17. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

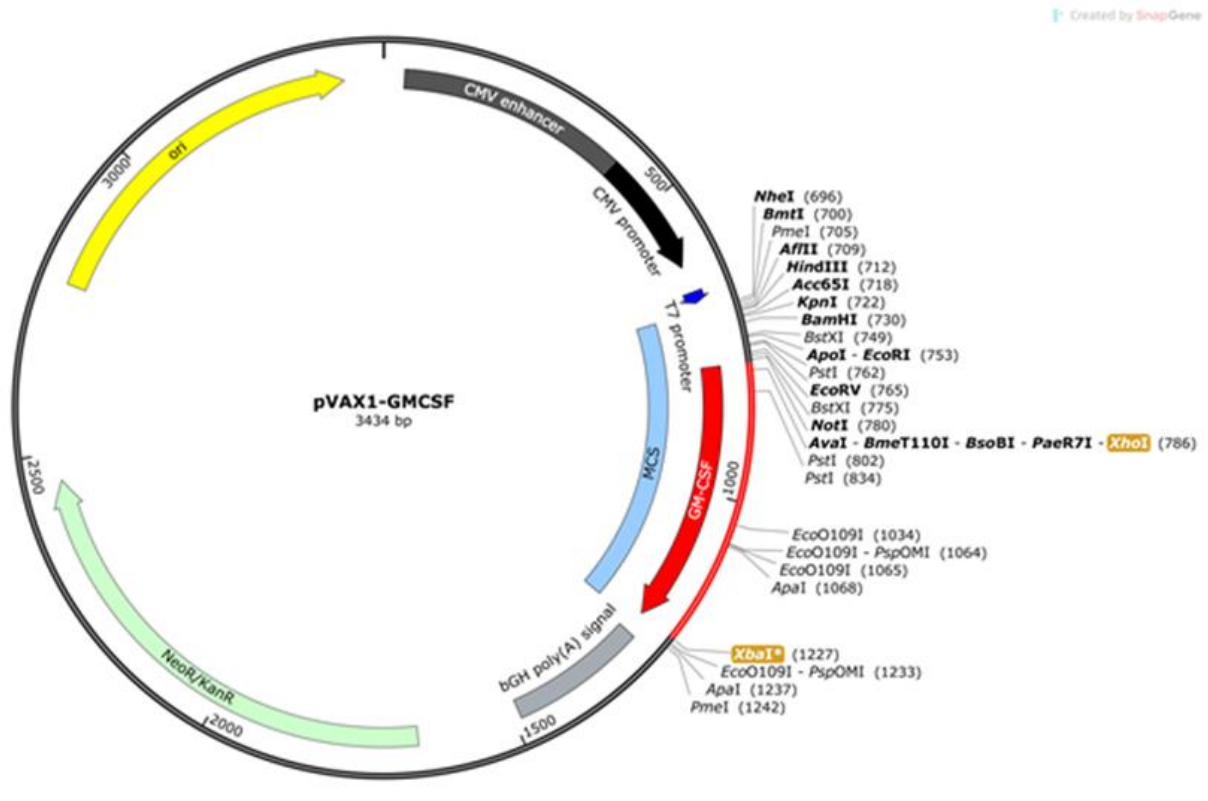
(B: Belirteç; 1 ve 2. kuyular: 13 ve 15 numaralı koloniler ile gerçekleştirilen koloni PCR ürünleri)

Muhtemel rekombinant plazmitlerin dizi analizi

Dizi analiz sonucu elde edilen nükleotid dizisi, GM-CSF nükleotid dizisi ile blastlandığında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benzerliklerin %100 olduğu görüldü (Şekil 18). Elde edilen rekombinant pVAX1-GMCSF'nin SnapGene ile çizilmiş haritası Şekil 19' de verildi.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
804 bits(435)	0.0()	435/435(100%)	0/435(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGCC	60			
Sbjct 194	ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACTGTGGCCTGCAGCATCTCTGCACCCGCC	253			
Query 61	CGCTCGCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGG	120			
Sbjct 254	CGCTCGCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCCATCCAGGAGGCCCGG	313			
Query 121	CGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATC	180			
Sbjct 314	CGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACACTGCTGCTGAGATGAATGAAACAGTAGAAGTCATC	373			
Query 181	TCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAG	240			
Sbjct 374	TCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGACCTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAG	433			
Query 241	CAGGGCCTGCGGGGAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCTTGACCATGATGGCCAGCCAC	300			
Sbjct 434	CAGGGCCTGCGGGGAGCCTCACCAAGCTCAAGGGCCCTTGACCATGATGGCCAGCCAC	493			
Query 301	TACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCGGAACTTCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTT	360			
Sbjct 494	TACAAGCAGCACTGCCCTCCAACCCGGAACTTCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTT	553			
Query 361	GAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTCTGCTTGTATCCCCCTTGACTGCTGGGAG	420			
Sbjct 554	GAAAGTTTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTCTGCTTGTATCCCCCTTGACTGCTGGGAG	613			
Query 421	CCAGTCCAGGAGTGA	435			
Sbjct 614	CCAGTCCAGGAGTGA	628			

Şekil 18. Vektör DNA'ya ait primerler ile gerçekleştirilen Sanger dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisinin blast sonucu (Query: NCBI'dan referans alınan dizi, Sbjct: Sanger analizi sonucu elde edilen dizi)

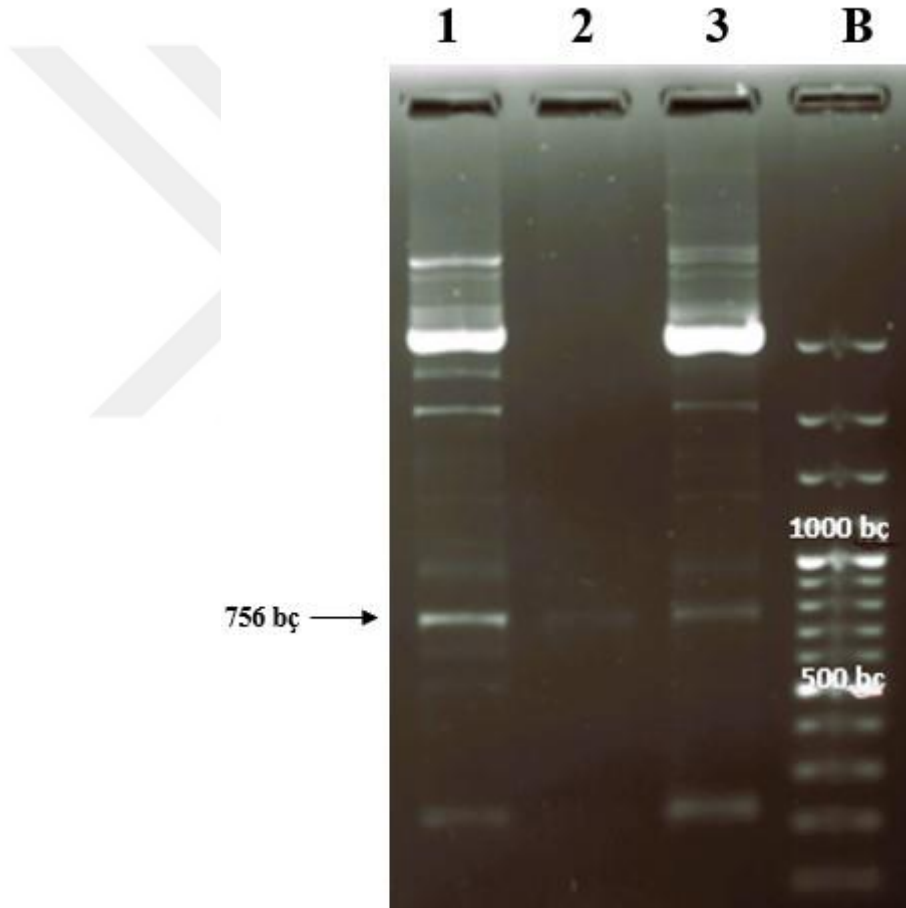


Şekil 19. pVAX1-GMCSF'nin SnapGene'de çizilen haritası

CTLA-4 Geninin Klonlanması

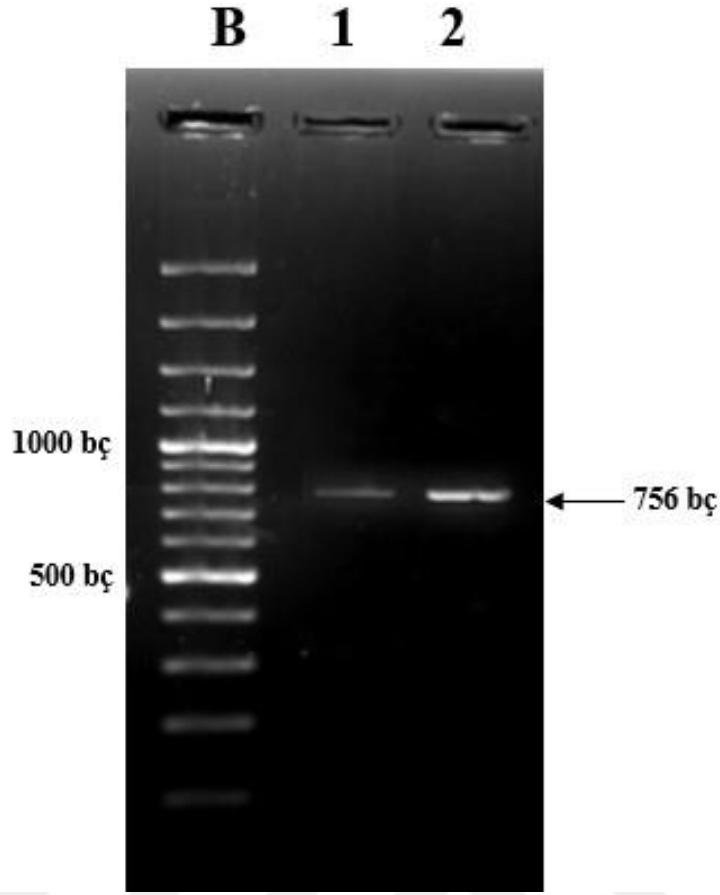
CTLA-4 geninin gradyan PCR ile amplifikasyonu

CTLA-4 geni, Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz enzimi kullanılarak gradyan PCR ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucunda 62 °C, 63 °C ve 64 °C sıcaklıklarında 756 baz çiftlik bantlar tespit edildi. CTLA-4 geninin çoğaltılabilmesi için en uygun primer bağlanma sıcaklığı 63 °C olarak belirlendi (Şekil 20). Ardından CTLA-4 geni, tekrar HF DNA polimeraz enzimi kullanılarak 63,5 °C ve 64,5 °C’de ikinci bir gradyan PCR yapılarak çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldüğünde her iki primer bağlanma sıcaklığında 756 baz çiftlik bantlar tespit edildi. Ancak en belirgin bantın 64,5 °C’de olduğu gözlemlendi (Şekil 21).



Şekil 20. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

(B: Belirteç; 1-3. kuyular: 64 °C, 62 °C ve 63 °C’de gerçekleşen PCR ürünleri)



Şekil 21. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

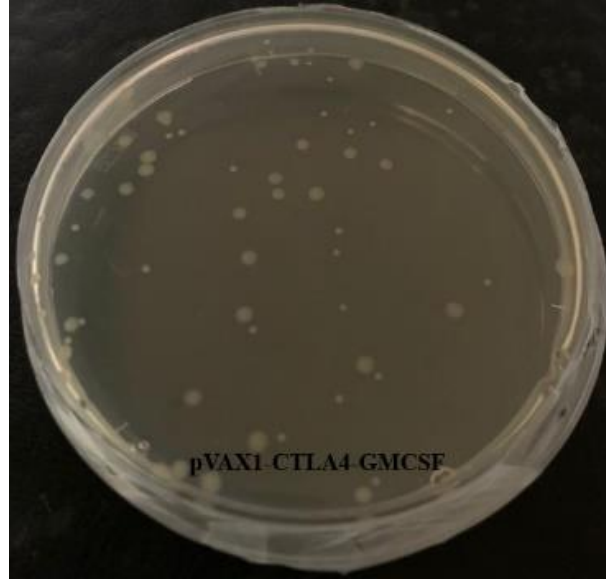
(B: Belirteç; 1 ve 2. kuyular: 63,5 °C ve 64,5 °C’de gerçekleştirilen PCR ürünleri)

CTLA-4 geninin ve pVAX1-GMCSF’nin endonükleaz enzimleriyle kesilmesi ve görüntülenmesi

PCR ile elde edilen CTLA-4 geni saflaştırıldı ve *XhoI* ile *NotI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi. Aynı enzimlerle kesilen pVAX1-GMCSF’de agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Elektroforez sonuçları, CTLA-4 geninin ve pVAX1-GMCSF’nin başarılı bir şekilde kesildiğini doğruladı.

***E. coli* JM109 hücrelerinin transformasyonu**

Ligasyon ürünlerinin kompetan *E. coli* JM109 hücrelerine transformasyonunun ardından LB agar- kanamisin besiyerinde kolonilerin gelişimi Şekil 22’ deki gibi gözlemlendi.

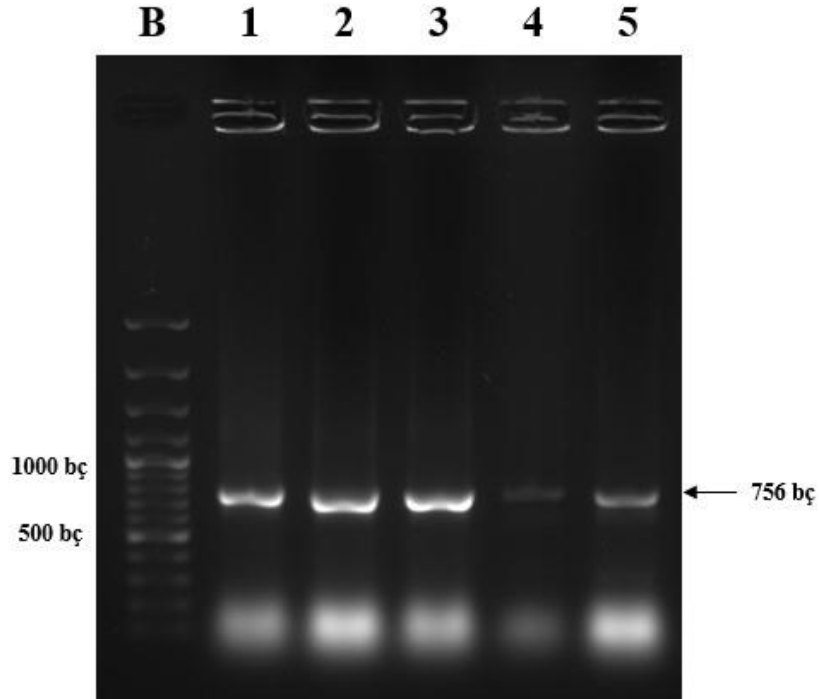


Şekil 22. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri

Geni taşıyan transformantların belirlenmesi

CTLA-4 genine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR

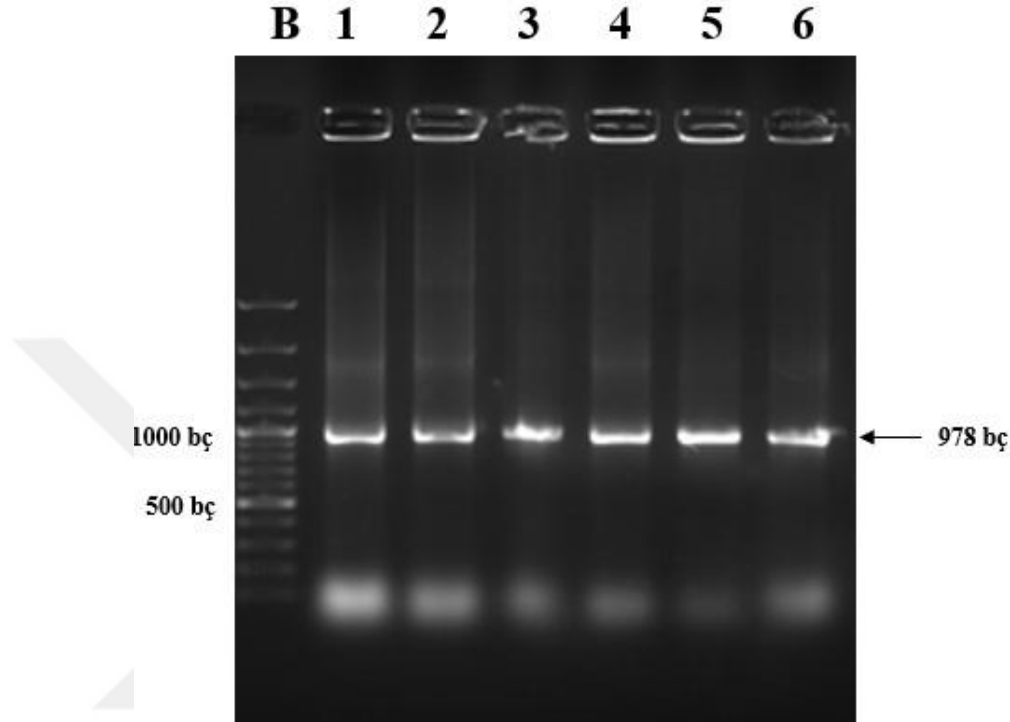
Transfomasyon sonrasında besiyerinde gelişen kolonilerden 5 tane seçilerek gene ait primerler ile koloni PCR yapıldı. Koloni PCR sonrasında elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde 60V'de 90 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi (Şekil 23). Görüntüleme sonucuna göre; bütün kuyularda 756 bp uzunluğunda bant görüldü.



Şekil 23. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

(B: Belirteç; 1-5. kuyular: 1- 5 numaralı koloniler ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)

Ayrıca transformasyon sonrası gerçekleştirilen koloni PCR ile elde edilen sonuca göre seçilen 2 koloniden gen ve plazmit DNA'ya ait primerler (CMV F ve CTLA-4 R) kullanılarak koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası koloni PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 24). Görüntüleme sonucuna göre CMV F ve CTLA-4 R arası mesafe 978 bp uzunluğunda olduğundan aynı büyüklükte bant görüldü.



Şekil 24. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü
(B: Belirteç; 1-6. kuyular: 1-6 numaralı koloniler ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)

Muhtemel rekombinant plazmitin dizi analizi

Dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi, CTLA-4 gen dizisi ile blastlandığında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benzerliğin %99 olduğu görüldü. Bu durumun gen dizisinin sonunda bulunan eşleşmeyen 2 adet nükleotitten kaynaklandığı belirlendi (Şekil 25). Bu baz değişikliklerinin, CTLA-4 gen dizisinin sonuna bağlayıcı olarak eklenen F-2A dizisinde olduğu belirlendi. Bu amaçla F-2A dizisinden kodlanan aminoasit dizileri belirlendi. (F-2A baz dizisi: AGGGCCAAACGAGCGCCGGTAAAACAGACGTTGAATTCGATCTTCTTAAATTGGCAGGTGATGTTGAGAGCAATCCGGGCCCC). 78. ve 81. bazların wobble bazı olduğundan meydana gelen bu farklılıkların (78. baz G>A, 81. baz C>T) dizinin kodladığı aminoasit dizisinde herhangi bir değişiklik meydana getirmediği (26. aminoasit Prolin, 27. aminoasit: Glisin) görüldü (Şekil 26). Böylece rekombinant pVAX1-CTLA4-GMCSF elde edilmiş oldu ve 1 numaralı koloniden izole edilen pVAX1-CTLA4-GMCSF'nin kullanılmasına karar verildi. Elde edilen rekombinant pVAX1-CTLA4-GMCSF'nin SnapGene ile çizilmiş haritası Şekil 27'de verildi.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1386 bits(750)	0.0	754/756(99%)	0/756(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCTTGCCCTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCTACCAGGACCTGG	60		
Sbjct 187	ATGGCTTGCCCTGGATTTCAGCGGCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCTACCAGGACCTGG	246		
Query 61	CCCTGCACCTCTCCTGTTTTTCTTCTCTTCATCCCTGTCTTCTGCAAAGCAATGCACGTG	120		
Sbjct 247	CCCTGCACCTCTCCTGTTTTTCTTCTCTTCATCCCTGTCTTCTGCAAAGCAATGCACGTG	306		
Query 121	GCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGAGGCATCGCCAGCTTTGTGTGTGAGTAT	180		
Sbjct 307	GCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGAGGCATCGCCAGCTTTGTGTGTGAGTAT	366		
Query 181	GCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAG	240		
Sbjct 367	GCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAG	426		
Query 241	GTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATGGGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGAT	300		
Sbjct 427	GTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATGGGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGAT	486		
Query 301	TCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAAGTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGG	360		
Sbjct 487	TCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAATCAAGTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGG	546		
Query 361	GCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCGCCATACTAC	420		
Sbjct 547	GCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCGCCATACTAC	606		
Query 421	CTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTATGTAAATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCT	480		
Sbjct 607	CTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTATGTAAATTGATCCAGAACCGTGCCAGATTCT	666		
Query 481	GACTTCCTCCTCTGGATCCTTGACAGCTTAGTTTCGGGGTTGTTTTTTATAGCTTTCTC	540		
Sbjct 667	GACTTCCTCCTCTGGATCCTTGACAGCTTAGTTTCGGGGTTGTTTTTTATAGCTTTCTC	726		
Query 541	CTCACAGCTGTTTCTTTGAGCAAAATGCTAAAGAAAAGAAGCCCTCTTACAACAGGGGTC	600		
Sbjct 727	CTCACAGCTGTTTCTTTGAGCAAAATGCTAAAGAAAAGAAGCCCTCTTACAACAGGGGTC	786		
Query 601	TATGTGAAAATGCCCCAACAGAGCCAGAATGTGAAAAGCAATTTAGCCTTATTTTATT	660		
Sbjct 787	TATGTGAAAATGCCCCAACAGAGCCAGAATGTGAAAAGCAATTTAGCCTTATTTTATT	846		
Query 661	CCCATCAATTGAAGGGCCAAGAGGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTC	720		
Sbjct 847	CCCATCAATTGAAGGGCCAAGAGGGCACCGGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTC	906		
Query 721	AAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCTGGGCCC	756		
Sbjct 907	AAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCAGGTCCC	942		

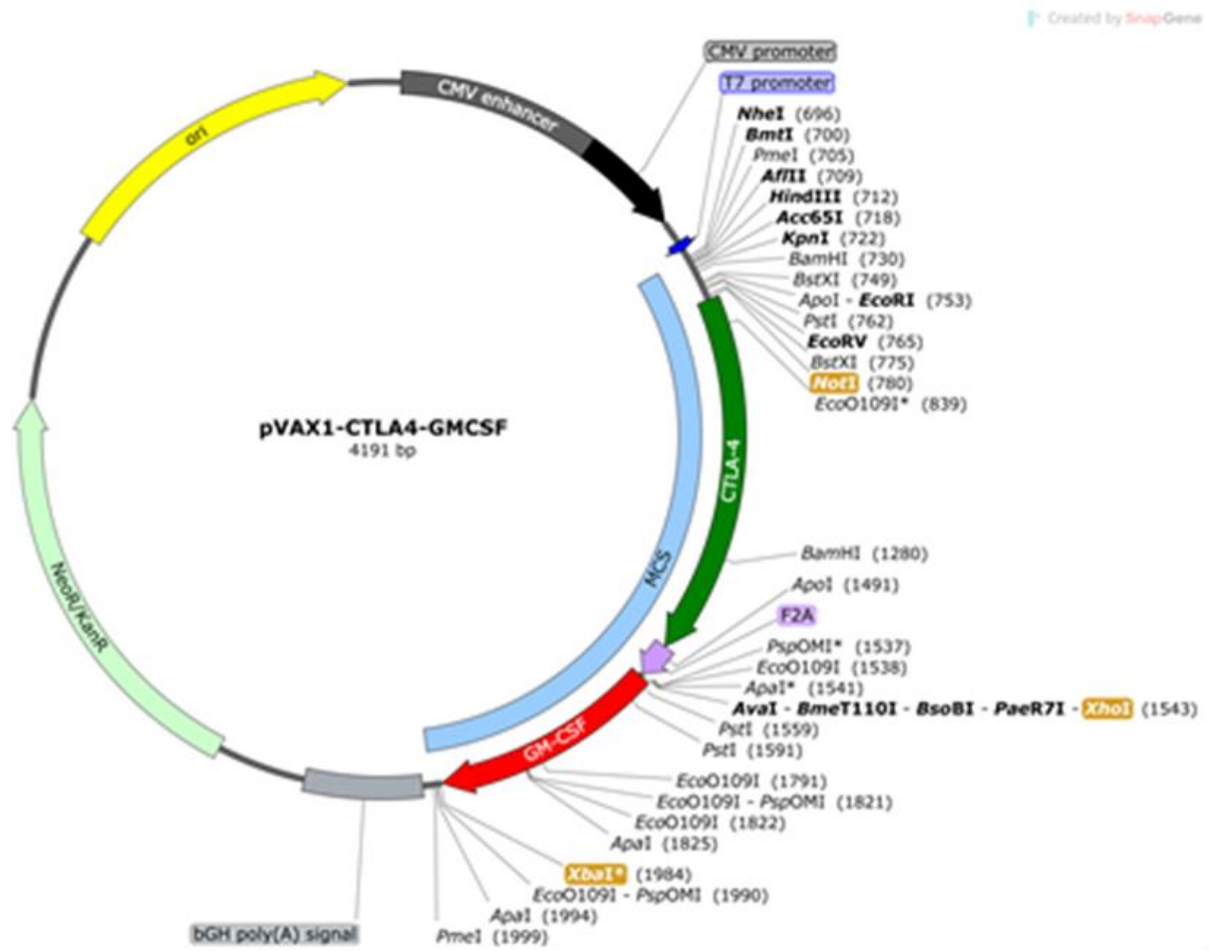


Şekil 25. Vektör DNA'ya ait primerler ile gerçekleştirilen Sanger dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin blast sonucu (Query: NCBI'dan referans alınan dizi, Sbjct: Sanger analizi sonucu elde edilen dizi)

Manual Optimization

1. R AGA AGG CGG CGC CGA GGT	2. A GCC GCT GCA GCG	3. K AAG AAA	4. R AGA AGG CGG CGC CGA GGT	5. A GCC GCT GCA GCG	6. P CCC CCT CCA CCG	7. V GTG GTC GTT GTA	8. K AAG AAA	9. Q CAG CAA	10. T ACC ACA ACT ACG
11. L CTG CTC TTG CTT TTA CTA	12. N AAC AAT	13. F TTC TTT	14. D GAC GAT	15. L CTG CTC TTG CTT TTA CTA	16. L CTG CTC TTG CTT TTA CTA	17. K AAG AAA	18. L CTG CTC TTG CTT TTA CTA	19. A GCC GCT GCA GCG	20. G GGC GGA GGG GGT
21. D GAC GAT	22. V GTG GTC GTT GTA	23. E GAG GAA	24. S AGC TCC TCT TCA AGT TGG	25. N AAC AAT	26. P CCC CCT CCA CCG	27. G GGC GGA GGG GGT	28. P CCC CCT CCA CCG		

Şekil 26. F-2A'ya ait aminoasit dizisi ve bu aminoasitleri şifreleyen kodonlar (IDT Codon Optimization Tool' dan elde edilmiştir.)

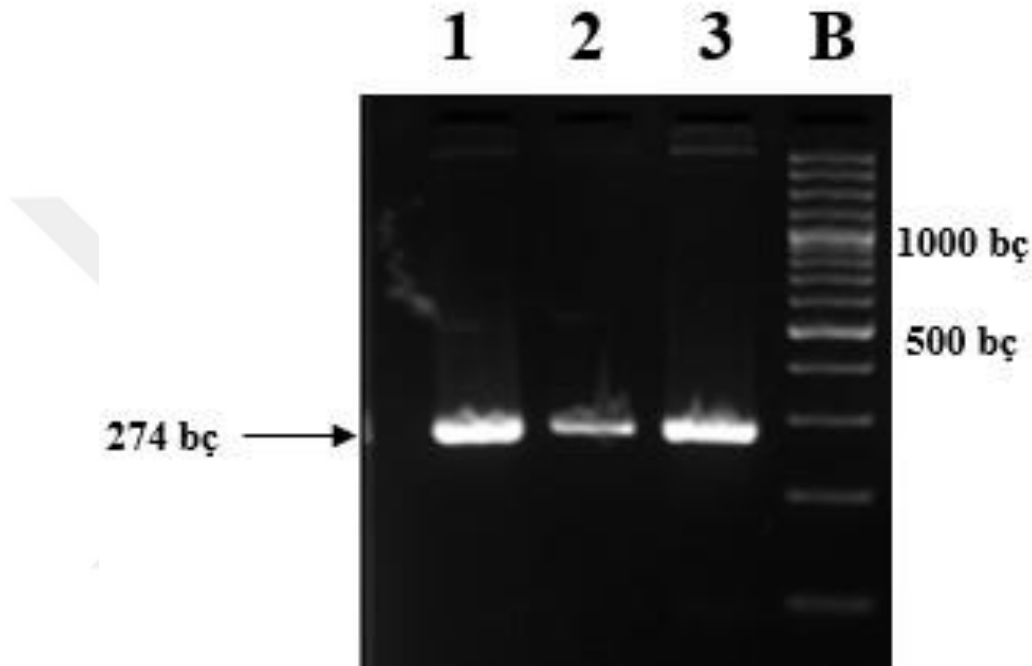


Şekil 27. pVAX1-CTLA4-GMCSF'nin SnapGene'de çizilen haritası

Muc1-VNTR Dizisinin Klonlanması

Muc1-VNTR dizisinin gradyan PCR ile amplifikasyonu

Muc1-VNTR dizisi, Phusion High-Fidelity (HF) DNA polimeraz enzimi kullanılarak gradyan PCR ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucunda 55 °C, 56 °C ve 57 °C sıcaklıklarında 274 baz çifti büyüklüğünde bantlar tespit edildi. Muc1- VNTR dizisinin HF DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılabilmesi için en uygun primer bağlanma sıcaklığı 57 °C olarak belirlendi (Şekil 28).



Şekil 28. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

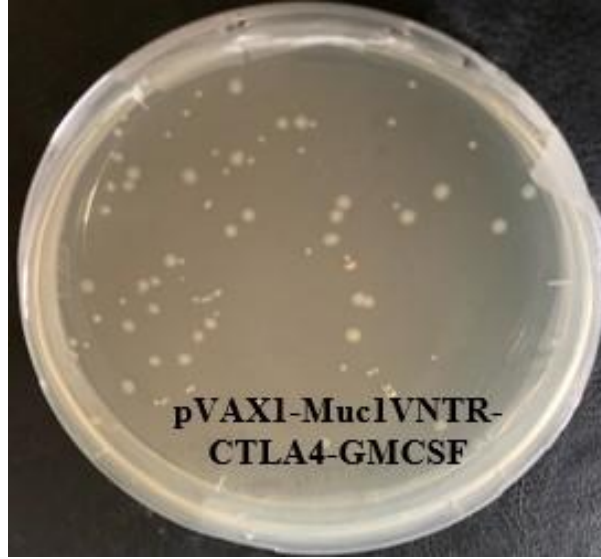
(B: Belirteç; 1.2. ve 3. kuyular: 55 °C, 56 °C ve 57 °C’de gerçekleştirilen gradyan PCR ürünleri)

Muc1-VNTR peptit dizisinin ve pVAX1-CTLA4-GMCSF’nin endonükleaz enzimleriyle kesilmesi ve görüntülenmesi

PCR ile elde edilen Muc1-VNTR dizisi saflaştırıldı ve *EcoRI* ile *NotI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi. Aynı enzimlerle kesilen pVAX1-CTLA4-GMCSF’de agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Elektroforez sonuçları, Muc1-VNTR dizisinin ve pVAX1-CTLA4-GMCSF’nin başarılı bir şekilde kesildiğini doğruladı.

E. coli JM109 hücrelerinin transformasyonu

Ligasyon ürünlerinin kompetan *E. coli* JM109 hücrelerine transformasyonunun ardından LB agar- kanamisin besiyerinde kolonilerin gelişimi Şekil 29’daki gibi gözlemlendi.

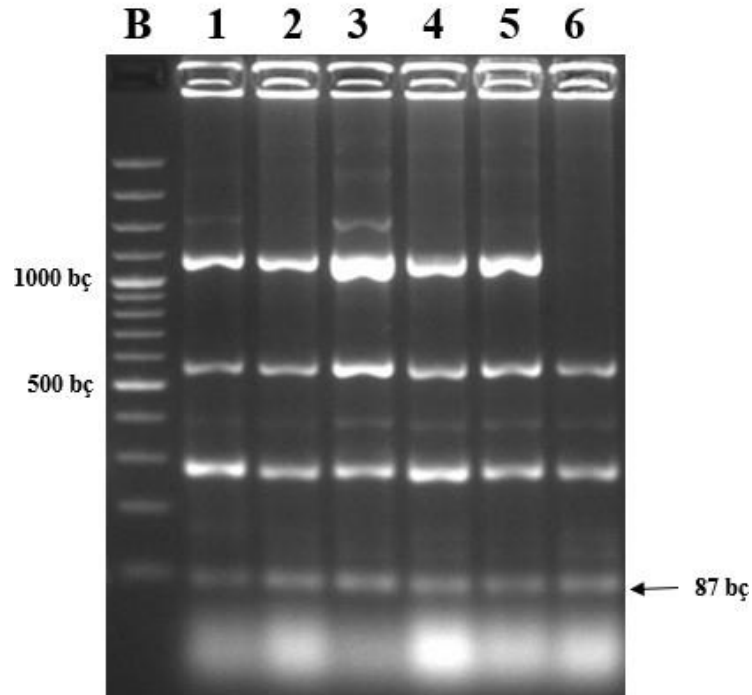


Şekil 29. İnkübasyon sonrası gelişen bakteri kolonileri

Geni taşıyan transformantların belirlenmesi

Muc1-VNTR dizisine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR

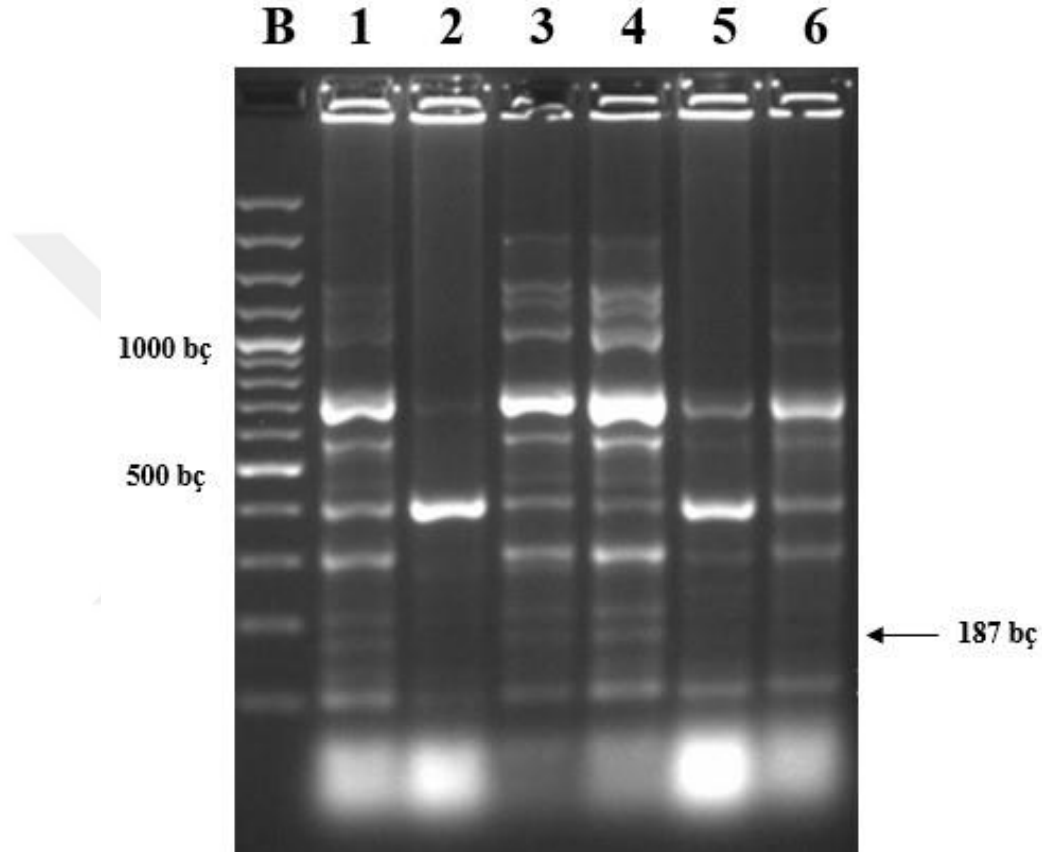
Transformasyon sonrasında besiyerinde gelişen kolonilerden 6 tane seçilerek gene ait primerler ile koloni PCR yapıldı. PCR sonrasında elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde 60V'de 90 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntüledi. Görüntüleme sonucuna göre; seçilen kolonilerin tamamında beklendiği gibi 87 bç uzunluğunda bant görüldü. Sonuç olarak 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 numaralı kolonilerin muhtemel rekombinant plazmitleri taşıdığı belirlendi (Şekil 30).



Şekil 30. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

(B: Belirteç; 1-6. kuyular: 1-6 numaralı koloniler ile gerçekleştirilen PCR ürünleri.)

Ayrıca transformasyon sonrası gerçekleştirilen koloni PCR ile elde edilen sonuca göre seçilen 6 koloni içinde gen ve plazmit DNA'ya ait primerler (CMV F ve Muc1-VNTR R) kullanılarak koloni PCR yapıldı. Reaksiyon sonrası PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde 60V'de 90 dakika boyunca yürütüldükten görüntülendi. Görüntüleme sonucuna göre; CMV F ve Muc1-VNTR R arası mesafe 187 bç uzunluğunda olduğundan bütün kuyularda aynı uzunlukta bant görüldü (Şekil 31).

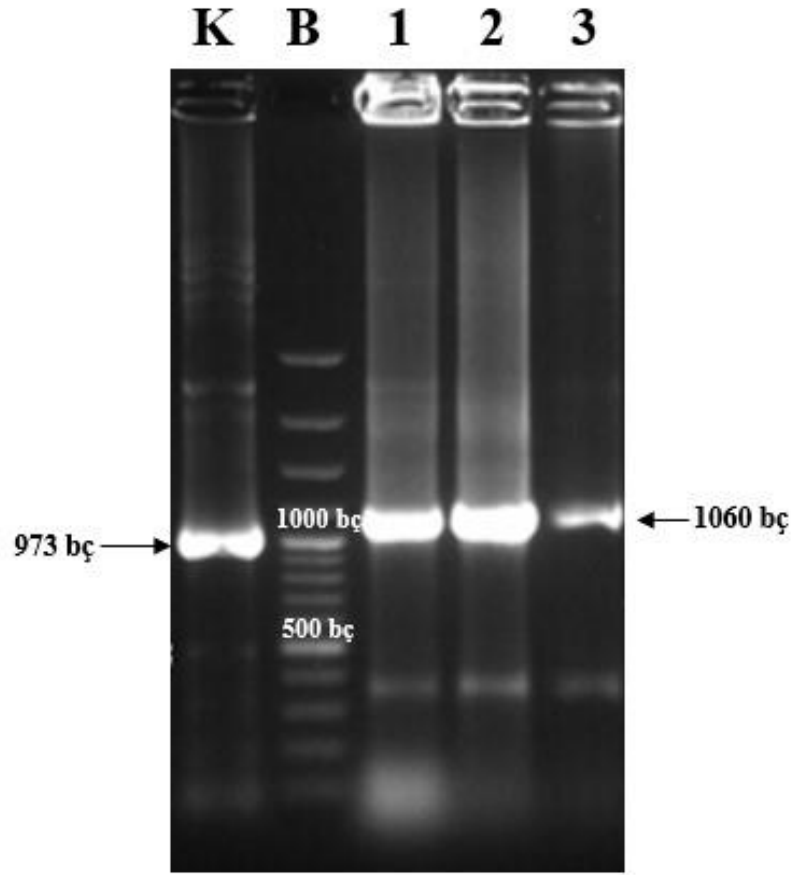


Şekil 31. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

(B: Belirteç; 1-6. kuyular: 1-6 numaralı koloniler ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)

CTLA-4 genine ve vektör DNA'ya ait primerler kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR

Daha sonra 1, 2 ve 3 numaralı kolonileri için 59 °C'de CMV F ve CTLA4 R primerlerini kullanarak koloni PCR yapıldıktan sonra koloni PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde 60V'de 90 dakika boyunca yürütüldükten sonra görüntülendi. pVAX1-CTLA4-GMCSF'nin CMV F ve CTLA-4 R primerleri ile elde edilen PCR ürünü 973 bç uzunluğunda (Kontrol: K) görülürken , 1.-3. Kuyularda 1060 bç uzunluğunda bantlar görüldü. Bu aradaki uzunluk farkı 87 bç uzunluğunda olan Muc1-VNTR peptit dizisinin, pVAX1-CTLA4-GMCSF' ye klonlandığını gösterdi (Şekil 32).



Şekil 32. Koloni PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

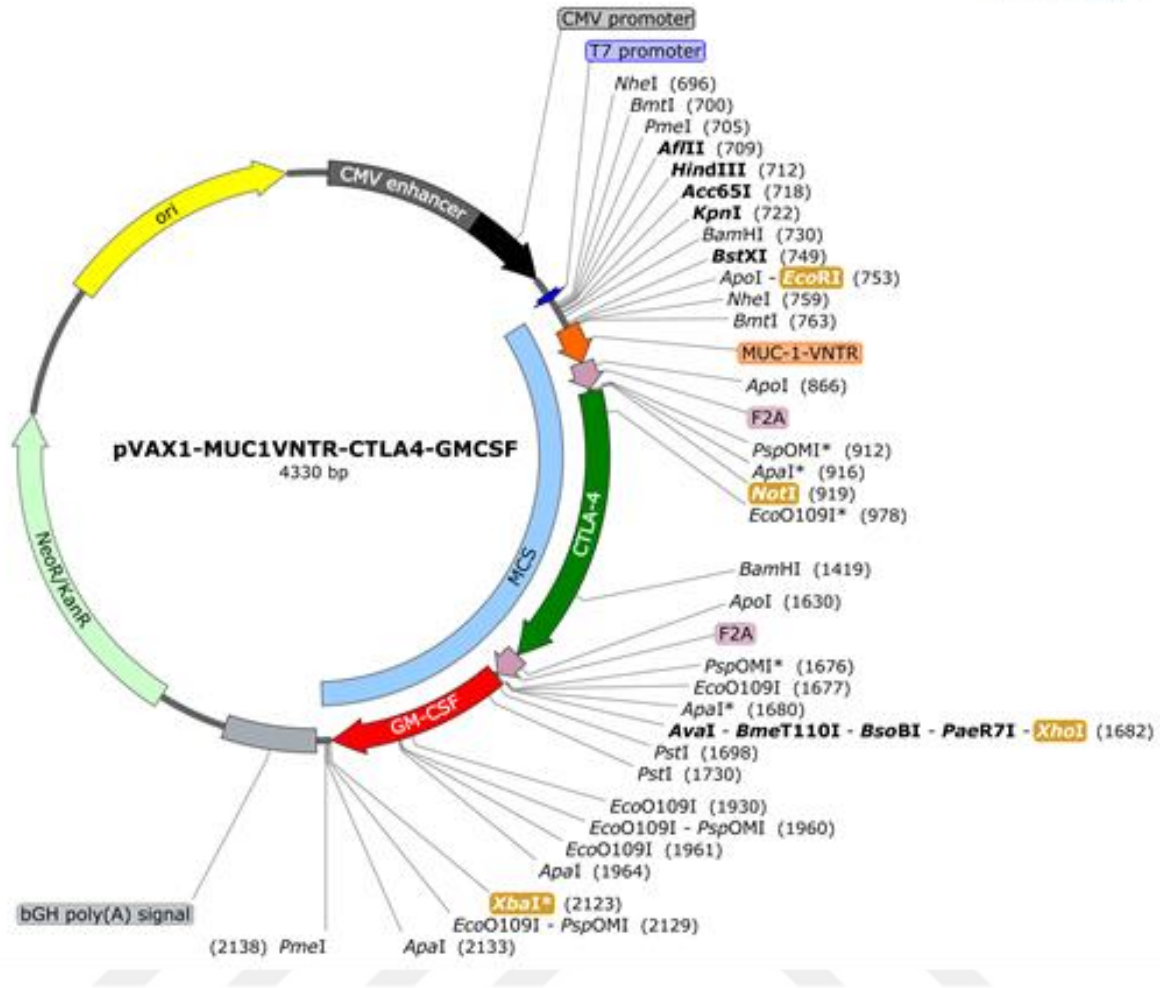
(B: Belirteç; K: Kontrol (pVAX1-CTLA4-GMCSF); 1-3. kuyular: 1-3 numaralı koloniler ile gerçekleştirilen PCR ürünleri)

Muhtemel rekombinant plazmitlerin dizi analizi

Dizi analiz sonucu elde edilen nükleotid dizisi, Muc1-VNTR nükleotid dizisi ile blastlandığında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) benzerliklerin %100 olduğu görüldü (Şekil 33). Elde edilen rekombinant pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF'nin SnapGene ile çizilmiş haritası Şekil 34' da verildi.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
320 bits(173)	6e-92	173/173(100%)	0/173(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAATTCGCTAGCGCCACCATGCCGGGCTCCACCG	ccccccAGCCACGGTGTCACTCG	60	
Sbjct 150	GAATTCGCTAGCGCCACCATGCCGGGCTCCACCG	ccccccAGCCACGGTGTCACTCG	209	
Query 61	GCCCCGGACACAGGCCGGCCAGGGCCAAGAGGG	CACCGTGAAACAGACTTTGAATTT	120	
Sbjct 210	GCCCCGGACACAGGCCGGCCAGGGCCAAGAGGG	CACCGTGAAACAGACTTTGAATTT	269	
Query 121	GACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCA	ACCCTGGGCCCGCGGCCGC	173	
Sbjct 270	GACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTCGAGTCCA	ACCCTGGGCCCGCGGCCGC	322	

Şekil 33. Vektör DNA'ya ait primerler ile gerçekleştirilen Sanger dizi analizi ile elde edilen nükleotid dizisinin blast sonucu (Query: NCBI'dan referans alınan dizi, Sbjct: Sanger analizi sonucu elde edilen dizi)



Şekil 34. pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF'nin SnapGene'de çizilen haritası

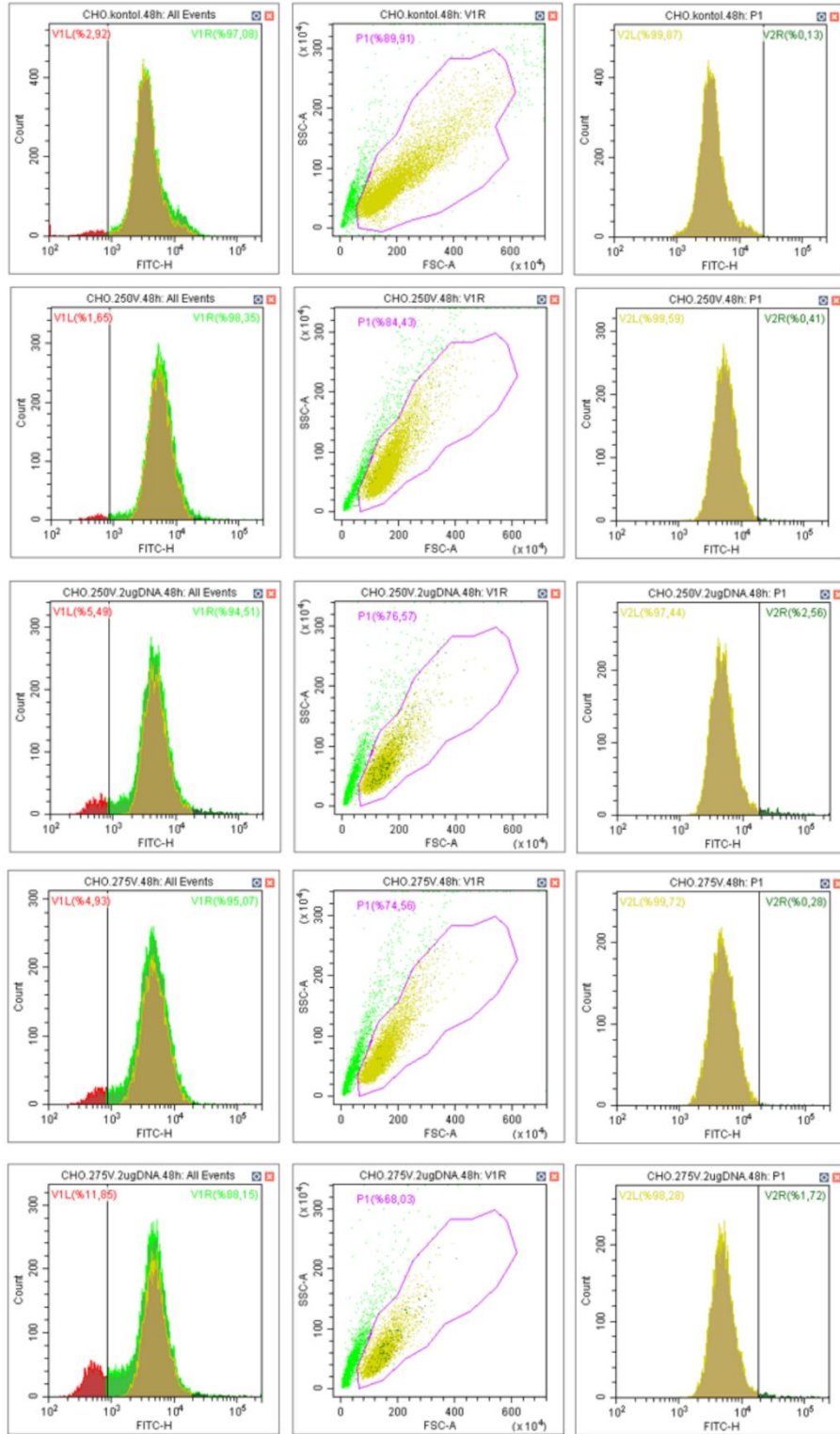
Rekombinant pVAX1-GMCSF, pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX1-MUC1VNTR-CTLA4-GMCSF plazmitleri, heterolog protein üretimi amacıyla memeli ökaryotik hücre hattı olan CHO (Çin Hamster Yumurtalığı) hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle aktarıldı. Bu işlem öncesinde, pCMV-GFP'nin CHO hücrelerine elektroporasyon ile transferi için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Akış sitometri analiz sonuçları

Farklı voltajlarda uygulanan elektroporasyonun, CHO hücrelerinde üretilen GFP miktarını etkilediği gözlemlendi. Uygulanan voltajın transfeksiyon etkinliğine olan etkisini belirlemek amacıyla 2 µg pCMV-GFP, CHO hücrelerine sırasıyla 250 V ve 275 V'de aktarıldı. Akış sitometri analizi sonucunda, 48 saat sonunda en yüksek transfeksiyon etkinliği 250 V'de %2,58, 275 V'de ise %1,72 olarak tespit edildi. Bu sonuçlara göre, CHO hücrelerine

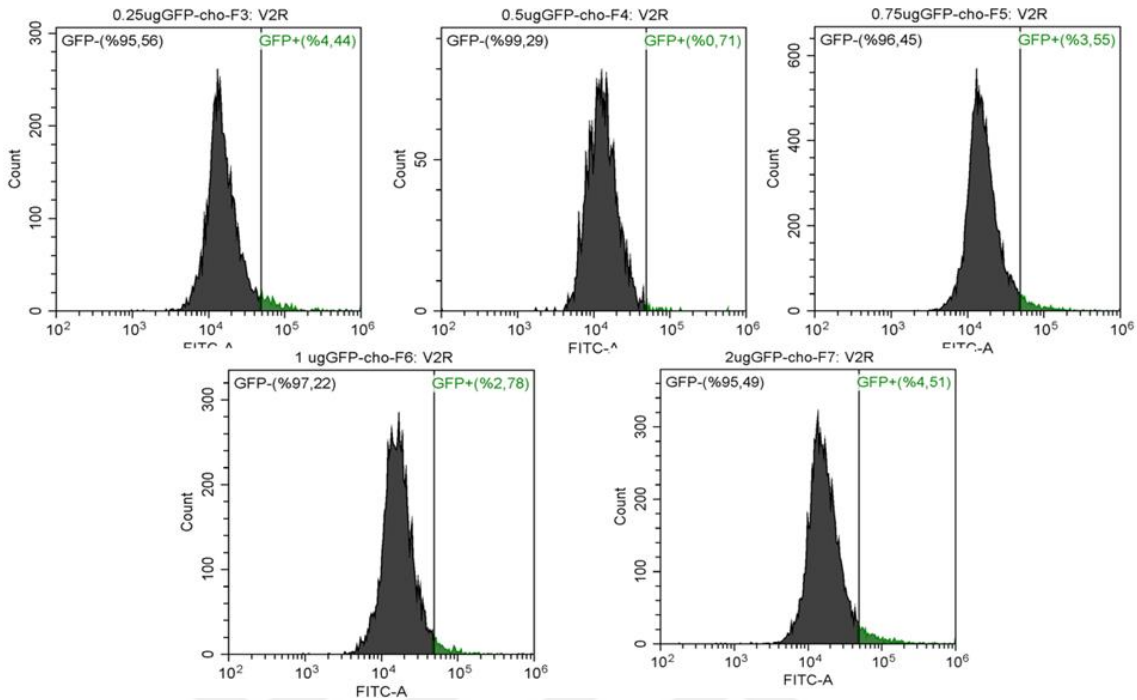
elektroporasyon aracılığıyla gen aktarımı için en iyi transfeksiyon etkinliğinin 250 V'de gerçekleştiği belirlendi. (Şekil 35).



Şekil 35. Akış sitometri sonuçları 1

Daha sonra, 250 V'de farklı miktarlarda (0,25 µg, 0,5 µg, 0,75 µg, 1,00 µg ve 2,00 µg) pCMV-GFP, CHO hücrelerine transfer edildi. Akış sitometri analizi sonuçlarına göre, 48 saatin

sonunda en yüksek GFP üretimi, %4,52 ile 2,00 µg pCMV-GFP kullanılan grupta gerçekleşti (Şekil 36).

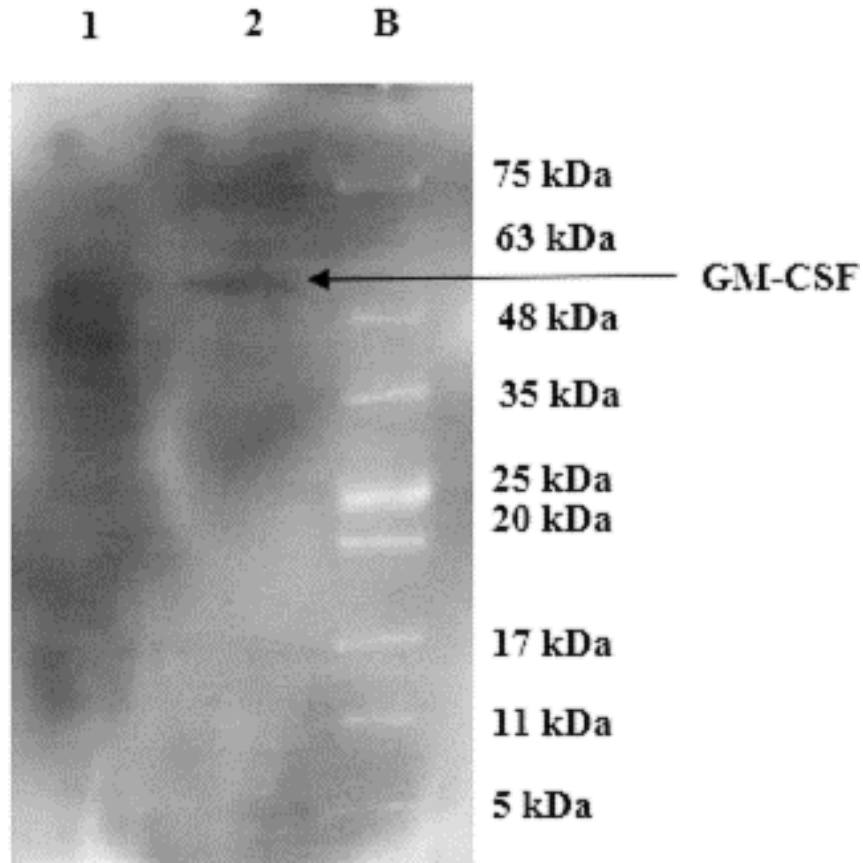


Şekil 36. Akış sitometri sonuçları 2

pVAX1-GMCSF'nin CHO Hücrelerine Elektroporasyon Aracılı Transfeksiyonu

Western blot analizi sonucu

Rekombinant pVAX1-GMCSF, belirlenen koşullarda (250 V, 2 µg DNA ve 2×10^6 CHO hücresi) elektroporasyon yöntemiyle CHO hücrelerine aktarıldı. Hücreler 48 saat sonra RIPA tampon ile parçalandı ve western blot analizi yapıldı. Analiz sonucunda, CHO hücrelerinde rekombinant GM-CSF proteininin varlığı tespit edildi. Elde edilen protein, CHO hücresinde gerçekleşen glikolizasyon farklılığından dolayı yaklaşık 55 kDa moleküler kütlede gözlemlendi (Şekil 37).

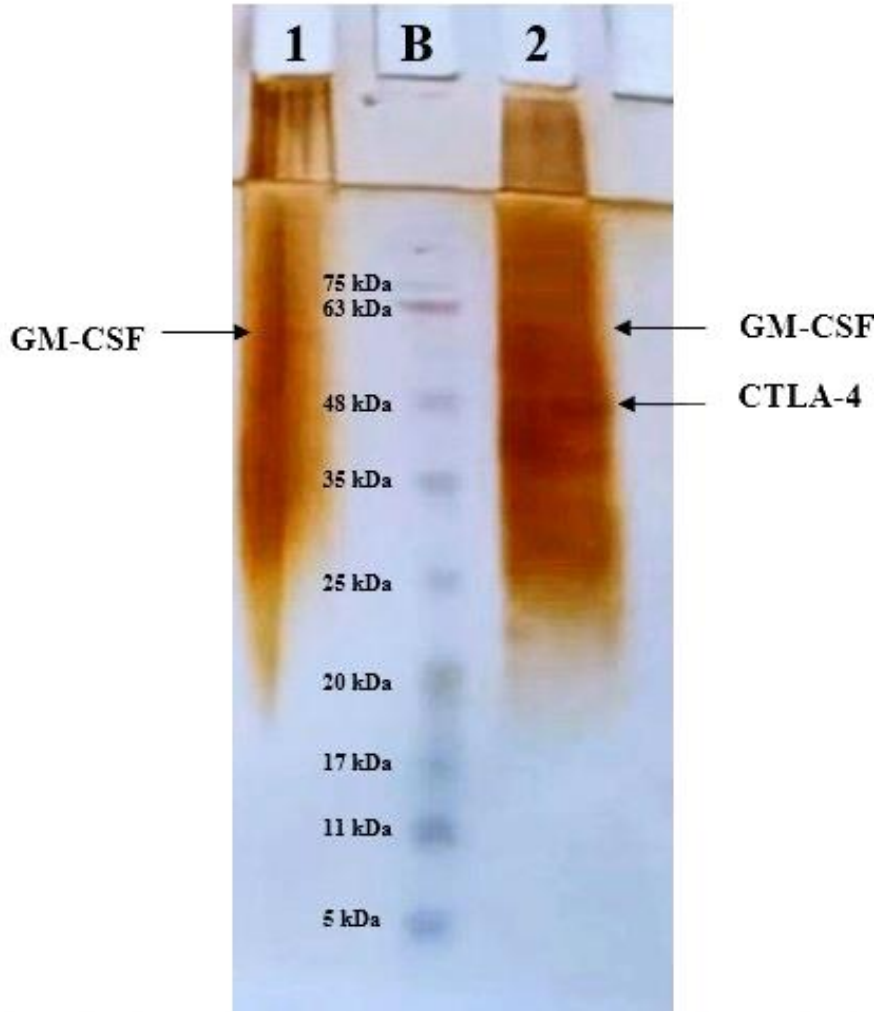


Şekil 37. GM-CSF proteininin western blot görüntüsü

(B: Belirteç; 1: pVAX1 ile transfecte edilen CHO hücre lizati, 2: pVAX1-GMCSF ile transfecte edilen CHO hücre lizati)

Gümüş boyama sonucu

Rekombinant pVAX1-GMCSF ve pVAX1-CTLA4-GMCSF, belirlenen koşullarda (250 V, 2 µg DNA ve 2×10^6 CHO hücresi) elektroporasyon yöntemiyle CHO hücrelerine aktarıldı. Hücreler, 48 saat sonra RIPA tampon ile parçalanarak gümüş boyama yöntemi uygulandı. Boyama sonucunda, CHO hücrelerinde rekombinant GM-CSF ve CTLA4 proteinlerinin varlığı tespit edildi. Rekombinant CTLA4 proteininin yaklaşık 46 kDa moleküler kütleye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 38).



Şekil 38: GM-CSF ve CTLA-4 proteinlerinin gümüş boyama görüntüsü

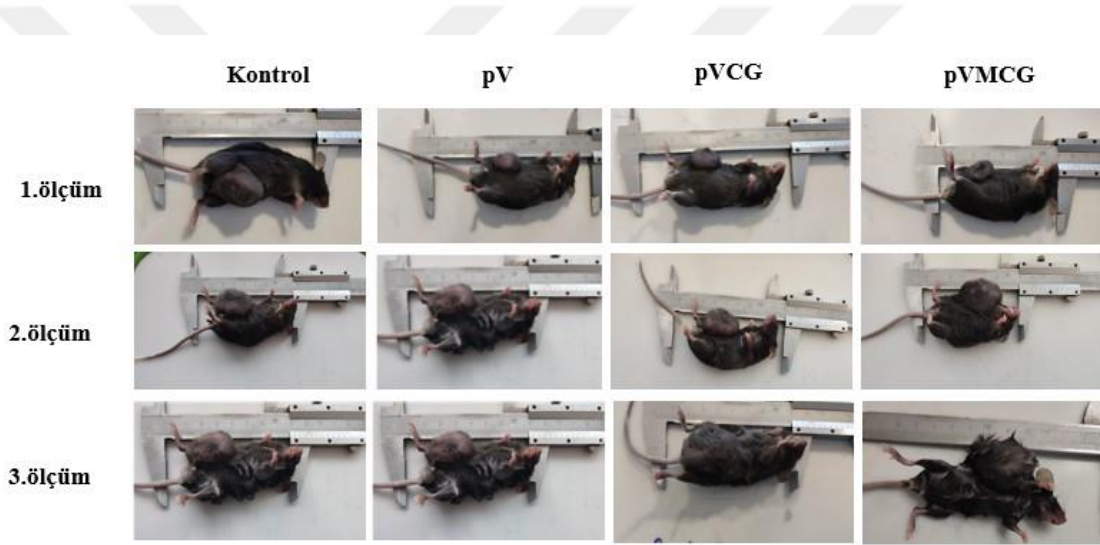
(B: Belirteç; 1: pVAX1-GMCSF ile transfekte edilen CHO hücre lizati; 2: pVAX1-CTLA4-GMCSF ile transfekte edilen CHO hücre lizati)

***In vivo* Tümör Tedavisi**

In vivo deneylerde kullanılan aşılardan isimleri kısaca şu şekilde ifade edildi: pV; pVAX1, pVCG; pVAX1-CTLA4-GMCSF, pVMCG; pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF

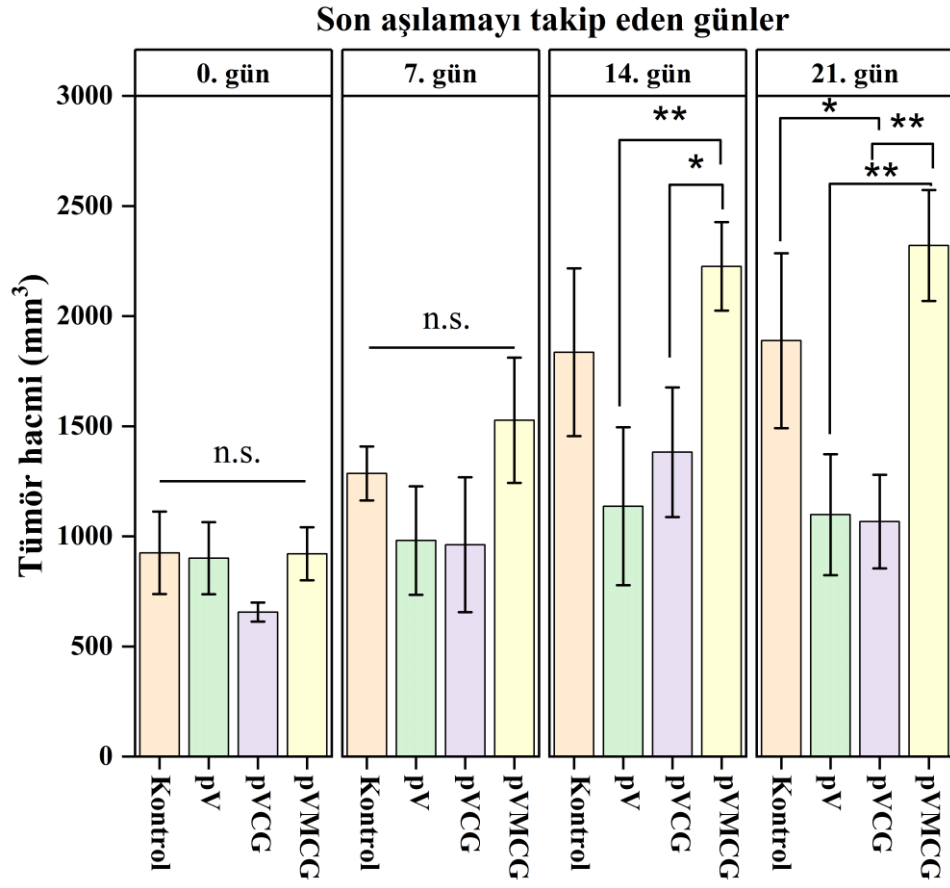
Aşılamadan sonra tümör gelişiminin durması veya gerilemesini değerlendirmek amacıyla, subkutan olarak oluşturulan tümörlerin boyutları elektronik kaliper ile ölçüldü (U: uzunluk, G: genişlik, D: derinlik). Ölçüm sonuçlarına göre, dört grup içinde tümör gelişiminin durmadığı, ancak pVCG aşısı uygulanan tedavi grubunda tümör büyümesinin kontrol ve sham (yalancı uygulama) gruplarına kıyasla gerilediği gözlemlendi. Buna karşın, pVMCG aşısı uygulanan tedavi grubunda tümör hücrelerinin daha agresif davrandığı ve tümör gelişiminin gerilemediği tespit edildi. Ayrıca, gruplardaki hayvanlar arasında bireysel farklılıklar (genetik çeşitlilik, metabolik farklılık, hormonal değişiklik vb. gibi) nedeniyle tedaviye verilen yanıtların değişkenlik gösterdiği belirlendi (Susini et al., 2021). pVMCG ve pVCG aşılarının

tümör gelişimine etkisi Şekil 40'daki grafikte gösterildi. Son aşılama sonrası 14. günde yapılan ölçümlerde, pVMCG ile aşılanan farelerdeki tümör hacminin, pVCG ile aşılanan farelere kıyasla daha büyük olduğu tespit edildi. Benzer şekilde, pVMCG grubundaki tümör hacmi, sham (pV) grubuna göre de daha fazla büyüme gösterildi. Son aşılama sonrası 21. günde yapılan ölçümlerde ise, kontrol grubuna kıyasla pVCG ile aşılanan farelerde tümör hacminin daha küçük olduğu belirlendi. Ayrıca, pVMCG ile aşılanan farelerdeki tümör hacminin hem pVCG hem de pV (sham) gruplarına kıyasla daha fazla olduğu görüldü. Diğer yandan, son aşılama sonrası 0. ve 7. gün ölçümlerinde, aşılanan gruplar arasında tümör hacimleri açısından belirgin bir fark gözlenmedi. Bununla birlikte, pV, pVCG ve pVMCG aşılarının farelerin sağkalım oranlarına etkisi Şekil 41'de gösterildi. Sonuçlara göre, diğer gruplarla karşılaştırıldığında, pVCG ile aşılanan grupta 2 fare ile en yüksek sağkalım oranı elde edildi.



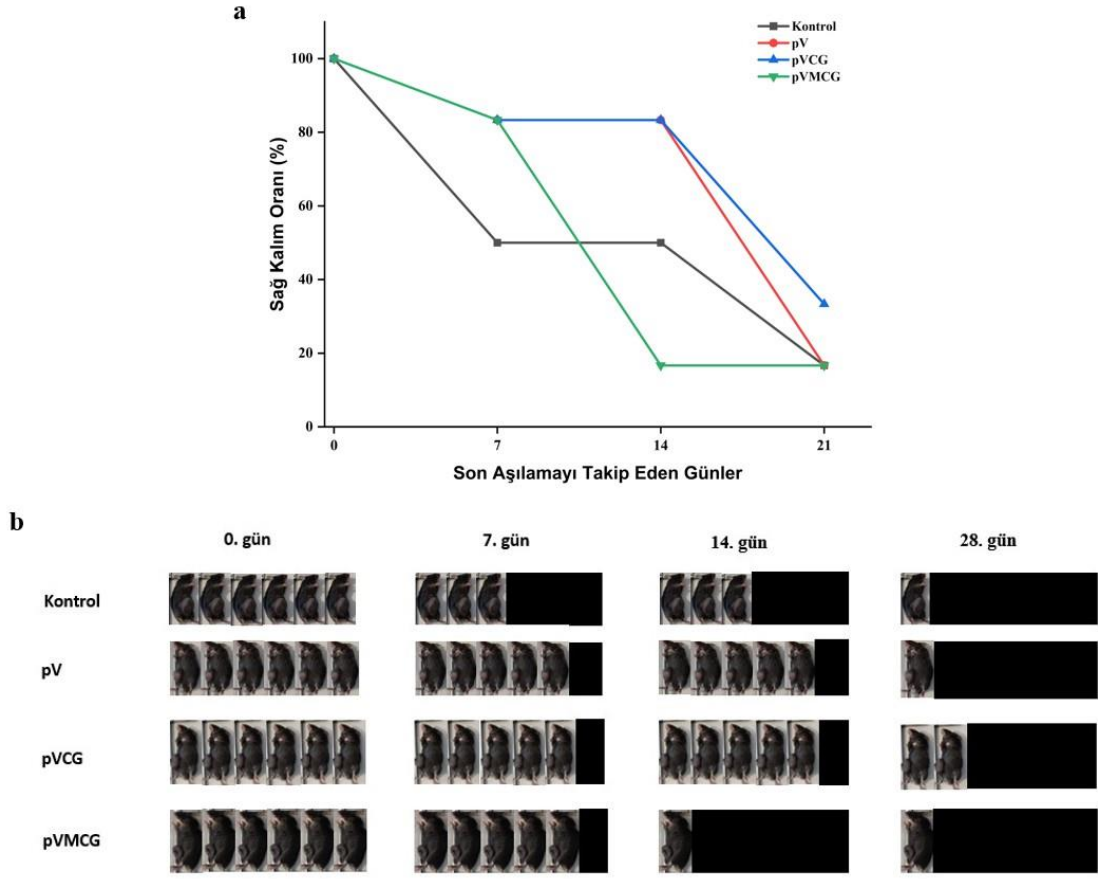
Şekil 39. Sinjenik tümör modeli oluşturulan farelere ait görüntüler

(pV, pVCG ve pVMCG ile beş gün aralıkla üç doz aşılama yapıldı. Son doz aşılamadan sonra birer hafta aralıkla (1-3. ölçüm) çekilen farelerin görüntüleri)



Şekil 40. Tümörlü fare modelinde pVCG ve pVMCG ile aşılama sonrası DNA aşılmasının etkinliğini gösteren grafik

(Tümör modeli oluşturulduktan on beş gün sonra, farelere pV, pVCG ve pVMCG ile beş gün aralıkla üç doz aşılama yapıldı. Veriler, ortalama $\pm$ S.D. olarak sunulmuştur ve Anova testi kullanılarak hazırlanmıştır. Her grupta altı adet fare bulunmaktadır.)



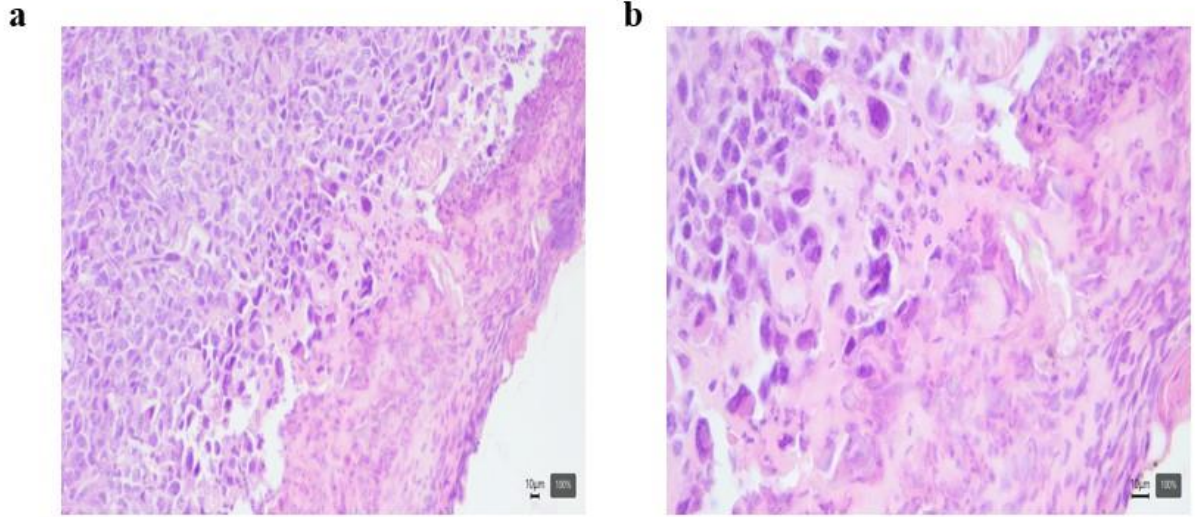
Şekil 41. Aşıların fare sağ kalımları üzerine etkisi. A) Farelerin sağ kalım grafiği, B) Farelerin sağ kalım görüntüsü

(Tümör modeli oluşturulduktan on beş gün sonra, farelere pV, pVCG ve pVMCG ile beş gün aralıkla üç doz aşılama yapıldı. Veriler, ortalama $\pm$ S.D. olarak sunulmuştur ve Anova testi kullanılarak hazırlanmıştır. Her grupta altı adet fare bulunmaktadır.)

***In vivo* tümör tedavi deneyinin histopatolojik analiz sonuçları**

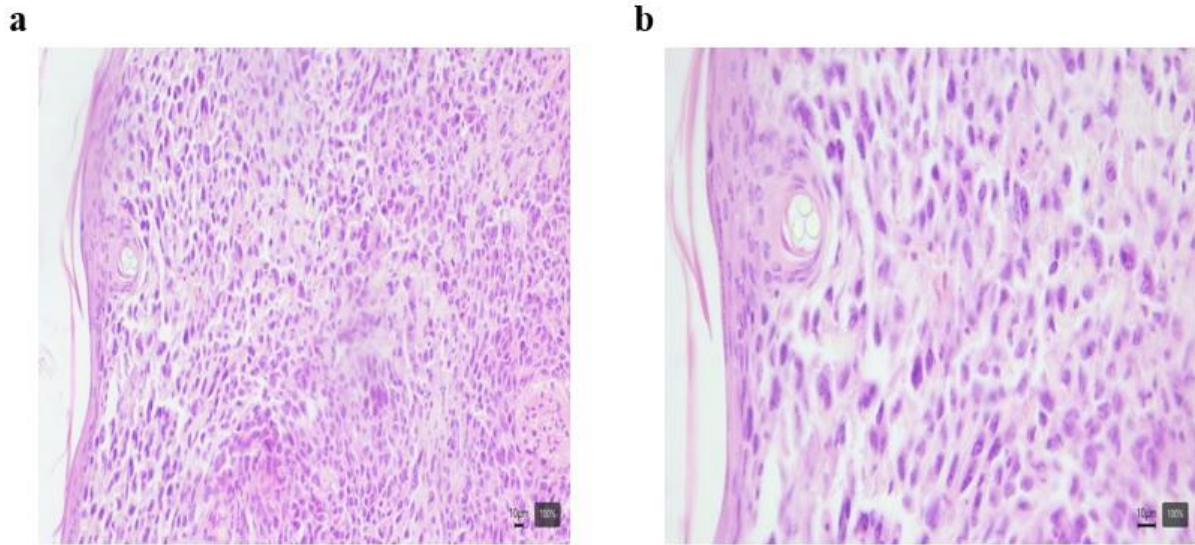
✓ Deri dokularının histopatolojik analiz sonuçlarına göre;

Kontrol grubuna ait deri dokularının histopatolojik incelemesinde, deri altında makroskobik olarak gözlenen kitlelerin, az diferansiye ve polimorfik hücrelerden oluştuğu, yoğun mitoz aktivitesi sergilediği ve hücre çekirdeklerinin belirgin şekilde hiperkromatik olduğu tespit edildi (Şekil 42).



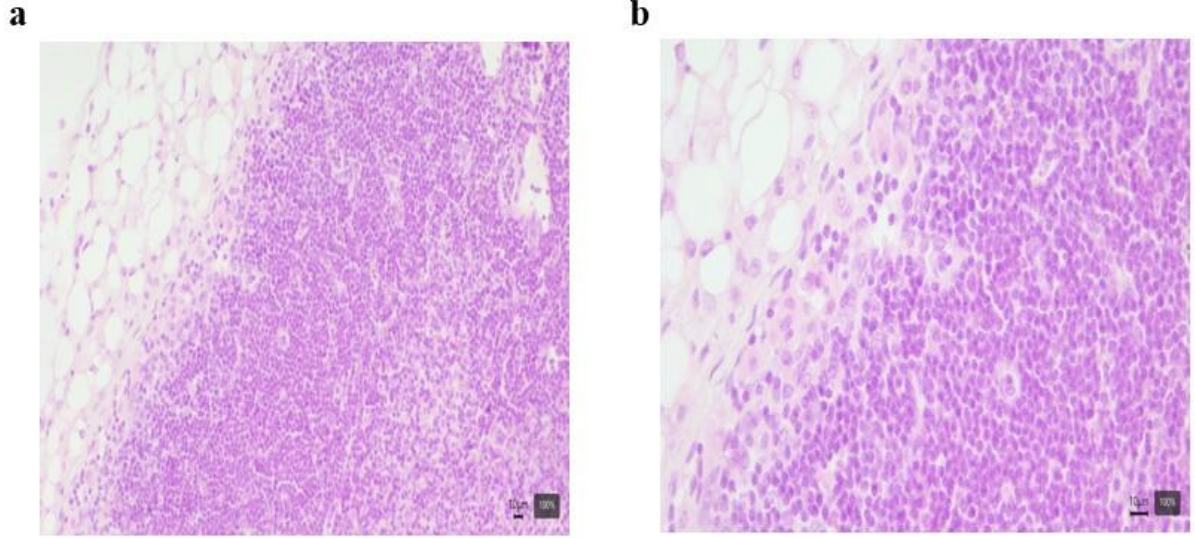
Şekil 42. Kontrol grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde düşük diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz ve hiperkromazi izlendi (H&E; **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10 µm).

Sham grubuna (pV) ait deri dokularının histopatolojik incelemesinde, deri altında makroskopik olarak gözlenen kitlenin mikroskopik değerlendirmesinde kapsül yapısının bulunmadığı, kitleyi oluşturan hücrelerin az diferansiye ve polimorfik özellikte olduğu, belirgin hiperkromazi gösterdiği ve yoğun mitotik aktivite içerdiği tespit edildi (Şekil 43)



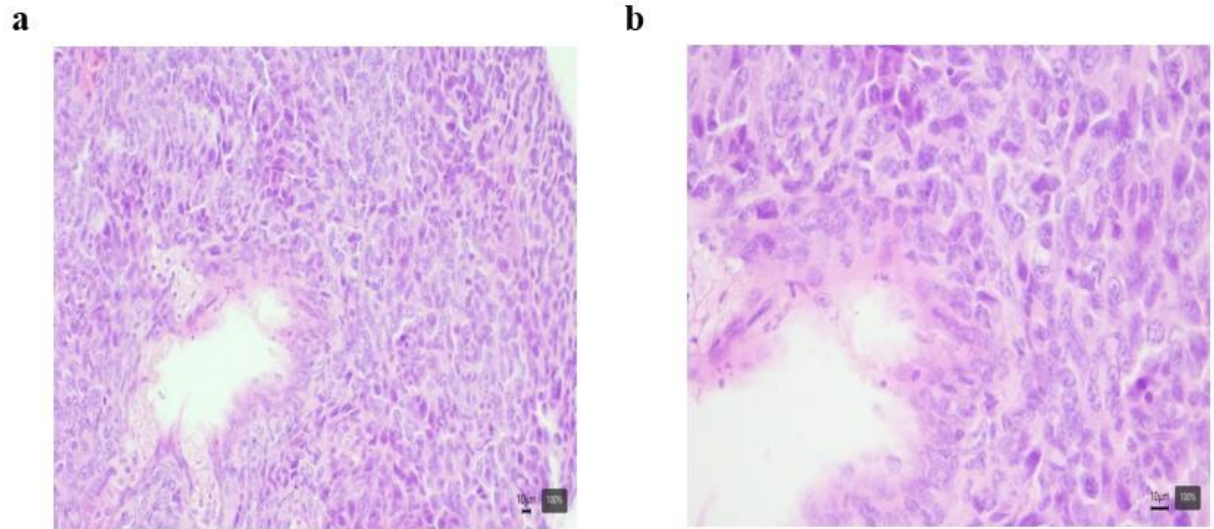
Şekil 43. Sham grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde az diferansiyasyon, polimorfizm, şiddetli düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E; **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10µm).

pVCG grubuna ait deri dokularının histopatolojik incelemesinde, makroskopik olarak gözlenen ancak diğer gruplara kıyasla belirgin şekilde küçülmüş olan kitlenin, mikroskopik olarak iyi diferansiye kanser hücrelerinden oluştuğu ve hafif düzeyde mitotik aktivite gösterdiği belirlendi(Şekil 44)



Şekil 44. pVCG grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde iyi diferansiyasyon, polimorfizm, hafif düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10µm).

pVMCG grubuna ait deri dokularının histopatolojik incelemesinde, deri altında makroskopik olarak gözlenen kitlenin kapsül yapısının oluşmadığı tespit edildi. Kitleyi oluşturan hücrelerin az diferansiye, polimorf yapıda ve hiperkromatik boyandığı; ayrıca anizositozis ve orta düzeyde mitoz bulunduğu belirlendi (Şekil 45).

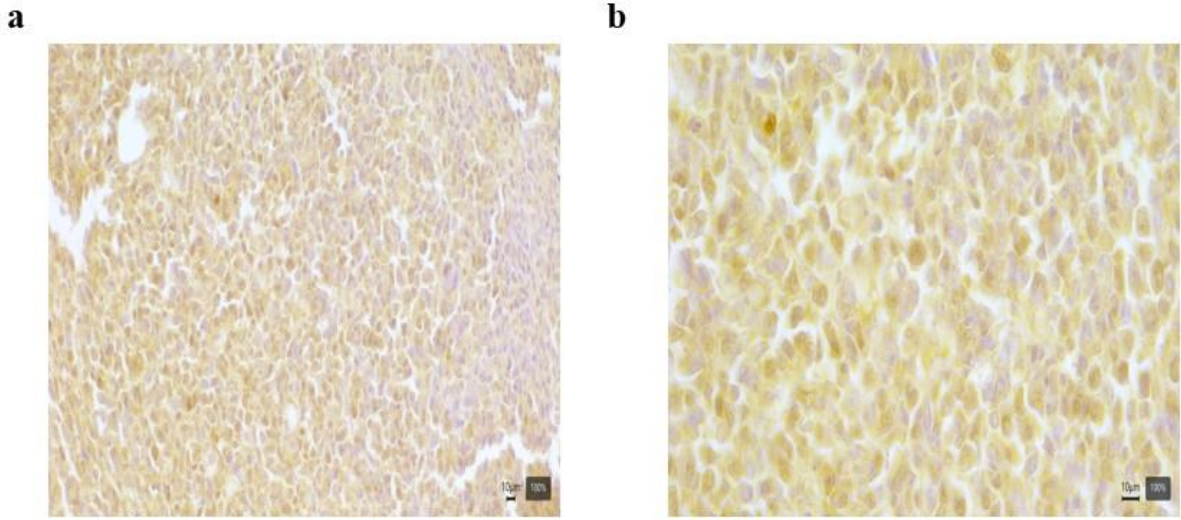


Şekil 45. pVMCG grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz, hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10µm).

Deri dokularında uygulanan histopatolojik boyama yöntemine ait bulgular ile bu bulguların istatistiksel analiz sonuçları Şekil 50’de verildi.

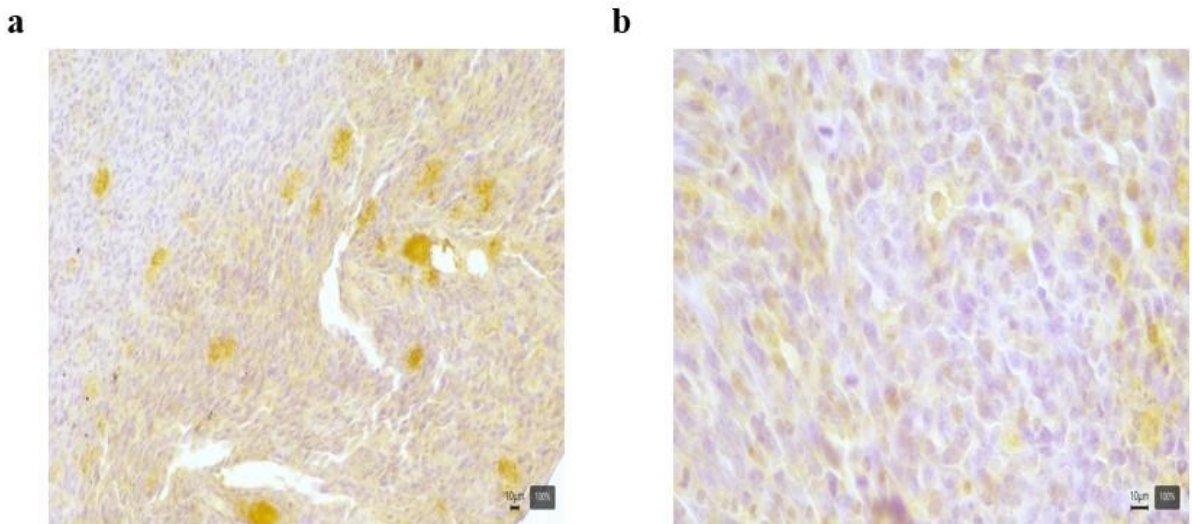
- Deri dokularının immunohistokimyasal sonuçlarına göre;

Kontrol grubuna ait deri dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, makroskopik olarak belirgin olan kitleyi oluşturan hücrelerde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 46).



Şekil 46. Kontrol grubuna ait deri dokusunda kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10µm).

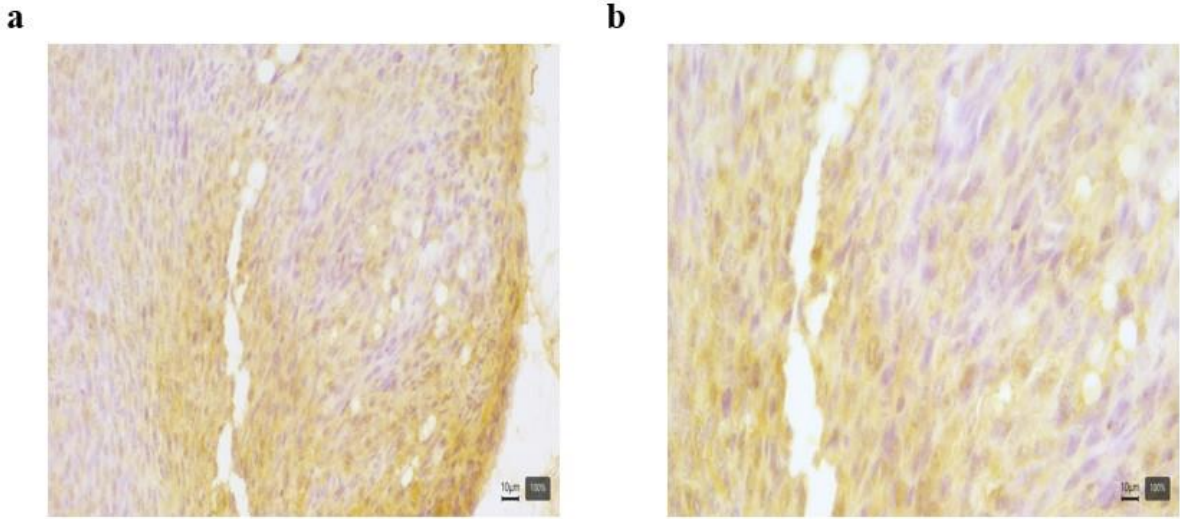
Sham grubuna (pV) ait deri dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, deri altında şekillenmiş kitlenin immunohistokimyasal incelenmesinde kitlenin özellikle periferinde bulunan hücrelerin çekirdeklerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 47).



Şekil 47. Sham grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlenmiştir (IHC-P, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10µm).

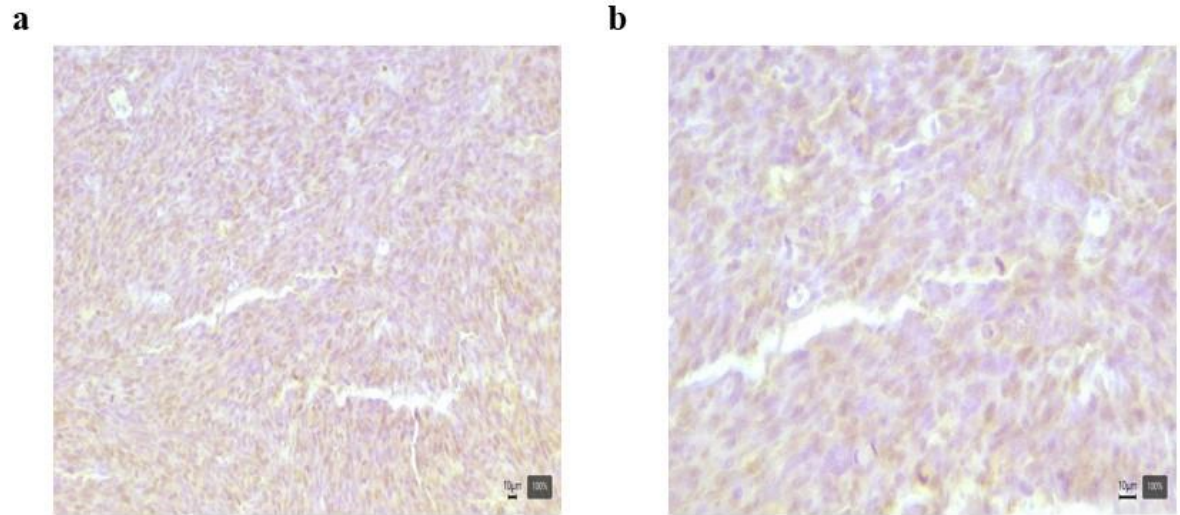
pVCG grubuna ait deri dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, deri altında makroskopik olarak gözlenen kitlenin immuhohistokimyasal boyanmasında kitleyi

oluşturran kanser hücrelerinde özellikle periferde orta düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 48).



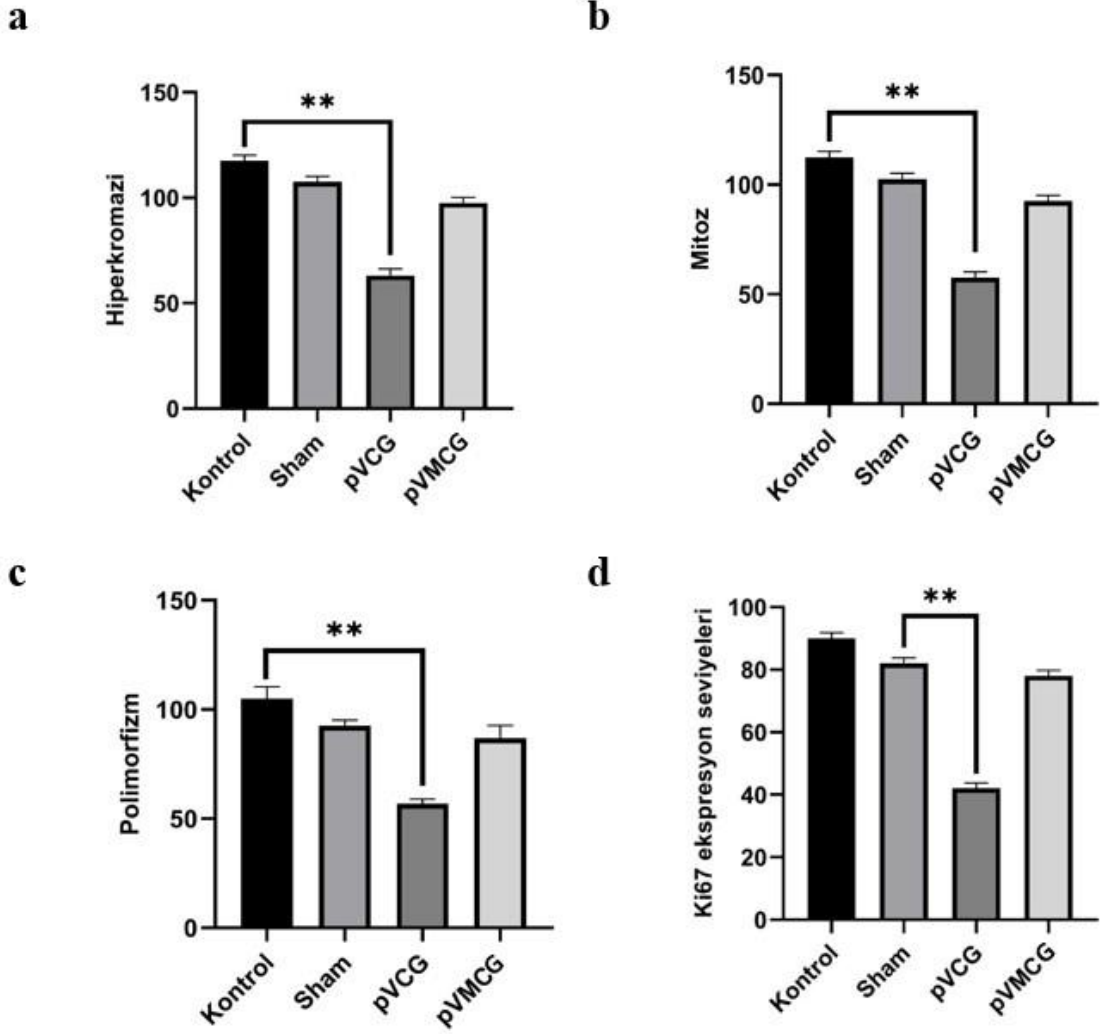
Şekil 48. pVCG grubuna ait deri dokusunda, kanser hücrelerinde orta düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10µm).

pVMCG grubuna ait deri dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, deri altı dokusunda belirlenen kitlenin immunohistokimyasal boyamalarında, bu kitleyi oluşturan hücrelerde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 49).



Şekil 49. pVMCG grubuna ait deri dokusunda kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10µm).

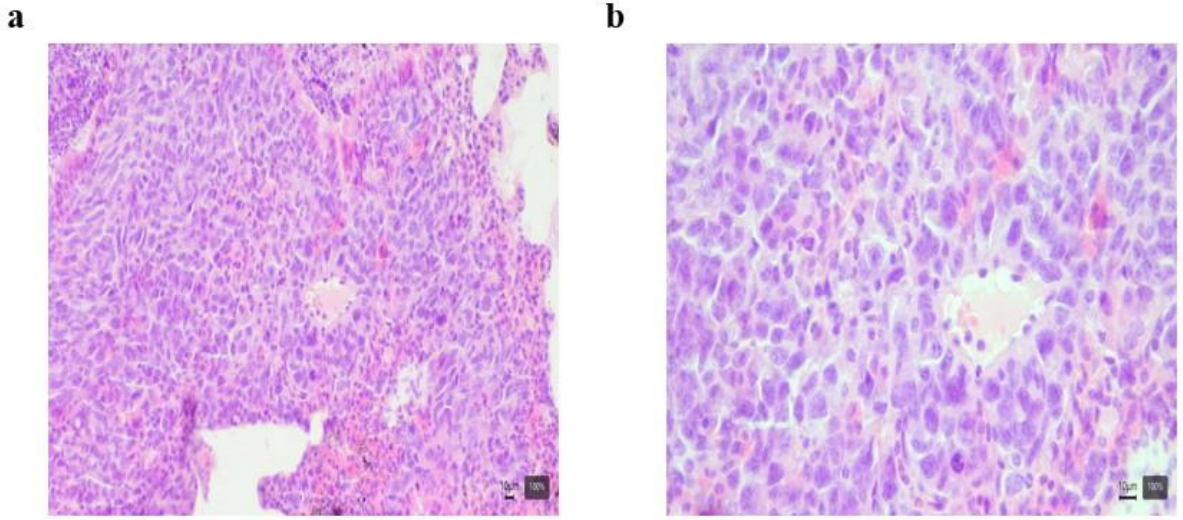
Deri dokularında uygulanan immunohistokimyasal boyama yöntemine ait bulgular ile bu bulguların istatistiksel analiz sonuçları Şekil 50’de verildi.



Şekil 50. Deri dokusunda görülen histopatolojik ve immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel analiz verileri. Kanser hücrelerinde **a.** hiperkromazi (** p=0.0022), **b.** mitoz (** p=0.0022), **c.** polimorfizm (** p=0.0022), **d.** Ki67 ekspresyon seviyesi (** p=0.0022).

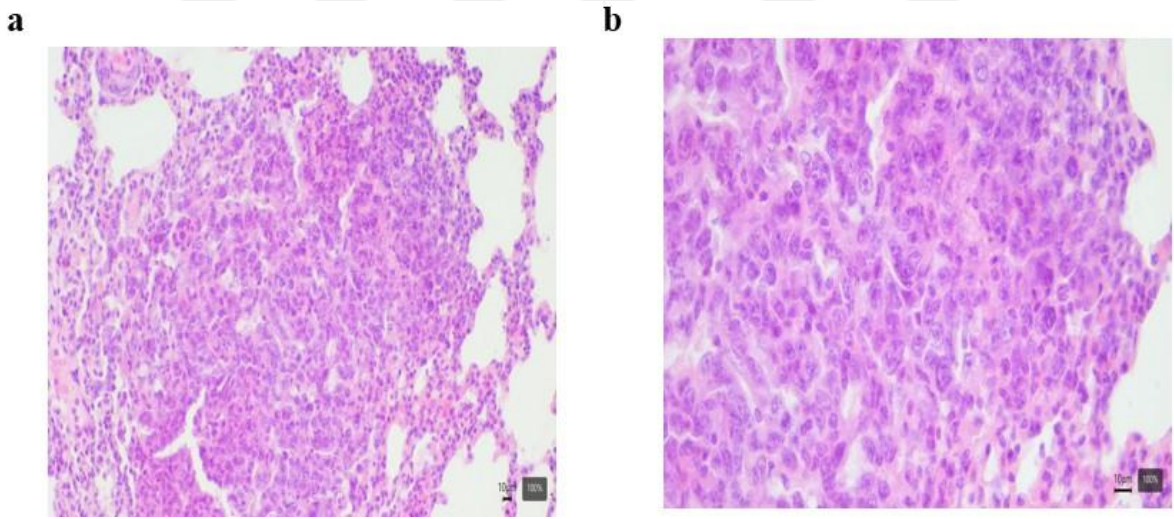
✓ Akciğer dokularının histopatolojik analiz sonuçlarına göre;

Kontrol grubuna ait akciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, akciğer parankim dokusunda çok sayıda metastatik nodüllere rastlandı, bu nodülleri oluşturan hücrelerin az diferansiye hiperkromatik, polimorf ve şiddetli düzeyde mitoz içerdiği gözlemlendi (Şekil 51).



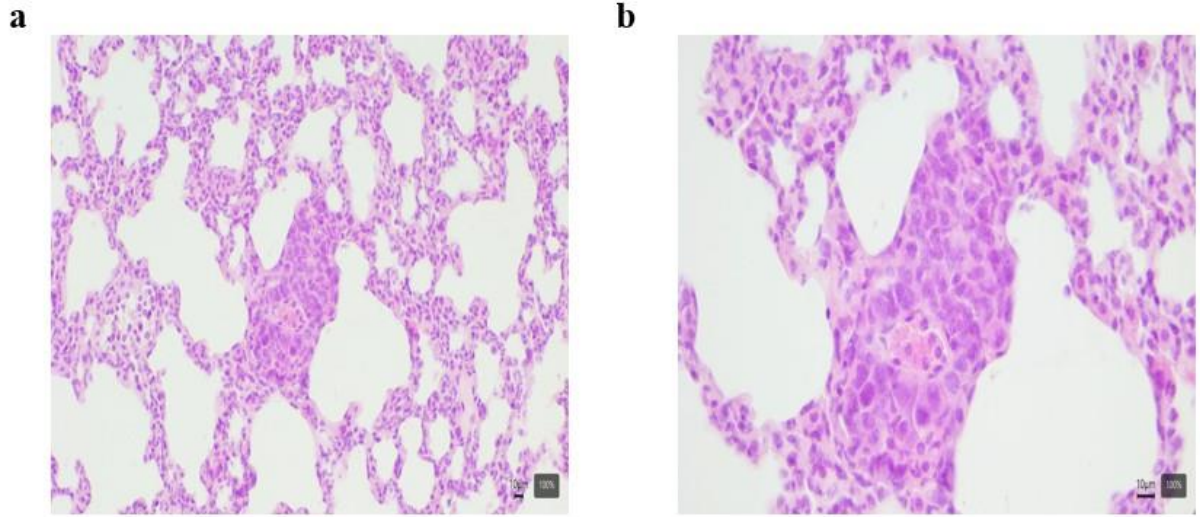
Şekil 51. Kontrol grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10µm).

Sham grubuna (pV) ait akciğer dokularının histopatolojik incelemesinde, akciğer parankiminde çok sayıda metastatik nodül tespit edildi. Bu nodülleri oluşturan tümör hücrelerinin düşük derecede farklılaşmış (az diferansiye), polimorfik, hiperkromatik ve atipik yapıda olduğu; ayrıca hücrelerin belirgin düzeyde mitotik aktivite gösterdiği gözlemlendi (Şekil 52).



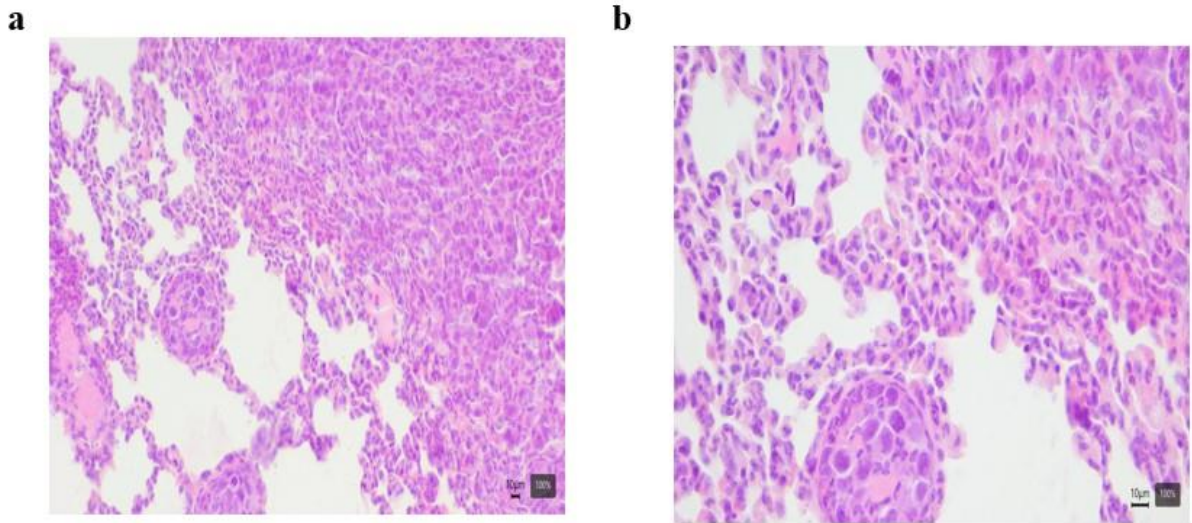
Şekil 52. Sham grubuna ait akciğer dokusu, kanser hücrelerinde diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10).

pVCG grubuna ait akciğer parankiminde yalnızca çok az sayıda küçük metastatik nodül saptandı; bu nodülleri oluşturan hücrelerin ise iyi diferansiye hücreler olduğu belirlendi (Şekil 53).



Şekil 53. pVCG grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde; diferansiyasyon, polimorfizm, hafif düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

pVMCG grubuna ait akciğer parankim dokuda yaygın şekilde metastatik kanser nodülleri izlendi; bu nodülleri oluşturan hücrelerin az diferansiye, hiperkromatik, polimorf yapıda ve orta düzeyde mitoz içeren hücrelerden oluştuğu tespit edildi (Şekil 54).

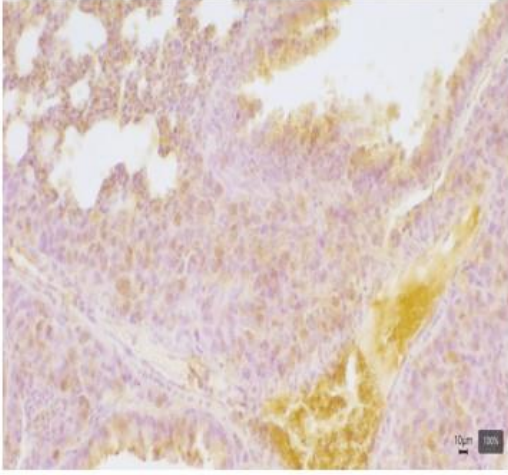
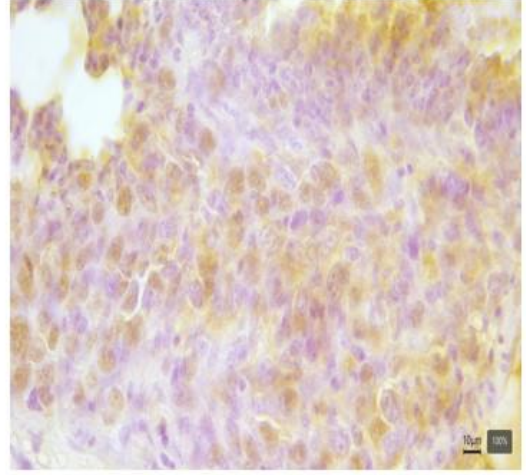


Şekil 54. pVMCG grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde; diferansiyasyon, polimorfizm, orta düzeyde mitoz, hiperkromaz ve damarlarda metastatik hücreler izlendi (H&E, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

Akciğer dokularında uygulanan histopatolojik boyama yöntemine ait bulgular ile bu bulguların istatistiksel analiz sonuçları Şekil 59’da verildi.

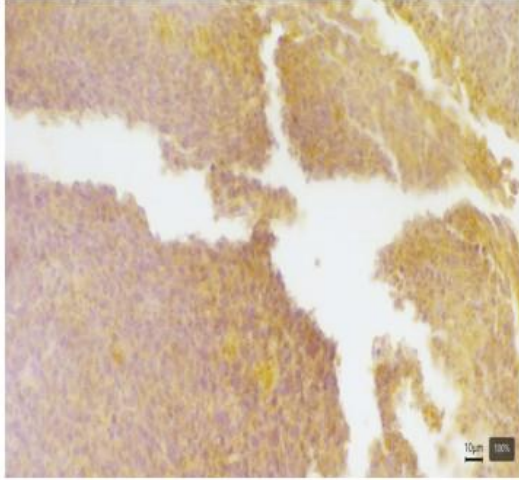
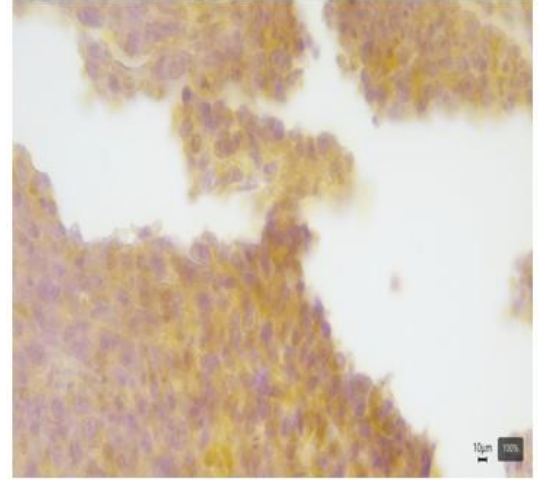
- Akciğer dokularının immunohistokimyasal analiz sonuçlarına göre;

Kontrol grubuna ait akciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, akciğerde çok fazla gözlenen metastatik nodüller ve bu nodülleri oluşturan hücrelerde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 55).

a**b**

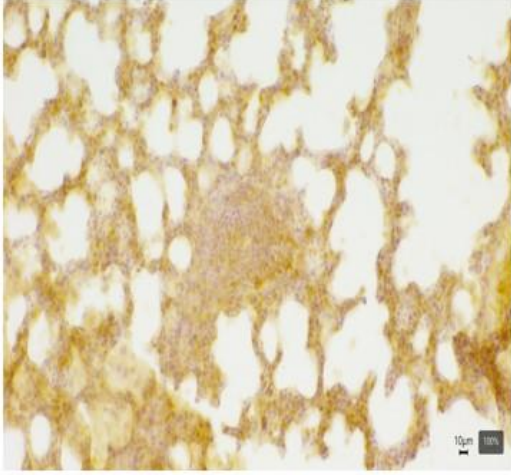
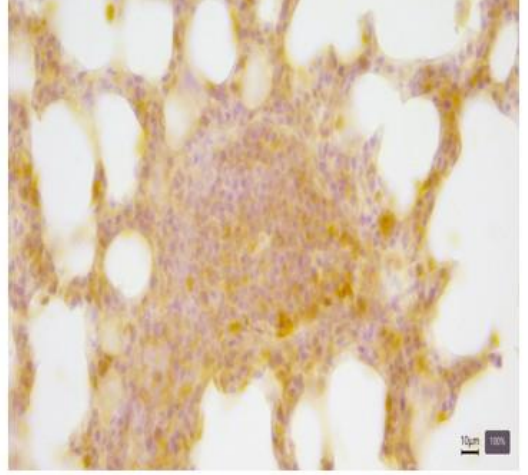
Şekil 55. Kontrol grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde; şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

Sham grubuna (pV) ait akciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, akciğerde gözlenen çok sayıda metastatik nodülü oluşturan kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 56).

a**b**

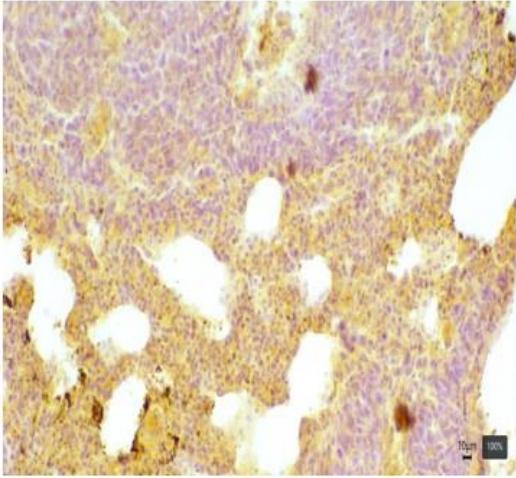
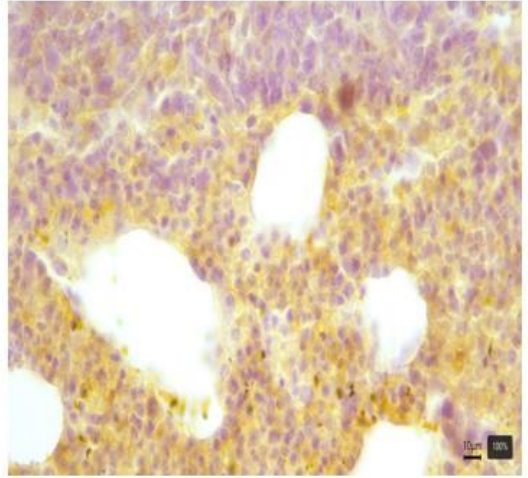
Şekil 56. Sham grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde, şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

pVCG grubuna ait akciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, akciğerde çok az sayıda gözlenen metastatik nodülü oluşturan hücrelerde hafif düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 57).

a**b**

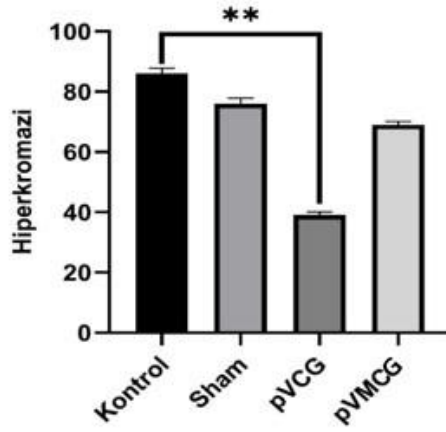
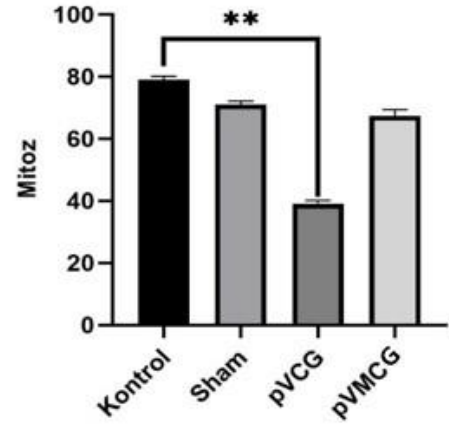
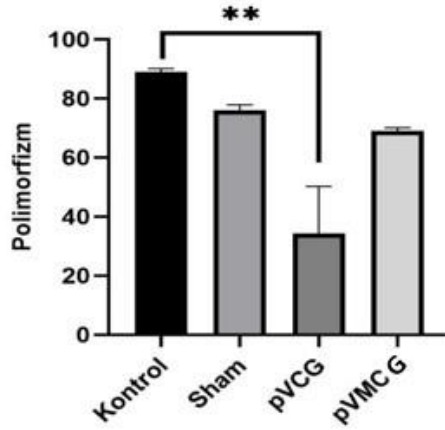
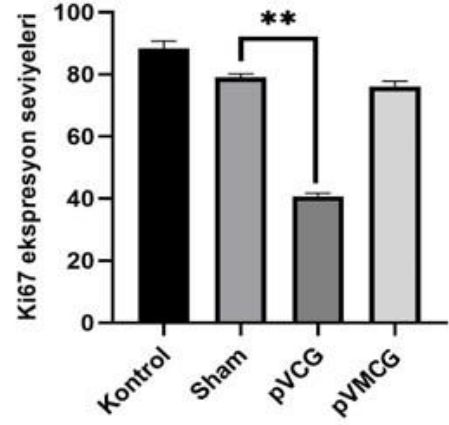
Şekil 57. pVCG grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde, hafif düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

pVMCG grubuna ait akciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, akciğer parankiminde gözlenen çok sayıda nodülü oluşturan hücrelerde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 58).

a**b**

Şekil 58. pVMCG grubuna ait akciğer dokusu kanser hücrelerinde, şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

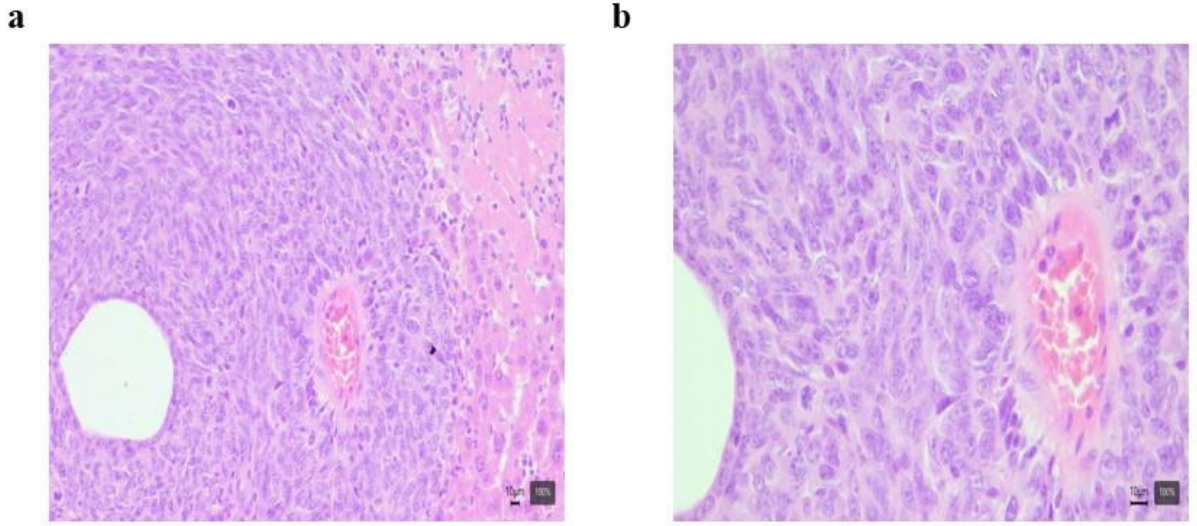
Akciğer dokularında uygulanan immunohistokimyasal boyama yöntemine ait bulgular ile bu bulguların istatistiksel analiz sonuçları Şekil 59'da verildi.

a**b****c****d**

Şekil 59. Akciğer dokusunda görülen histopatolojik ve immunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel analiz verileri. Kanser hücrelerinde **a.** hiperkromazi (** p=0.0022), **b.** mitoz (** p=0.0022), **c.** polimorfizm (** p=0.0022), **d.** Ki67 ekspresyon seviyesi (** p=0.0022).

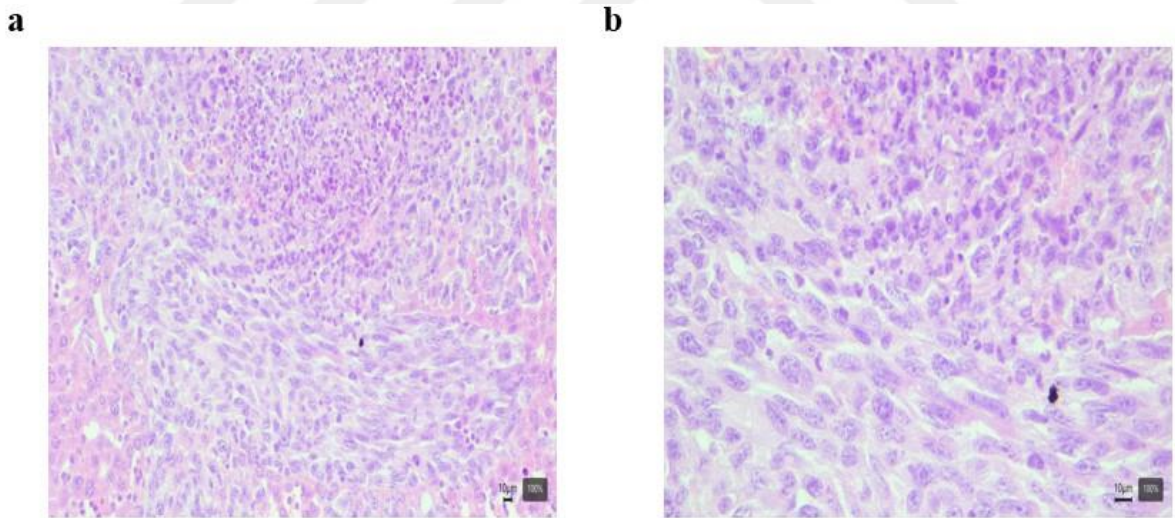
✓ Karaciğer dokularının histopatolojik analiz sonuçlarına göre;

Kontrol grubuna ait karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, karaciğer parankiminde büyük metastatik kitlelere rastlandı. Tümör dokusunda belirgin mitotik aktivite gözlenmiş; normal hepatositlere yakın bölgelerde yer alan tümör hücrelerinde ise polimorfizm ve anaplazi gösteren hücreler gözlemlendi (Şekil 60).



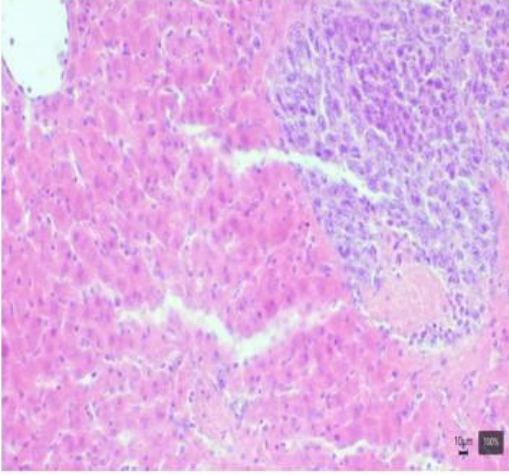
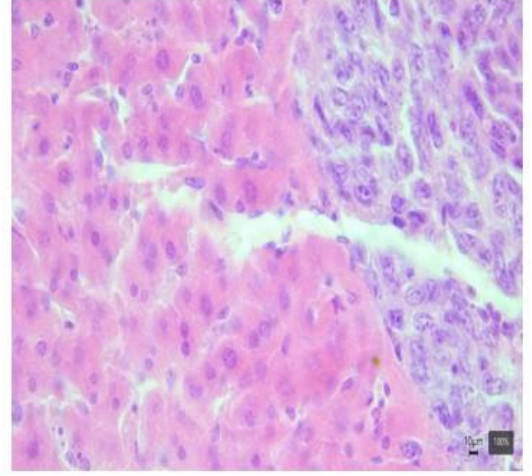
Şekil 60. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde diferansiyasyon, polimorfizm, şiddetli düzeyde mitoz, hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10).

Sham grubuna (pV) ait karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, karaciğer parankiminde büyük metastatik kitlere rastlandı. Kitle içerisinde, özellikle karaciğerin normal dokuya komşu bölgelerinde belirgin mitotik aktivite saptandı. Ayrıca kanser hücrelerinde polimorfizm, anizositoz ve çok sayıda anaplastik hücre gözlemlendi (Şekil 61).



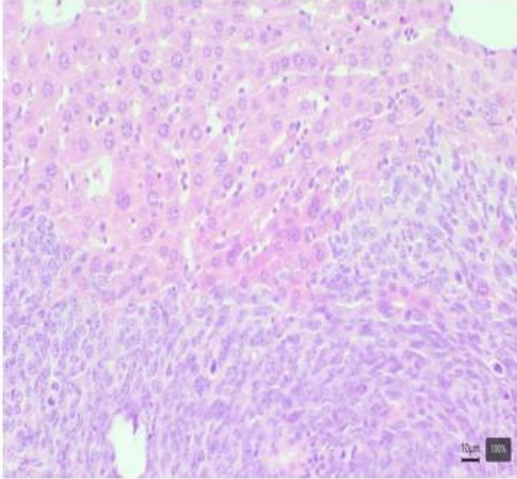
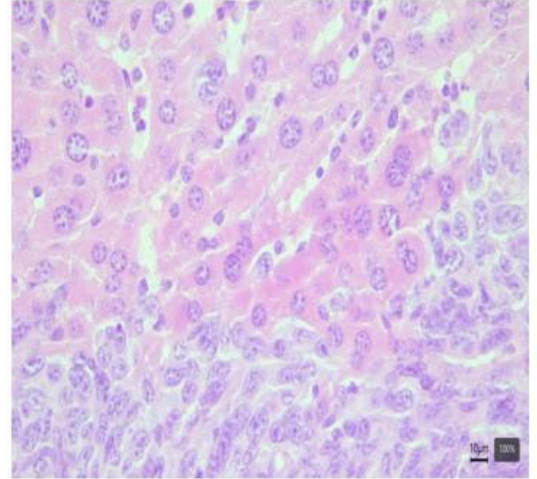
Şekil 61. Sham grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde; az diferansiyasyon, polimorfizm, şiddetli düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10).

pVCG grubuna ait karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, karaciğer parankiminde az sayıda küçük odaklar gözlemlendi. Bu odakların iyi diferansiye hücrelerden oluştuğu gözlemlendi (Şekil 62).

a**b**

Şekil 62. pVCG grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde; iyi diferansiyasyon, polimorfizm, hafif düzeyde mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

pVMCG grubuna ait karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, karaciğer parankiminde büyük metastatik kitleler gözlemlendi. Bu kitlelerde kanser hücrelerinin iyi diferansiye olmadığı gözlemlendi. Ayrıca bu kitlelerde çok sayıda mitoz, anizositozis, anizonükleozis ve polimorf hücreler tespit edildi (Şekil 63).

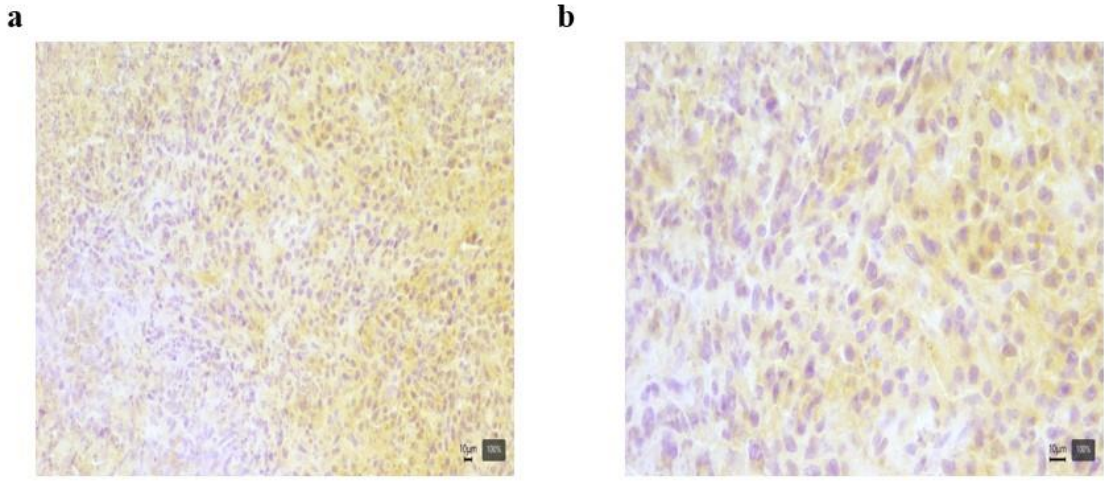
a**b**

Şekil 63. pVMCG grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde; az diferansiyasyon, polimorfizm, mitoz ve hücrelerde hiperkromazi izlendi (H&E, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

Karaciğer dokularında uygulanan histopatolojik boyama yöntemine ait bulgular ile bu bulguların istatistiksel analiz sonuçları Şekil 68’de verildi.

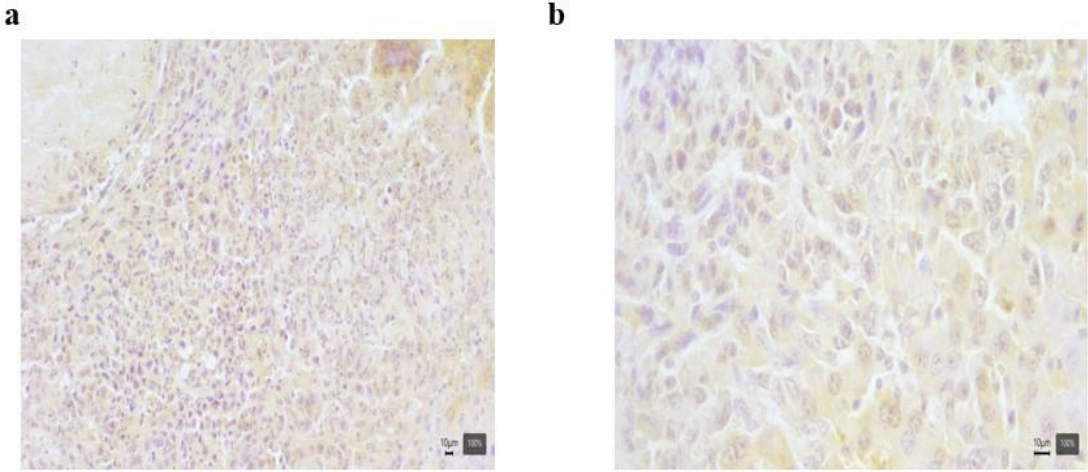
- Karaciğer dokularının immunohistokimyasal analiz sonuçlarına göre;

Kontrol grubuna ait karaciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, parankim dokuda gözlenen çok sayıda nodülü oluşturan kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 64).



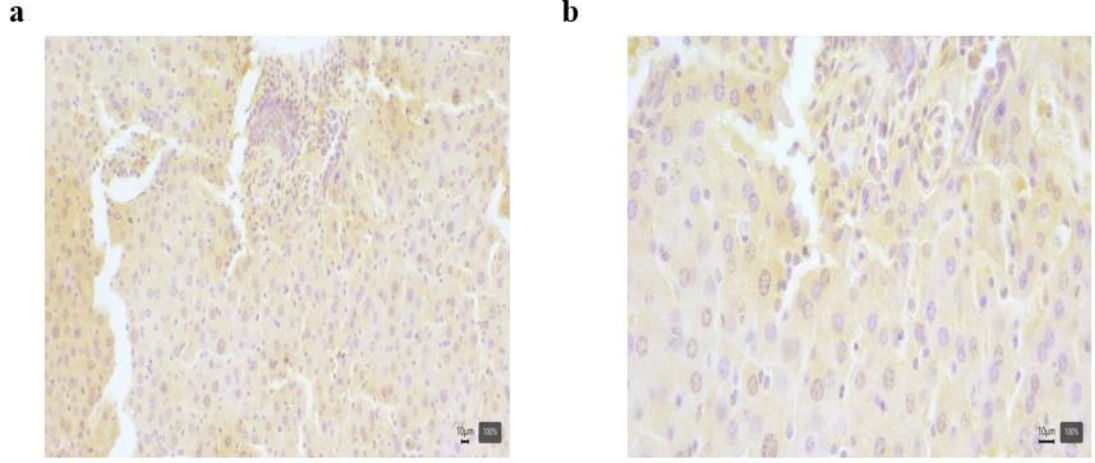
Şekil 64. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10).

Sham grubuna (pV) ait karaciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, karaciğer parankiminde gözlenen çok sayıda metastatik nodülü oluşturan tümör hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 65).



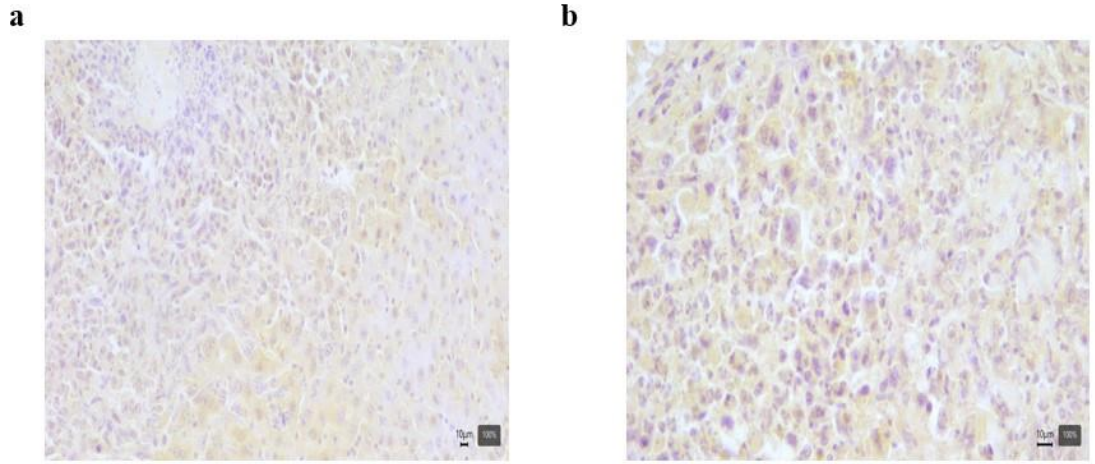
Şekil 65. Sham grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a**: 10X, **b**: 40X, Bar: 10).

pVCG grubuna ait karaciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, karaciğer parankiminde gözlenen az sayıda ve küçük nodülleri oluşturan kanser hücrelerinde hafif düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 66).



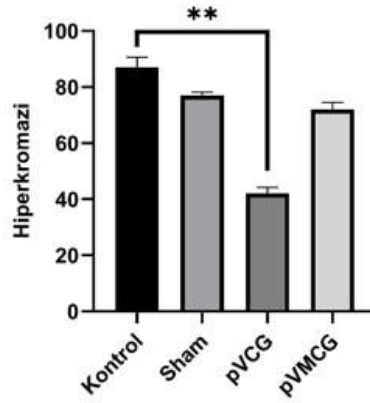
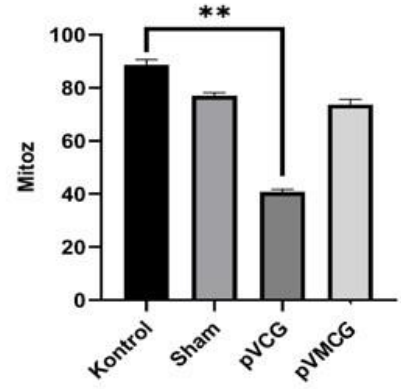
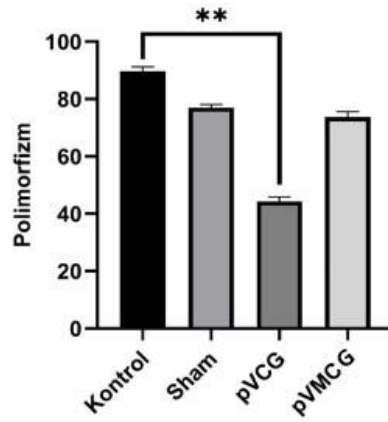
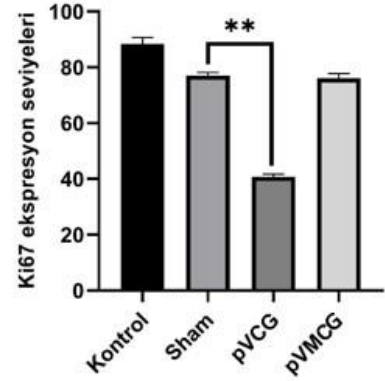
Şekil 66. pVCG grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde hafif düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları izlendi (IHC-P, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

pVMCG grubuna ait karaciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, karaciğer parankiminde gözlenen çok sayıda metastatik nodülü oluşturan hücrelerin hücrelerde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 67).



Şekil 67. pVMCG grubuna ait karaciğer dokusu kanser hücrelerinde şiddetli düzeyde intranükleer Ki67 ekspresyonları gözlemlendi (IHC-P, **a:** 10X, **b:** 40X, Bar: 10).

Karaciğer dokularında uygulanan immunohistokimyasal boyama yöntemine ait bulgular ile bu bulguların istatistiksel analiz sonuçları Şekil 68’de verildi.

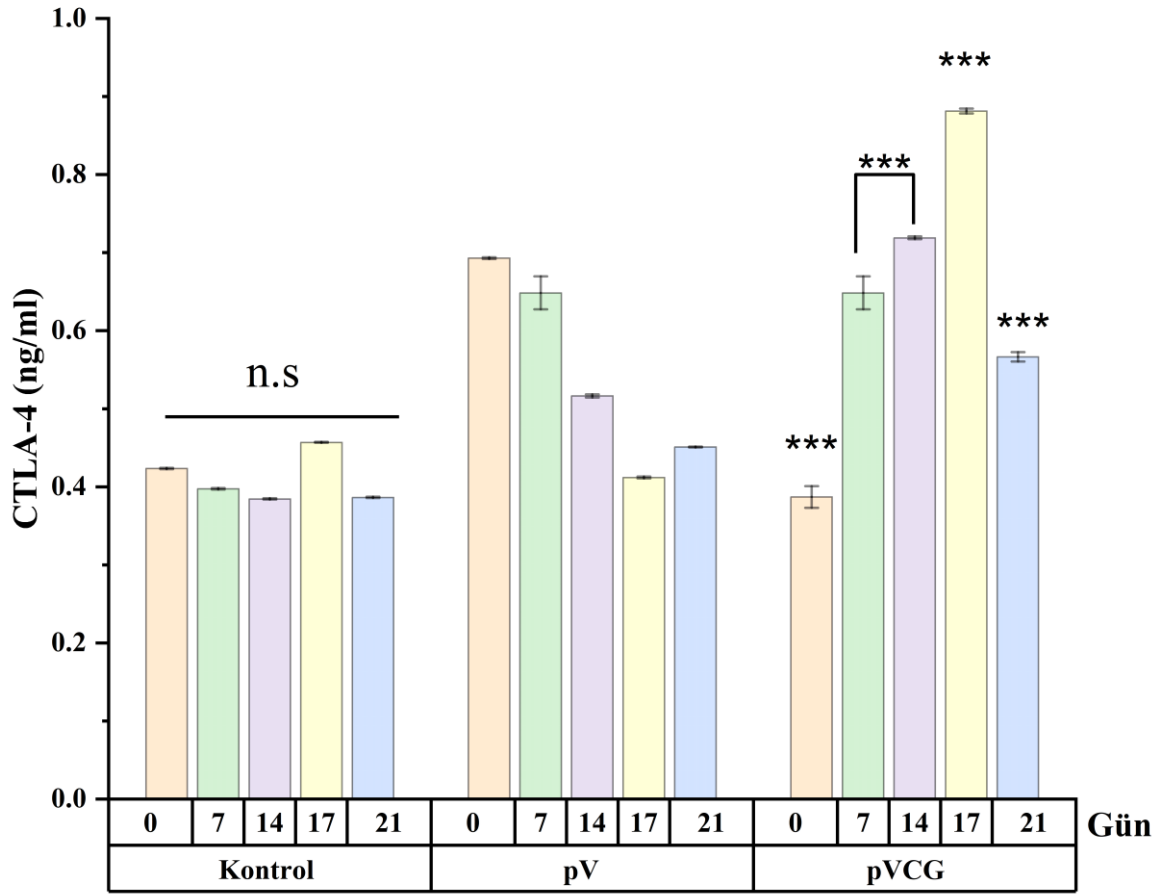
a**b****c****d**

Şekil 68. Karaciğer dokusunda görülen histopatolojik ve İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarının istatistiksel analiz verileri. Kanser hücrelerinde **a**: hiperkromazi (** p=0.0022), **b**: mitoz (** p=0.0022), **c**: polimorfizm (** p=0.0022), **d**: Ki67 ekspresyon seviyesi (** p=0.0022).

***In vivo* Bağışıklama Deneyi**

Çalışma sırasında Şekil 12’de gösterilen takvime göre elde edilen serumlar, ELISA analizinde kullanıldı. pVCG aşısında bulunan CTLA-4 geninin ekspresyonu sonucu farelerde üretilen proteinlere karşı oluşan spesifik antikorun (anti-CTLA-4) varlığı, farelerden toplanan serumlarla yapılan ELISA analiziyle tespit edildi. Ancak, pVMCG aşısında bulunan Muc1 VNTR peptit dizisi aracılığıyla üretilmesi beklenen antikorun (anti-Muc1 VNTR) varlığı belirlenemedi.

CTLA-4 antikoruna için yapılan ELISA analizi sonuçlarına göre, ticari olarak satın alınan ve ELISA plakalarına immobilize edilen saf CTLA-4 proteininin, serumda bulunan olası CTLA-4 antikoruna ile bağlandığı doğrulandı. En yüksek antikor düzeyinin, son aşılama üç gün sonra alınan ve 1:1 oranında seyreltilmiş serum örneğinde olduğu tespit edildi (Şekil 69).



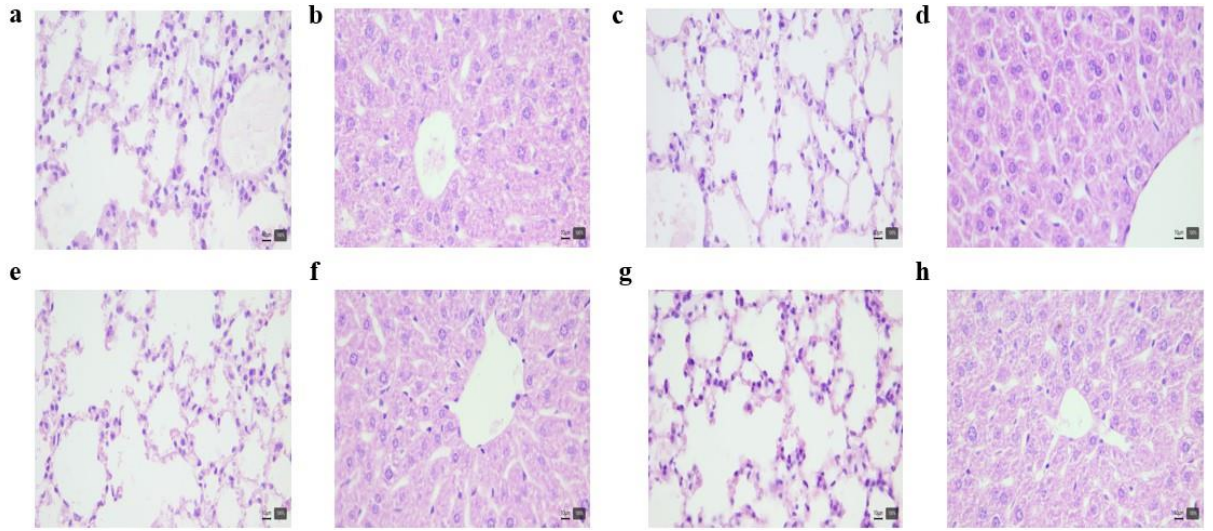
Şekil 69. CTLA-4 proteini için gerçekleştirilen ELISA analizi sonucu

Farelere pV ve pVCG ile birer hafta aralıkla üç doz aşılama yapıldı. Her aşılama öncesi, son aşılamadan üç gün sonra ve son aşılamadan bir hafta sonra fare serumları toplandı. Veriler, ortalama $\pm$ S.D. olarak sunulmuştur ve Anova testi kullanılarak hazırlanmıştır. Her grupta üç adet fare bulunmaktadır.)

***In vivo* bağışıklama deneyinin histopatolojik analiz sonuçları**

- ✓ Akciğer ve karaciğer dokularının histopatolojik analiz sonuçlarına göre;

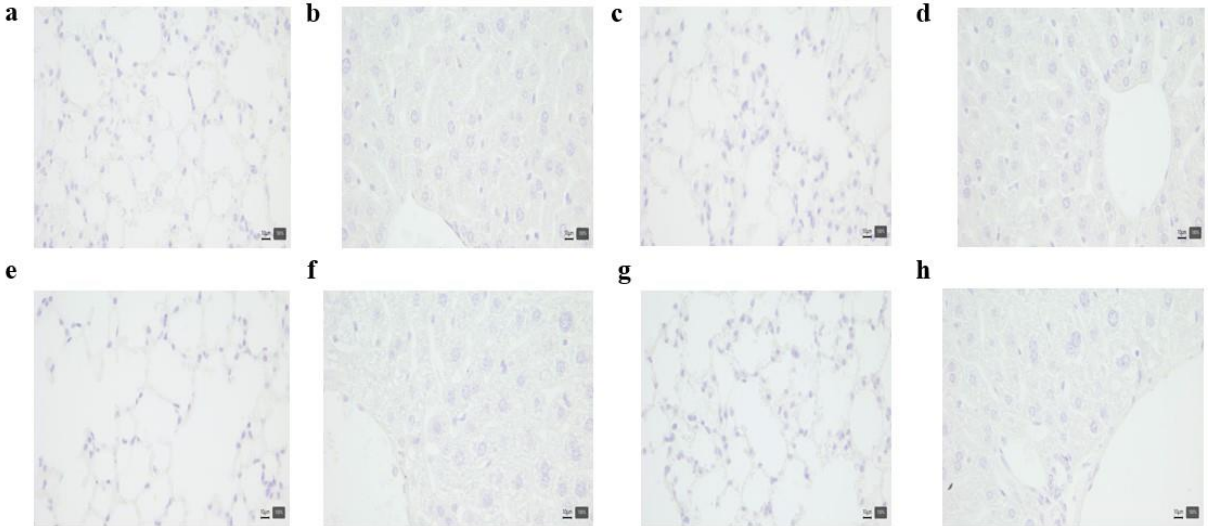
Kontrol, sham (pV), pVCG ve pVMCG gruplarına ait akciğer ve karaciğer dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde, normal histolojik yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 70).



Şekil 70. Normal histolojik görünüm izlendi (H&E, Bar:10µm). **a:** kontrol grubu, akciğer dokusu, **b:** kontrol grubu, karaciğer dokusu, **c:** sham grubu, akciğer dokusu, **d:** sham grubu, karaciğer dokusu, **e:** pVCG grubu, akciğer dokusu, **f:** pVCG grubu, karaciğer dokusu, **g:** pVMCG grubu, akciğer dokusu, **h:** pVMCG grubu, karaciğer dokusu

- Akciğer ve karaciğer dokularının immunohistokimyasal analiz sonuçlarına göre;

Kontrol, sham (pV), pVCG ve pVMCG gruplarına ait akciğer ve karaciğer dokuları immunohistokimyasal olarak incelendiğinde, Ki67 ekspresyonu negatif olarak değerlendirildi (Şekil 71).



Şekil 71. Negatif Ki67 ekspresyonu ve normal histolojik görünüm izlendi (IHC-P, Bar:10µm) **a:** kontrol grubu, akciğer dokusu, **b:** kontrol grubu, karaciğer dokusu, **c:** sham grubu, akciğer dokusu, **d:** sham grubu, karaciğer dokusu, **e:** pVCG grubu, akciğer dokusu, **f:** pVCG grubu, karaciğer dokusu, **g:** pVMCG grubu, akciğer dokusu, **h:** pVMCG grubu, karaciğer dokusu

TARTIŞMA SONUÇ

DNA aşısı; aşı olarak kullanılan bir DNA dizisi ve bu dizinin ekspresyonunu gerçekleştiren bir plazmit DNA'nın, rekombinant DNA teknolojisi ile bir araya getirilerek oluşturulan rekombinant DNA olarak bilinir. İmmünojenik antijenleri kodlayan fragmentler ya da genler, konakçı hücrelere ilgili DNA dizisini taşıyan plazmit DNA ile taşınmaktadır. Bu yaklaşımla humoral ve hücresele bağışıklığın her ikisinde de etkili bir şekilde immün cevap oluşturulur (Silveira et al., 2017; Yang Lee et al., 2018). Bu aşı formülasyonu, genetik materyalin konakçı hücre çekirdeğine yerleşmesini sağlar. Çekirdeğe ulaştıktan sonra plazmitte bulunan memeli promotörü varlığında genin ya da genlerin transkripsiyonu tetiklenir ve konak hücre bir ekspresyon makinesi olarak kullanılır. Antijen sunan hücreler genetik materyali alan en büyük hedef hücrelerdir (L. Li & Petrovsky, 2016). Genin translasyonundan sonra oluşan protein ya da protein fragmenti, antijen sunan hücrelerin içerisinde CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin tanıyabileceği şekilde parçalanarak taşıdıkları MHC sınıf I ve II molekülleriyle CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerine sunulurlar (Duerr et al., 2020; Ingolotti et al., 2010).

Geleneksel canlı ya da zayıflatılmış aşılarda kıyaslandığında; DNA aşıları, mikroorganizmalarla bulaşın olmaması, hücresele ve humoral bağışıklığı uyarması, tek aşıda farklı antijenleri kodlayan vektörün tasarlanabilmesi, büyük ölçekte ve düşük maliyetli üretimin gerçekleştirilebilmesi ve depolama sırasında stabilitesinin yüksek olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Özellikle aşı bilimi alanında depolama, aşı içeriğinin kalitesini yüksek oranda koruduğu için önemli bir faktördür. Bu nedenle aşılarda içeriğini korumak ve canlılığını sağlamak için soğuk koruma gereklidir. Dolayısıyla DNA aşıları soğutmaya daha az ihtiyaç duyduğundan oldukça pratik ve karardır (Silveira et al., 2017; S. Yang et al., 2013). Diğer yandan, moleküler adjuvanlar kullanarak DNA aşılarının immünojenitesini artırmak önemli bir araştırma alanıdır. Sitokinler, bağışıklık hücrelerinin farklılaşması ve olgunlaşması için gereklidir ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde kilit rol oynar. Çeşitli sitokinlerin tek başına belirli bir anti-tümör etkisi olduğu (örneğin, GM-CSF, IL-12 ve IL-2) gösterilmiş olup, bazı rekombinant sitokinler tümör tedavilerinde adjuvan olarak geliştirilmiştir (Young et al., 2014). Bu sitokinler arasında GM-CSF, en iyi incelenmiş moleküllerden biri olup, bağışıklık düzenlenmesinde birçok role sahiptir. GM-CSF, aktif monositler ve T hücreleri tarafından üretilir, hematopoietik progenitör hücrelerin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını teşvik eder; ayrıca makrofajları, dendritik hücreleri ve nötrofilleri aktive edebilir ve sitokin ağlarında önemli bir rol oynar (Dranoff et al., 1993).

Son yıllarda, immünoterapi hızla gelişmiş ve birçok hastalığın tedavisinde önemli bir rol oynamıştır. Özellikle kanser tedavisinde immünoterapi büyük potansiyel göstermiş ve terapötik etkinlik sağlamıştır (Miao & Van Allen, 2016). 2012 yılında, dünyanın ilk anti-tümör terapötik aşısı olan PROVENGE, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından prostat kanseri tedavisi için onaylanmıştır (DeMaria & Bilusic, 2019). Bununla birlikte, yapılan birçok çalışma, yalnızca antijen içeren bir aşının, yeterli düzeyde anti-tümör bağışıklık yanıtı oluşturma, tümör büyümesini baskılama, nüks veya metastazı önleme açısından yeterince etkili olmadığını göstermektedir. Antijenlerin CTLA-4'ün ekstraselüler bölgesiyle füzyonu, özellikle büyük hayvanlarda DNA aşılarının immünojenitesini artırmada potansiyel bir yaklaşım olarak kanıtlanmıştır (F. Zhang et al., 2007)(Yin et al., 2011). Zhao ve arkadaşları, CTLA-4'ün ekstraselüler bölgesini içeren bir füzyon DNA aşısının güçlü bir antikör ve T hücre yanıtı oluşturabildiğini göstermiştir (Zhao et al., 2017). Bağışıklık sistemi, kanserin kontrol altına alınmasında ve ortadan kaldırılmasında kritik bir rol oynar. T-lenfositler tarafından yönlendirilen bağışıklık tepkileri, aşılamayla güçlü bir şekilde uyarılabilir (Ashok & Rangarajan, 2002). Tümör hücrelerinin heterojenliği nedeniyle, birden fazla antijen içeren bir aşının kullanılması, hedef hücrelerin daha geniş bir yelpazede kapsanmasını ve bağışıklık yanıtının güçlenmesini sağlayabilir. Bu antijenlerden olan Muc1 (Mucin 1), normal dokularda glikozillenmiş halde bulunan ancak tümör hücrelerinde aşırı ekspresyon ve anormal glikozilasyon gösteren bir yüzey glikoproteinidir. Bu nedenle, özellikle değişken sayıdaki tandem tekrar (VNTR) bölgeleri, immün sistemi aktive etme potansiyeliyle kanser aşıları için önemli bir hedef haline gelmiştir. VNTR dizileri, hem B hem de T hücre epitopları içerdiğinden, güçlü antitümör bağışıklık yanıtları oluşturabilir (Tong et al., 2024; Weng et al., 2012). Literatürde, Muc1-VNTR bazlı DNA aşılarının dendritik hücre aktivasyonu ve sitotoksik T hücre yanıtlarını artırarak tümör büyümesini baskıladığı bildirilmiştir (Y.-F. Gong et al., 2017). Bu özellikleriyle Muc1-VNTR dizileri, bağışıklığı artırmada etkili bir araç olarak değerlendirilmektedir (Shin et al., 2013). Tüm bu bilgilerden yola çıkarak DNA aşılarının immünojenitesini artırmak, bağışıklık düzenlemesi ve anti-tümör etkisi arasında sinerjik bir etki yaratmak amacıyla, tümör hücre antijeni olan Muc1-VNTR'yi, CTLA-4'ü ve GM-CSF'yi kodlayan genleri taşıyan bir DNA aşısının güçlü bir anti-tümör ajan olarak işlev görebileceği fikriyle bu tez çalışması planlandı. Çalışmada ilk olarak DNA aşı vektörü olan pVAX1' e bağışıklık sistemini destekleyerek immün yanıtı artırması amacıyla insana ait GM-CSF geni yerleştirildi ve pVAX1-GMCSF elde edildi. İkinci olarak T hücrelerinin aktivasyonunu tamamlayarak onların etkili hale gelmesini sağlaması amacıyla insana ait CTLA-4 geni pVAX1-GMCSF içerisine yerleştirildi ve pVAX1-CTLA4-GMCSF elde edildi. Son olarak tümörle ilişkili bir antijen olarak aşının etkinliğini artırması amacıyla insana ait Müsin-1 VNTR

(Muc1-VNTR) dizisi pVAX1-CTLA4-GMCSF içerisine yerleştirildi ve pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF elde edildi. Böylece akciğer kanserini tedavi etmek üzere iki farklı DNA aşı konstraktı (pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF) elde edilmiş oldu.

Memeli hücreleri, endüstriyel biyofarmasötik üretimde genellikle tercih edilen konak sistemlerdir, çünkü doğru katlanmış, işlevsel ve glikozillenmiş proteinler üretebilme yetenekleri vardır. Özellikle posttranslasyonel modifikasyonlar, glikozilasyon başta olmak üzere, rekombinant proteinlerin çeşitli özelliklerini etkileyen kritik faktörler olarak son yıllarda büyük ilgi odağı haline gelmiştir. Yapılan kapsamlı araştırmalar, büyük ve kompleks proteinlerin potansiyel terapötik kullanım için insan benzeri posttranslasyonel modifikasyonlara sahip olmaları gerektiğini ve bunun, fonksiyonel ve immünojenik olmalarını sağladığını ortaya koymuştur. Çeşitli araştırma grupları, glikozilasyonun doğru bir şekilde gerçekleşmesinin, protein terapötiklerinin biyolojik aktivitesini ve kararlılığını iyileştirdiğini, yarı ömürlerini uzattığını ve immünojenite seviyelerini düşürdüğünü ortaya koymuştur (Kuriakose et al., 2016; Lai et al., 2013). Bu amaçla *in vivo* deneylere geçilmeden önce geliştirilen DNA aşı konstraktları elektroporasyon aracılığı ile bir memeli hücre si olan CHO (Çin hamster ovaryumu) hücrelerine aktarıldı. DNA aşı konstraktlarında yer alan genlerin CHO hücrelerinde doğru şekilde ifade edildiği ve ilgili proteinlerin üretildiği Western blot analizi ve SDS-PAGE gümüş boyama yöntemi ile belirlendi. CHO hücrelerinde üretilen rekombinant insan GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) proteininin teorik moleküler kütlesi yaklaşık 14.5 kDa'dır. Ancak memeli hücrelerdeki glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar, bu değeri artırabilir (Kaufman et al., 2014). Bazı şirketler tarafından üretilen CHO kaynaklı GM-CSF proteinlerinin SDS-PAGE analizlerinde 20–35 kDa ve 50-55 kDa arasında değişen moleküler kütleye sahip olduğu bildirilmiştir.

(https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-gm-csf-cho-expressed-protein_7954-gm?utm_, https://www.genscript.com/protein/Z02983-GM-CSF-Human-CHO-expressed.html?utm_ ve https://www.sinobiological.com/recombinant-proteins/human-gm-csf-10015-h01h?utm_.)

Benzer şekilde, CHO hücrelerinde üretilen rekombinant CTLA-4 proteinlerinin moleküler kütleleri de glikozilasyon ve kullanılan etiketlere bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Jenkins et al., 2023). Literatürde CTLA-4 için 15 kDa'dan 90 kDa'ya kadar değişen değerler bildirilmiştir

(https://www.thermofisher.com/proteins/product/Human-CTLA-4-Fc-Recombinant-Protein/310-05-1MG?utm_ ve https://www.invivogen.com/ctla4-fc?utm_).

Çalışmamızda, CHO hücrelerinde ekspresyonu sağlanan rekombinant GM-CSF ve CTLA-4

proteinlerinin moleküler kütleleri sırasıyla yaklaşık 55 kDa ve 46 kDa olarak belirlenmiş, bu değerler literatürdeki verilerle uyumlu bulunmuştur.

Subkutan tümör modeli, uygulanması kolay bir yöntemdir ve genellikle daha gelişmiş tümör modellerine geçmeden önce tercih edilir. Özellikle, *in vitro* farmakolojik profilinin çıkarıldığı aynı insan veya fare tümör hücre hatları genellikle farelerde subkutan olarak nakledilebilir ve büyütülebilir. *In vitro* ve *in vivo* biyolojik etkilerin karşılaştırılması, bu süreçte önemli bir aşamadır (A. S. Ahmad et al., 2015). Subkutan tümörler, 2D ortamdan daha karmaşık bir 3D yapıya sahip olup, bu modelde ilaç dozları, hedef inhibisyonu ve tümör büyümesi gibi fenotipik etkilerin ilişkileri daha ayrıntılı bir şekilde incelenebilir. Bu modeller, ilaç endüstrisinde sıkça kullanılan ilk tümör modeli olarak kabul edilir, çünkü çoğu prelinik kanser araştırmasına yeni başlayanlar için başlangıç aşaması sağlar. Tümörler genellikle ya hücrelerin deri altına enjeksiyonuyla ya da katı tümör parçalarının deri altındaki kas boşluğuna yerleştirilmesiyle oluşturulur. Tümör hücreleri farelerden kaynaklanıyorsa, genetik olarak özdeş bir fare suşuna implante edildiklerinde model "sinjenik" olarak adlandırılır (Gengenbacher et al., 2017) (Şekil 6).

Bu çalışmada ilk olarak tümör tedavi deneyi için 24 adet C57BL/6 fare, her grupta 6 adet fare olacak şekilde 4 gruba (kontrol grubu, sham (pVAX1: boş vektör), pVAX1-CTLA4-GMCSF grubu ve pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF grubu) ayrıldı. Fareler 1 hafta karantinede kaldıktan sonra her bir farede 3×10^4 LLC1 hücresi (fare akciğer kanseri hücre hattı) ile intraperitoneal yolla sinjenik subkutan tümör modeli oluşturuldu. Tümör modeli oluşturulduktan iki hafta sonra her bir gruptaki farelere 100 µg olacak şekilde ilgili DNA aşısı ile aşılama yapıldı. Aşılamalar 5'er gün ara ile 3 doz halinde uygulandı. Son aşılamadan itibaren 30 gün boyunca haftada iki kez tümör boyutları ölçüldü. Çalışma sonunda kurban edilen farelerden toplanan deri, akciğer ve karaciğer dokularının histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeleri yapıldı. Literatürde prostat kanseri fare modellerine uygulanmak üzere spesifik antijen olan PSCA ve immün blokajlama yapacak CTLA-4 genini içerecek şekilde tasarlanan DNA aşısının, sadece PSCA genini taşıyan DNA aşısına kıyasla farelerde tümör büyümesini daha güçlü bir şekilde engellediği belirtilmiştir (Mai et al., 2016). Öte yandan bir başka çalışmada; böbrek kanseri fare modellerinde G250 genini ve CTLA-4 antijeninin ekstraselüler domainini birlikte ifade eden bir DNA aşısı ile aşılanan farelerde, sadece G250 veya sadece CTLA-4 ifade eden DNA aşısı ile aşılanan farelere kıyasla tümör büyüme inhibisyonunun çok daha güçlü olduğu gösterilmiştir (Zhao et al., 2017). Yine yapılan bir çalışmada; 9 tekrarlı insan Müsin-1 VNTR peptid geni kullanılarak DNA aşısı tasarlanmış ve Lewis lung carcinoma (LLC) hücreleriyle subkutan olarak akciğer kanseri tümör modeli

oluşturulan C57BL/6 fareleri bu DNA aşısı ile aşılanmıştır. Boş vektörle aşılanan farelere kıyasla ilgili geni bulunduran DNA aşısıyla aşılanan farelerde tümör baskılamasının olduğu belirtilmiştir (S. Zhang et al., 2008). Bir başka çalışmada Müsin-1 VNTR peptid geni ile oluşturulan DNA aşısı ile aşılanan cilt kanseri tümör modeli oluşturulmuş farelerde tümör büyümesinin %60 oranında inhibe olduğu gösterilmiştir (Y. Wang et al., 2014). Yine başka çalışmada ise pVAX1 vektörüne Müsin-1 VNTR peptid genini klonlamışlardır. Ayrıca bu peptid dizisinin (GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH) C terminal ve N terminal bölgesine ayrı ayrı PDTRP aminoasit dizisini de ekleyerek pVAX1 vektörüne klonlamışlardır. Böylece C terminal ve N terminal bölgesine ayrı ayrı eklenen PDTRP aminoasit dizisinin T hücre aktivasyonuna olan etkisine bakmışlardır. C terminal bölgeye eklenen aminoasit dizisinin hem *in vivo*'da hemde *in vitro*'da daha güçlü immün yanıtı tetiklediğini belirtmişlerdir (Y. F. Gong et al., 2017).

Bu tez çalışmasında yapılan tedavinin sonucunda pVAX1-CTLA4-GMCSF DNA aşısının pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF aşısına kıyasla tümör hacminin artışı açısından daha etkili olduğunu görüldü. pVAX1-CTLA4-GMCSF ile tedavi edilen farelerin sağkalım oranları, pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF ile tedavi edilen farelere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulundu. Bu sonuç, sadece CTLA-4'ün bile bir immün kontrol noktası inhibitörü olarak tümör karşıtı etkiyi artırabildiğini kanıtlamaktadır. Aynı zamanda literatürde yer alan, tümör antijeni ve CTLA-4'ün kombine edildiği aşı tedavilerinin aksine sadece CTLA-4'ün bulunduğu DNA aşısı ile tedavi edilen farelerin tümör hacminde kombine tedaviye (Muc1VNTR ve CTLA-4) nazaran daha az artış olması, Muc1 geninin tamamının yerine Muc1VNTR nükleotid dizisinin yerleştirilmesinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, aşı konstraktında yer alan ve ifadesi sağlanan tek tekrarlı Muc1-VNTR peptidinin yeteri kadar spesifik efektör sitotoksik (CD8⁺) T lenfositlerini aktifleştiremediği, dolayısıyla tümör büyüme baskılamasının gerçekleşmediği şeklinde yorumlanabilir. Aynı zamanda tümör ilişkili antijenler (TAA; tumor-associated antigens), tümöre özgü antijenlerin (TSA; tumor-specific antigens) aksine yalnızca malign hücrelerde değil, aynı zamanda belirli düzeylerde normal hücrelerde de ifade edilmektedir. Bu nedenle, TAA'lara karşı geliştirilen immünizasyon stratejileri genellikle düşük afiniteli, antijen-spesifik CD8⁺ T hücrelerinin üretimiyle sonuçlanır (Soong et al., 2013). Muc1-VNTR dizisi de bir TAA olduğundan bu durum, bu çalışmada gözlemlenen sınırlı immünojenik etkinliğin altında yatan neden olabilir. Ek olarak, aşılarda geliştirilmesinde kullanılan genler insana ait genlerdir. Bu durumda insana ait genlerle elde edilen aşılarda, fareye ait bir hücre hattı ile oluşturulan kanser modelinde denendiği için ksenojenik bir aşı olma özelliğindedir. Muc1VNTR dizisinin yeterli immünojenite

göstermemesinin nedenlerinden biri de bu olabilir. Öte yandan, kombine tedavi grubunda, son aşılamaı takip eden 14. ve 21. günlerde tümör baskılanması beklenirken, kontrol ve sham gruplarına kıyasla tümör hacminde beklenmedik bir artış gözlemlendi. Bu durumun, zamanla aşının terapötik etkinliğinin azalmasına bağılı olarak, kombine aşı formülasyonunda yer alan CTLA-4 blokajının son aşılamaıdan sonraki 7. güne kıyasla daha düşük bir immün yanıt oluşturmasından kaynaklanabileceğı düşünölmektedir. Bu bağlamda, kombine tedavi grubunda geç dönemlerde gözlenen tümör hacmi artışı, aşının azalan etkinliği ile ilişkili olabilir. Benzer şekilde, yapılan histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler sonucunda; pVAX1-CTLA4-GMCSF'nin uygulandığı gruptaki farelerden alınan deri, akciğer ve karaciğer dokularının hepsinde kontrol ve sham gruplarına kıyasla daha yüksek diferansiyasyon, daha düşük mitoz, hiperkromazi, polimorfizm ve Ki67 protein ekspresyonu gözlemlendi. Bu durum tümör tedavi deneyinde elde edilen sonuçların tutarlılığını ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında yapılan *in vivo* bağışıklama deneyinde toplam 12 adet C57BL/6 fare her grupta 3 adet olacak şekilde 4 gruba (kontrol grubu, sham (pVAX1: boş vektör), pVAX1-CTLA4-GMCSF grubu ve pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF grubu) ayrıldı. Fareler 1 hafta karantinede kaldıktan sonra her bir gruptaki farelere 100 µg olacak şekilde ilgili DNA aşıları ile aşılama yapıldı. Aşılamalar birer hafta ara ile 3 doz halinde uygulandı. Çalışma son aşılamaıdan 1 hafta sonra sonlandırıldı. Her üç doz aşılamasının hemen öncesinde, son aşılamaıdan 3 gün sonra ve çalışmanın sonlandırıldığı gün her bir fareden kan alındı. Her bir gruba ait toplanan kanlardan bir havuz oluşturuldu ve serumlar elde edildi. Gruplara ait serumlar kullanılarak ELISA analizi yapıldı. Literatürde prostat kanseri fare modellerine uygulanmak üzere spesifik antijen olan PSCA ve immün blokajlama yapacak CTLA-4 genini içerecek şekilde tasarlanan DNA aşısının farelerde sadece yüksek seviyede anti-PSCA antikorunu üretimini sağladığı bildirilmiştir (Mai et al., 2016). Öte yandan, bir başka çalışmada böbrek kanseri fare modellerinde G250 genini ve CTLA-4 antijeninin ekstraselöler domainini birlikte ifade eden bir DNA aşısıyla, G250 ve CTLA-4 antikorlarının oldukça fazla arttığı belirtilmiştir (Zhao et al., 2017). Bununla birlikte, kolon kanseri için yapılan bir çalışmada, Müsin-1 VNTR peptid genini içeren DNA aşısıyla aşılanan gönüllü hastaların serumlarında spesifik antikor seviyesinin %18,5 arttığı bildirilmiştir (Y. Q. Wang et al., 2012).

Bu tez çalışmasında yapılan bağışıklama deneyi sonucunda CTLA-4 antijenini ifade eden DNA aşısı (pVAX1-CTLA4-GMCSF) ile bağışıklanan farelerde en yüksek CTLA-4 antikor düzeyi, son aşılamaıdan üç gün sonra alınan ve 1:1 oranında seyreltilmiş serum örneğinde tespit edildi. Buna karşın, CTLA-4 ile birlikte Muc1VNTR dizisini ifade eden DNA aşısı (pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF) ile aşılanan farelerde Muc1VNTR'ye özgü

antikor tespit edilemedi. ELISA analizlerinde immobilize edilen protein ile hedef proteinin büyüklüğü arasındaki fark, bağlanma etkinliğini ve analiz duyarlılığını önemli ölçüde etkileyebilir. Özellikle, immobilize edilen proteinin moleküler ağırlığı büyük, örnekteki hedef proteinin ise küçük olması durumunda, sterik engel oluşma riski artar. Bu tür fiziksel engeller, küçük proteinin epitoplarının antikorlar veya reseptörler tarafından tanınmasını zorlaştırabilir. Ayrıca, küçük proteinlerin immobilize yüzeyde bağlanma verimliliği büyük proteinlere kıyasla daha düşük olabileceğinden, oluşan sinyalin gücü azalabilir ve sonuçların güvenilirliği düşebilir (Brown et al., 1989; Susini et al., 2021). Bu bilgiler ışığında, ELISA analizi sonucu Muc1 VNTR antikorunun tespit edilememesinin muhtemel nedeninin ELISA plakalarına Muc1 proteininin tamamının immobilize edilerek kaplanmış olması olabilir. Çünkü serumda bulunması beklenen antikor, sadece Muc1 VNTR peptidine özgü olup, tüm Muc1 proteini ile bağ kuramayabilir. Dolayısıyla, Muc1 VNTR küçük bir peptid olduğundan, bu özgül antikor plakadaki tam Muc1 proteini ile bağlanamamış olabilir. Bu nedenle, ELISA analizinde serumda Muc1 VNTR'ye özgü antikor yokmuş gibi bir sonuç alınmış olabilir. Son olarak, *in vivo* bağışıklama deneyi için yapılan histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler sonucunda pVAX1-CTLA4-GMCSF aşısının uygulandığı gruptaki farelerden alınan akciğer ve karaciğer dokularında normal histolojik görünümünden farklı bir histolojik görünüm elde edilmedi.

Sonuç ve Öneriler

Kanser, farklı özelliklere sahip geniş bir kötü huylu tümör grubudur ve ölümcül sonuçlara yol açabilir. Gelişmiş ülkelerde yetişkinlerde en yaygın görülen kanser türleri arasında akciğer, kolorektal, meme, cilt melanomu ve prostat kanseri bulunmaktadır. Genel olarak, çocuklar ve ergenlerde kanser görülme sıklığı ve kanserden ölüm oranı oldukça düşüktür. Ancak bu oranlar, yetişkinlik döneminde yaş ilerledikçe katlanarak artar. Kanser görülme oranları ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Kanser, teşhis ve tedavi yöntemlerindeki gelişmelere rağmen küresel ölçekte ciddi bir sağlık tehdidi olmaya devam etmektedir. Kanser görülme sıklığı dünya genelinde benzer eğilimler göstermektedir. 2020 yılında dünya genelinde 19 milyondan fazla kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon kanser ölümü bildirilmiştir (Ferlay et al., 2021). Önümüzdeki yıllarda, kanser vakalarının sayısında ciddi bir artış beklenmektedir. 2070 yılına kadar her yıl 34 milyondan fazla kanser vakasının teşhis edileceği tahmin edilmektedir. Küresel ölçekte kanser vakalarında en büyük artışın akciğer, meme ve kolorektal kanser (CRC) türlerinde olacağı düşünülmektedir. Akciğer kanseri, günümüzde en yaygın kanser türü olup, 2035 yılına kadar vaka sayısının 3 milyona ulaşması beklenmektedir. Ayrıca, akciğer kanserine bağlı ölümlerin de dünya genelinde artacağı öngörülmektedir (Didkowska et al., 2016). Kanser tedavisinde cerrahi müdahale, radyoterapi,

kemoterapi ve hedefe yönelik ilaçlar gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Hangi yöntemin tercih edileceği, kanserin tipi, yayılma durumu ve hastanın sağlık durumu gibi etkenlere bağlı olarak belirlenmektedir. Son 25 yılda tanı ve tedavi alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsada, akciğer kanseri hastalarının genel prognozu hâlâ arzu edilen düzeye ulaşmamıştır. Lokalize kanserler hariç, standart tedavilere verilen yanıt genellikle yetersiz kalmaktadır. Bu bağlamda, alternatif bir yöntem olarak değerlendirilen kanser aşılı, son yıllarda büyük bir ilgi görmektedir (Hassan Lemjabbar-Alaouia et al., 2017) Bunun sebebi, kanser aşılarının hem önleyici hem de tedavi edici etkiler sunmayı hedeflemesidir. Günümüzdeki kanser aşısı araştırmaları, genellikle bilinen ya da potansiyel olarak keşfedilmemiş tümörle ilişkili antijenlerin hedeflenmesine odaklanmaktadır (Thomas & Prendergast, 2016). Bu tez çalışmasında, akciğer kanseri tedavisi için kullanılmaya aday, özgün bir DNA aşısı önerilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar şu şekildedir:

- Ardışık klonlama işlemleriyle GM-CSF, CTLA-4 ve Muc1-VNTR genleri pVAX1 vektörüne eklendi; pVAX1-GMCSF, pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF rekombinant DNA'ları elde edildi. Klonlamalar dizi analiziyle doğrulandı.
- pVAX1-GMCSF ve pVAX1-CTLA4-GMCSF, CHO hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle transfer edildi ve GM-CSF ve CTLA-4 proteininin ifadesi doğrulandı.
- Tümör modeli oluşturulması ve tümör tedavisi için;
 - LLC1 fare akciğer kanseri hücre hattı kullanılarak C57BL/6 farelerinde subkutan olarak oluşturulan sinjenik tümör modeli, model oluşturulduktan 10 gün sonra ölçüm yapılarak belirlendi.
 - Tümör taşıyan farelere pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF ile 5'er gün aralıkla 3 doz aşılama yapıldı.
 - Son aşılamanın ardından fareler 30 gün boyunca takip edildi. Kontrole kıyasla en fazla tümör hacminin pVAX-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF aşısının uygulandığı tedavi grubunda olduğu görüldü. Tümör hacminin en az görüldüğü grup, pVAX-CTLA4-GMCSF aşısının uygulandığı tedavi grubu olarak belirlendi.
 - Ayrıca, tedavi sonrası hayvanlardan alınan deri, akciğer ve karaciğer doku örneklerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal analiz sonuçlarına göre; üç doku tipinde de pVAX1-CTLA4-GMCSF (pVCG) grubunun diğer gruplara (kontrol, pVAX1 (sham) ve pVAX1-Muc1VNTR-CTLA4-GMCSF (pVMCG)

grubu) kıyasla daha fazla diferansiyasyon, daha az polimorfizm, hafif düzeyde mitoz ve hiperkromazi gösterdiği belirlendi.

➤ Farelerin geliştirilen DNA aşılı ile bağışıklanması:

- Geliştirilen pVAX1-CTLA4-GMCSF ve pVAX-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF DNA aşılarının *in vivo* antikor üretimi uyarımını belirlemek için sağlıklı C57BL/6 farelere 1'er hafta arayla 3 doz aşılama yapıldı.
- Aşılanan farelerde DNA aşılara karşı gelişen antikor yanıtı, ELISA yöntemi ile değerlendirildi. pVAX1-CTLA4-GMCSF ile immünize edilen grupta, CTLA-4 antijenine özgü antikor seviyesinin en yüksek düzeye, son aşılamadan üç gün sonra 1:1 oranında seyreltilmiş serum örneklerinde ulaştığı belirlendi.
- Ayrıca, hayvanlardan alınan akciğer ve karaciğer doku örneklerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal analiz sonuçlarına göre; tüm gruplarda sağlıklı dokulardan farklı bir histolojik görünüme rastlanmadı. Bununla birlikte, sağlıklı farelerde aşılardan herhangi bir yan etkisi belirlenmedi.

Bu gözlemler, CTLA-4 içeren DNA aşısının (pVAX1-CTLA4-GMCSF) potansiyelini vurgulamakta olup, tümör immünoterapisi için umut verici bir yaklaşımı temsil edebileceğini göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlara göre, Muc-1 geninin VNTR dizisinin (PDTRPA aminoasit dizisini içeren) tek kopya halinde pVAX1-CTLA4-GMCSF içerisine yerleştirilerek oluşturulan pVAX1-Muc1 VNTR-CTLA4-GMCSF aşısının uygulandığı tedavi grubunda tümör baskılanmasının gerçekleşebilmesi için, VNTR dizisinin daha yüksek sayıda kopyası yerleştirilerek denenebilir. ELISA analizinde Muc1 VNTR antikorunun güvenilir şekilde tespit edilebilmesi için, test sisteminin tasarımında kullanılan immobilizasyon yöntemi dikkatle seçilmeli; proteinlerin büyüklüğü ve epitopların erişilebilirliği göz önünde bulundurulmalıdır. Özellikle küçük proteinler söz konusu ise doğrudan yüzeye bağlama yerine, antijeni yakalayacak özgül bir yakalama antikoru gibi alternatif yöntemlerin kullanılması daha uygun olabilir. Bu sayede bağlanma etkinliği artırılarak testin doğruluğu ve duyarlılığı geliştirilebilir. Ayrıca bütün gruplarda daha fazla spesifik antikor miktarının oluşabilmesi ve tümör büyümesinin baskılanabilmesi için uygulanan (100 µg) daha fazla miktarda aşılardan uygulanabilir. Aynı zamanda yine aynı amaçla 3 doz uygulanan aşılardan 4 doz veya 5 doz halinde uygulanabilir. CD8⁺ T lenfositlerin sayısı akış sitometri analizi ile belirlenebilir. Böylece aşının hangi tip immun yanıtı (humoral veya hücresel) daha çok uyardığı belirlenebilir. Ayrıca geliştirilen DNA aşılarının koruyucu etkilerine yine subkutan olarak oluşturulan sinjenik tümör modelinde bakılabilir. Aşıların etkinliğinin sinjenik tümör modellerinde belirlenmesinin yanı

sıra koruyucu ve/ya tedavi edici etkinliği ksenojenik tümör modelinde de çalışılabilir. Önerilen çalışmalarla aşının etkinliği daha da artırılarak farklı kanser türlerinde (mide, meme ve kolon) de denenebilir.



KAYNAKLAR

- Ahmad, A. S., Ormiston-Smith, N., & Sasieni, P. D. (2015). Trends in the lifetime risk of developing cancer in Great Britain: comparison of risk for those born from 1930 to 1960. *British Journal of Cancer*, 112(5), 943–947. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.606>
- Ahmad, F. B., & Anderson, R. N. (2021). The Leading Causes of Death in the US for 2020. *JAMA*, 325(18), 1829–1830. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.5469>
- Akuta, T., Maruyama, T., Sakuma, C., Nakagawa, M., Tomioka, Y., Entzminger, K., Fleming, J. K., Sato, R., Shibata, T., Kurosawa, Y., Okumura, C. J., & Arakawa, T. (2022). A New Method to Characterize Conformation-Specific Antibody by a Combination of Agarose Native Gel Electrophoresis and Contact Blotting. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antib11020036>
- Alard, E., Butnariu, A. B., Grillo, M., Kirkham, C., Zinovkin, D. A., Newnham, L., Macciochi, J., & Pranjol, M. Z. I. (2020). Advances in anti-cancer immunotherapy: Car-t cell, checkpoint inhibitors, dendritic cell vaccines, and oncolytic viruses, and emerging cellular and molecular targets. *Cancers*, 12(7), 1–38. <https://doi.org/10.3390/cancers12071826>
- Ali, O. A., Lewin, S. A., Dranoff, G., & Mooney, D. J. (2016). Vaccines Combined with Immune Checkpoint Antibodies Promote Cytotoxic T-cell Activity and Tumor Eradication. *Cancer Immunology Research*, 4(2), 95–100. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0126>
- Andes, D., & Craig, W. A. (2002). Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(4), 261–268. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(02\)00022-5](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(02)00022-5)
- Ashok, M. S., & Rangarajan, P. N. (2002). Protective efficacy of a plasmid DNA encoding Japanese encephalitis virus envelope protein fused to tissue plasminogen activator signal sequences: studies in a murine intracerebral virus challenge model. *Vaccine*, 20(11–12), 1563–1570. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00492-3](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00492-3)
- Ashwini, M., Murugan, S. B., Balamurugan, S., & Sathishkumar, R. (2016). [Advances in Molecular Cloning]. *Molekuliarnaia biologiya*, 50(1), 3–9. <https://doi.org/10.7868/S0026898416010134>
- Aycock, K. N., & Davalos, R. V. (2019). Irreversible Electroporation: Background, Theory, and Review of Recent Developments in Clinical Oncology. *Bioelectricity*, 1(4), 214–234. <https://doi.org/10.1089/bioe.2019.0029>
- Baklaushev, V. P., Kilpeläinen, A., Petkov, S., Abakumov, M. A., Grinenko, N. F., Yusubalieva, G. M., Latanova, A. A., Gubskiy, I. L., Zabozaev, F. G., Starodubova, E. S., Abakumova, T. O., Isaguliants, M. G., & Chekhonin, V. P. (2017). Luciferase Expression Allows Bioluminescence Imaging But Imposes Limitations on the Orthotopic Mouse (4T1) Model of Breast Cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 7715. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07851-z>
- Balls, M. (2013). The wisdom of Russell and Burch. 3. Fidelity and discrimination. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 41(1), P12-4.

- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4–25. <https://doi.org/10.1111/sms.12702>
- Bijker, M. S., van den Eeden, S. J. F., Franken, K. L., Melief, C. J. M., van der Burg, S. H., & Offringa, R. (2008). Superior induction of anti-tumor CTL immunity by extended peptide vaccines involves prolonged, DC-focused antigen presentation. *European Journal of Immunology*, 38(4), 1033–1042. <https://doi.org/10.1002/eji.200737995>
- Blumenschein, G. R., Devarakonda, S., Johnson, M., Moreno, V., Gainor, J., Edelman, M. J., Heymach, J. V., Govindan, R., Bachier, C., Doger de Spéville, B., Frigault, M. J., Olszanski, A. J., Lam, V. K., Hyland, N., Navenot, J.-M., Fayngerts, S., Wolchinsky, Z., Broad, R., Batrakou, D., ... Fracasso, P. M. (2022). Phase I clinical trial evaluating the safety and efficacy of ADP-A2M10 SPEAR T cells in patients with MAGE-A10(+) advanced non-small cell lung cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003581>
- Bonam, S. R., Partidos, C. D., Halmuthur, S. K. M., & Muller, S. (2017). An Overview of Novel Adjuvants Designed for Improving Vaccine Efficacy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(9), 771–793. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.06.002>
- Bowen, W. S., Srivastava, A. K., Batra, L., Barsoumian, H., & Shirwan, H. (2018). Current challenges for cancer vaccine adjuvant development. *Expert Review of Vaccines*, 17(3), 207–215. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1434000>
- Braun, P., Davies, G. M., Price, M. R., Williams, P. M., Tendler, S. J. B., & Kunz, H. (1998). Effects of glycosylation on fragments of tumour associated human epithelial mucin MUC1. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 6(9). [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(98\)00092-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(98)00092-3)
- Brown, D. W., Kim, Y. T., & Siskind, G. W. (1989). The influence of immune complexes, steric effects, and antigen-antigen interactions on the sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Immunological Methods*, 116(1), 45–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90311-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90311-6)
- Bugge, T. H., Kombrinck, K. W., Xiao, Q., Holmbäck, K., Daugherty, C. C., Witte, D. P., & Degen, J. L. (1997). Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen-deficient mice. *Blood*, 90(11), 4522–4531.
- Butterfield, L. H. (2015). Cancer vaccines. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 350, h988. <https://doi.org/10.1136/bmj.h988>
- Calvo Tardón, M., Allard, M., Dutoit, V., Dietrich, P.-Y., & Walker, P. R. (2019). Peptides as cancer vaccines. *Current Opinion in Pharmacology*, 47, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.01.007>
- Cao, B., Liu, M., Wang, L., Zhu, K., Cai, M., Chen, X., Feng, Y., Yang, S., Fu, S., Zhi, C., Ye, X., Zhang, J., Zhang, Z., Yang, X., Zhao, M., Wu, Q., Xu, L., Yang, L., Lian, H., ... Zhang, Z. (2022). Remodelling of tumour microenvironment by microwave ablation potentiates immunotherapy of AXL-specific CAR T cells against non-small cell lung cancer. *Nature Communications*, 13(1), 6203. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33968-5>
- Çavuşoğlu, T. (2016). Immunohistochemical restaining of hematoxylin and eosin stained slides: a histotechnical study. *Istanbul Bilim University Florence Nightingale Journal of*

- Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T., Mellman, I., Prindiville, S. A., Viner, J. L., Weiner, L. M., & Matrisian, L. M. (2009). The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(17), 5323–5337. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0737>
- Chen, C., Smye, S. W., Robinson, M. P., & Evans, J. A. (2006). Membrane electroporation theories: a review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 44(1–2), 5–14. <https://doi.org/10.1007/s11517-005-0020-2>
- Chen, D., Huang, L., Zhou, H., & Zhang, Y. (2021). Combining IL-10 and Oncolytic Adenovirus Demonstrates Enhanced Antitumor Efficacy Through CD8(+) T Cells. *Frontiers in Immunology*, 12, 615089. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.615089>
- Cho, H. Il, Barrios, K., Lee, Y. R., Linowski, A. K., & Celis, E. (2013). BiVax: A peptide/poly-IC subunit vaccine that mimics an acute infection elicits vast and effective anti-tumor CD8 T-cell responses. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(4), 787–799. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1382-6>
- Creaney, J., Segal, A., Sterrett, G., Platten, M. A., Baker, E., Murch, A. R., Nowak, A. K., Robinson, B. W. S., & Millward, M. J. (2008). Overexpression and altered glycosylation of MUC1 in malignant mesothelioma. *British Journal of Cancer*, 98(9). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604340>
- Creelan, B. C., Wang, C., Teer, J. K., Toloza, E. M., Yao, J., Kim, S., Landin, A. M., Mullinax, J. E., Saller, J. J., Saltos, A. N., Noyes, D. R., Montoya, L. B., Curry, W., Pilon-Thomas, S. A., Chiappori, A. A., Tanvetyanon, T., Kaye, F. J., Thompson, Z. J., Yoder, S. J., ... Antonia, S. J. (2021). Tumor-infiltrating lymphocyte treatment for anti-PD-1-resistant metastatic lung cancer: a phase 1 trial. *Nature Medicine*, 27(8), 1410–1418. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01462-y>
- Dag Taskesenligil, E., & Unver, Y. (2023). *6th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences* (M. DOĞAN (ed.); 6th ed.). October 2023. www.eurasianbiochem.org
- Dall, G., Vieusseux, J., Unsworth, A., Anderson, R., & Britt, K. (2015). Low Dose, Low Cost Estradiol Pellets Can Support MCF-7 Tumour Growth in Nude Mice without Bladder Symptoms. *Journal of Cancer*, 6(12), 1331–1336. <https://doi.org/10.7150/jca.10890>
- Damia, G., & D’Incalci, M. (2009). Contemporary pre-clinical development of anticancer agents--what are the optimal preclinical models? *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 45(16), 2768–2781. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.08.008>
- Day, C.-P., Carter, J., Weaver Ohler, Z., Bonomi, C., El Meskini, R., Martin, P., Graff-Cherry, C., Feigenbaum, L., Tüting, T., Van Dyke, T., Hollingshead, M., & Merlino, G. (2014). “Glowing head” mice: a genetic tool enabling reliable preclinical image-based evaluation of cancers in immunocompetent allografts. *PloS One*, 9(11), e109956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109956>
- Delitto, D., Pham, K., Vlada, A. C., Sarosi, G. A., Thomas, R. M., Behrns, K. E., Liu, C., Hughes, S. J., Wallet, S. M., & Trevino, J. G. (2015). Patient-derived xenograft models for pancreatic adenocarcinoma demonstrate retention of tumor morphology through incorporation of murine stromal elements. *The American Journal of Pathology*, 185(5), 1297–1303. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.016>

- DeMaria, P. J., & Bilusic, M. (2019). Cancer Vaccines. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 33(2), 199–214. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.12.001>
- DeRose, Y. S., Wang, G., Lin, Y.-C., Bernard, P. S., Buys, S. S., Ebbert, M. T. W., Factor, R., Matsen, C., Milash, B. A., Nelson, E., Neumayer, L., Randall, R. L., Stijleman, I. J., Welm, B. E., & Welm, A. L. (2011). Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nature Medicine*, 17(11), 1514–1520. <https://doi.org/10.1038/nm.2454>
- Didkowska, J., Wojciechowska, U., Mańczuk, M., & Łobaszewski, J. (2016). Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Annals of Translational Medicine*, 4(8), 150. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.03.11>
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., & Mulligan, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3539–3543. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3539>
- Duerr, G. D., Heine, A., Hamiko, M., Zimmer, S., Luetkens, J. A., Nattermann, J., Rieke, G., Isaak, A., Jehle, J., Held, S. A. E., Wasmuth, J. C., Wittmann, M., Strassburg, C. P., Brossart, P., Coburn, M., Treede, H., Nickenig, G., Kurts, C., & Velten, M. (2020). Parameters predicting COVID-19-induced myocardial injury and mortality. *Life Sciences*, 260. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118400>
- Duperret, E. K., Perales-Puchalt, A., Stoltz, R., G H, H., Mandloi, N., Barlow, J., Chaudhuri, A., Sardesai, N. Y., & Weiner, D. B. (2019). A Synthetic DNA, Multi-Neoantigen Vaccine Drives Predominately MHC Class I CD8(+) T-cell Responses, Impacting Tumor Challenge. *Cancer Immunology Research*, 7(2), 174–182. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0283>
- Faries, M. B., Mozzillo, N., Kashani-Sabet, M., Thompson, J. F., Kelley, M. C., DeConti, R. C., Lee, J. E., Huth, J. F., Wagner, J., Dalgleish, A., Pertschuk, D., Nardo, C., Stern, S., Elashoff, R., Gammon, G., & Morton, D. L. (2017). Long-Term Survival after Complete Surgical Resection and Adjuvant Immunotherapy for Distant Melanoma Metastases. *Annals of Surgical Oncology*, 24(13), 3991–4000. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-6072-3>
- Farrar, W. L., Harel-Bellan, A., & Ferris, D. K. (1988). Biochemical and molecular events controlled by lymphokine growth factors. In *Society of General Physiologists series* (Vol. 43, pp. 371–380).
- Faure, F., Mantegazza, A., Sadaka, C., Sedlik, C., Jotereau, F., & Amigorena, S. (2009). Long-lasting cross-presentation of tumor antigen in human DC. *European Journal of Immunology*, 39(2), 380–390. <https://doi.org/10.1002/eji.200838669>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fidler, I. J., & Kripke, M. L. (2015). The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 34(4), 635–641. <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9586-9>
- Floersheim, G. L., Nassenstein, D., & Torhorst, J. (1980). Growth of human tumors in mice after short-term immunosuppression with procarbazine, cyclophosphamide, and antilymphocyte serum. *Transplantation*, 30(4), 275–280.

- Frese, K. K., & Tuveson, D. A. (2007). Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews. Cancer*, 7(9), 645–658. <https://doi.org/10.1038/nrc2192>
- Fridman, R., Kibbey, M. C., Royce, L. S., Zain, M., Sweeney, M., Jicha, D. L., Yannelli, J. R., Martin, G. R., & Kleinman, H. K. (1991). Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 769–774. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.769>
- Garofalo, M., Saari, H., Somersalo, P., Crescenti, D., Kuryk, L., Aksela, L., Capasso, C., Madetoja, M., Koskinen, K., Oksanen, T., Mäkitie, A., Jalasvuori, M., Cerullo, V., Ciana, P., & Yliperttula, M. (2018). Antitumor effect of oncolytic virus and paclitaxel encapsulated in extracellular vesicles for lung cancer treatment. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 283, 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.015>
- Gatina, D. Z., Garanina, E. E., Zhuravleva, M. N., Synbulatova, G. E., Mullakhmetova, A. F., Solovyeva, V. V., Kiyasov, A. P., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Salafutdinov, I. I. (2021). Proangiogenic effect of 2A-peptide based multicistronic recombinant constructs encoding VEGF and FGF2 growth factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms22115922>
- Gendler, S. J., Lancaster, C. A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E. N., & Wilson, D. (1990). Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)77254-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)77254-2)
- Gendler, S. J., Spicer, A. P., Lalani, E. N., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Boshell, M., & Taylor-Papadimitriou, J. (1991). Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1. *American Review of Respiratory Disease*, 144(3 II). https://doi.org/10.1164/ajrccm/144.3_pt_2.s42
- Gengenbacher, N., Singhal, M., & Augustin, H. G. (2017). Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. *Nature Reviews. Cancer*, 17(12), 751–765. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.92>
- Giaccone, G., Bazhenova, L. A., Nemunaitis, J., Tan, M., Juhász, E., Ramlau, R., van den Heuvel, M. M., Lal, R., Kloecker, G. H., Eaton, K. D., Chu, Q., Dunlop, D. J., Jain, M., Garon, E. B., Davis, C. S., Carrier, E., Moses, S. C., Shawler, D. L., & Fakhrai, H. (2015). A phase III study of belagenpumatucel-L, an allogeneic tumour cell vaccine, as maintenance therapy for non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 51(16), 2321–2329. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.07.035>
- Glauffig, M., Stergiou, N., Hartmann, S., Schmitt, E., & Kunz, H. (2018). A Synthetic MUC1 Anticancer Vaccine Containing Mannose Ligands for Targeting Macrophages and Dendritic Cells. *ChemMedChem*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700646>
- Gong, Y.-F., Zhou, Q.-B., Liao, Y.-D., Mai, C., Chen, T.-J., Tang, Y.-Q., & Chen, R.-F. (2017). Optimized construction of MUC1-VNTR(n) DNA vaccine and its anti-pancreatic cancer efficacy. *Oncology Letters*, 13(4), 2198–2206. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5717>
- Gong, Y. F., Zhou, Q. B., Liao, Y. Di, Mai, C., Chen, T. J., Tang, Y. Q., & Chen, R. F. (2017). Optimized construction of MUC1-VNTRn DNA vaccine and its anti-pancreatic cancer efficacy. *Oncology Letters*, 13(4). <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5717>

- Graner, M. W., Likhacheva, A., Davis, J., Raymond, A., Brandenberger, J., Romanoski, A., Thompson, S., Akporiaye, E., & Katsanis, E. (2004). Cargo from tumor-expressed albumin inhibits T-cell activation and responses. *Cancer Research*, 64(21), 8085–8092. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1871>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Transformation of *Escherichia coli* by Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(6), 101220. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101220>
- Gubin, M. M., Artyomov, M. N., Mardis, E. R., & Schreiber, R. D. (2015). Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3413–3421. <https://doi.org/10.1172/JCI80008>
- Gulley, J. L., Borre, M., Vogelzang, N. J., Ng, S., Agarwal, N., Parker, C. C., Pook, D. W., Rathenborg, P., Flaig, T. W., Carles, J., Saad, F., Shore, N. D., Chen, L., Heery, C. R., Gerritsen, W. R., Priou, F., Langkilde, N. C., Novikov, A., & Kantoff, P. W. (2019). Phase III Trial of PROSTVAC in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(13), 1051–1061. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.02031>
- Harding, M. C., Sloan, C. D., Merrill, R. M., Harding, T. M., Thacker, B. J., & Thacker, E. L. (2018). Transitions From Heart Disease to Cancer as the Leading Cause of Death in US States, 1999-2016. *Preventing Chronic Disease*, 15, E158. <https://doi.org/10.5888/pcd15.180151>
- Hassan Lemjabbar-Alaouia, O. H., Yanga, Y.-W., & Buchanana, P. (2017). Lung cancer: biology and treatment options. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002.Lung>
- Hayes, D. F., Zurawski, V. R., & Kufe, D. W. (1986). Comparison of circulating CA15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 4(10). <https://doi.org/10.1200/JCO.1986.4.10.1542>
- Hayrapetyan, H., Tran, T., Tellez-Corrales, E., & Madiraju, C. (2023). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. In R. S. Matson (Ed.), *ELISA: Methods and Protocols* (pp. 1–17). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2903-1_1
- Henderson, R. A., Konitsky, W. M., Barratt-Boyes, S. M., Soares, M., Robbins, P. D., & Finn, O. J. (1998). Retroviral expression of MUC-1 human tumor antigen with intact repeat structure and capacity to elicit immunity in vivo. *Journal of Immunotherapy*, 21(4). <https://doi.org/10.1097/00002371-199807000-00002>
- Henley, S. A., & Dick, F. A. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Division*, 7(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-10>
- Herter-Sprie, G. S., Kung, A. L., & Wong, K.-K. (2013). New cast for a new era: preclinical cancer drug development revisited. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3639–3645. <https://doi.org/10.1172/JCI68340>
- Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A. V., Budinská, E., Byrne, A. T., Caldas, C., Clarke, R. B., de Jong, S., Jonkers, J., Mælandsmo, G. M., Roman-Roman, S., Seoane, J., Trusolino, L., & Villanueva, A. (2014). Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discovery*, 4(9), 998–1013. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0001>
- Hilf, N., Kuttruff-Coqui, S., Frenzel, K., Bukur, V., Stevanović, S., Gouttefangeas, C., Platten,

- M., Tabatabai, G., Dutoit, V., van der Burg, S. H., Straten, P. T., Martinez-Ricarte, F., Ponsati, B., Okada, H., Lassen, U., Admon, A., Ottensmeier, C. H., Ulges, A., Kreiter, S., ... Wick, W. (2019). Publisher Correction: Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature*, 566(7745), E13. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0959-z>
- Hirano, S. (2012). Western blot analysis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 926, 87–97. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_6
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., ... Urba, W. J. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(8). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1003466>
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research : BCR*, 13(4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- Hollingsworth, R. E., & Jansen, K. (2019). Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *Npj Vaccines*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0103-y>
- Hoption Cann, S. A., van Netten, J. P., & van Netten, C. (2003). Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal*, 79(938), 672–680.
- Huitink, J. M., Heimerikxs, M., Nieuwland, M., Loer, S. A., Brugman, W., Velds, A., Sie, D., & Kerkhoven, R. M. (2010). Volatile anesthetics modulate gene expression in breast and brain tumor cells. *Anesthesia and Analgesia*, 111(6), 1411–1415. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3181fa3533>
- Ingolotti, M., Kawalekar, O., Shedlock, D. J., Muthumani, K., & Weiner, D. B. (2010). DNA vaccines for targeting bacterial infections. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 9, Issue 7). <https://doi.org/10.1586/erv.10.57>
- Ireson, C. R., Alavijeh, M. S., Palmer, A. M., Fowler, E. R., & Jones, H. J. (2019). The role of mouse tumour models in the discovery and development of anticancer drugs. *British Journal of Cancer*, 121(2), 101–108. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0495-5>
- Jacobs, S. R., Herman, C. E., MacIver, N. J., Wofford, J. A., Wieman, H. L., Hammen, J. J., & Rathmell, J. C. (2008). Glucose Uptake Is Limiting in T Cell Activation and Requires CD28-Mediated Akt-Dependent and Independent Pathways. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4476–4486. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4476>
- Jaspers, J. E., Khan, J. F., Godfrey, W. D., Lopez, A. V, Ciampricotti, M., Rudin, C. M., & Brentjens, R. J. (2023). IL-18-secreting CAR T cells targeting DLL3 are highly effective in small cell lung cancer models. *The Journal of Clinical Investigation*, 133(9). <https://doi.org/10.1172/JCI166028>
- Jenkins, K. A., Park, M., Pederzoli-Ribeil, M., Eskiocak, U., Johnson, P., Guzman, W., McLaughlin, M., Moore-Lai, D., O'Toole, C., Liu, Z., Nicholson, B., Flesch, V., Qiu, H., Clackson, T., O'Hagan, R. C., Rodeck, U., Karow, M., O'Neil, J., & Williams, J. C. (2023). XTX101, a tumor-activated, Fc-enhanced anti-CTLA-4 monoclonal antibody, demonstrates tumor-growth inhibition and tumor-selective pharmacodynamics in mouse models of cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 11(12), 1–17. <https://doi.org/10.1136/jitc-2023-007785>

- Jie, Y., Liu, G., Feng, L., Li, Y., E, M., Wu, L., Li, Y., Rong, G., Li, Y., Wei, H., & Gu, A. (2021). PTK7-Targeting CAR T-Cells for the Treatment of Lung Cancer and Other Malignancies. *Frontiers in Immunology*, 12, 665970. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.665970>
- Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., & Schellhammer, P. F. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 363(5), 411–422. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294>
- Kaufman, H. L., Ruby, C. E., Hughes, T., & Slingluff, C. L. (2014). Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-11>
- Kellish, P., Shabashvili, D., Rahman, M. M., Nawab, A., Guijarro, M. V, Zhang, M., Cao, C., Moussatche, N., Boyle, T., Antonia, S., Reinhard, M., Hartzell, C., Jantz, M., Mehta, H. J., McFadden, G., Kaye, F. J., & Zajac-Kaye, M. (2019). Oncolytic virotherapy for small-cell lung cancer induces immune infiltration and prolongs survival. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(6), 2279–2292. <https://doi.org/10.1172/JCI121323>
- Khong, H., & Overwijk, W. W. (2016). Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0160-y>
- Kim, B. (2017). Western Blot Techniques. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1606, 133–139. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_9
- Kim, H.-J., & Cantor, H. (2014). CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunology Research*, 2(2), 91–98. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0216>
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- Kim, Y. S. (1992). Altered glycosylation of mucin glycoproteins in colonic neoplasia. *Journal of Cellular Biochemistry*, 50(S16G). <https://doi.org/10.1002/jcb.240501117>
- Kinkead, H. L., Hopkins, A., Lutz, E., Wu, A. A., Yarchoan, M., Cruz, K., Woolman, S., Vithayathil, T., Glickman, L. H., Ndubaku, C. O., McWhirter, S. M., Dubensky, T. W. J., Armstrong, T. D., Jaffee, E. M., & Zaidi, N. (2018). Combining STING-based neoantigen-targeted vaccine with checkpoint modulators enhances antitumor immunity in murine pancreatic cancer. *JCI Insight*, 3(20). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122857>
- Kiri, S., & Ryba, T. (2024). Cancer, metastasis, and the epigenome. *Molecular Cancer*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02069-w>
- Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews. Cancer*, 9(4), 302–312. <https://doi.org/10.1038/nrc2627>
- Klinman, D. M., Yamshchikov, G., & Ishigatsubo, Y. (1997). Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 158(8), 3635–3639.
- Kos, S., Lopes, A., Preat, V., Cemazar, M., Tratar, U. L., Ucakar, B., Vanvarenberg, K., Sersa, G., & Vandermeulen, G. (2019). Intradermal DNA vaccination combined with dual CTLA-4 and PD-1 blockade provides robust tumor immunity in murine melanoma. *PLoS ONE*, 14(5), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217762>

- Kotnik, T., & Weaver, J. C. (2016). Abiotic Gene Transfer: Rare or Rampant? *The Journal of Membrane Biology*, 249(5), 623–631. <https://doi.org/10.1007/s00232-016-9897-y>
- Kumai, T., Fan, A., Harabuchi, Y., & Celis, E. (2017). Cancer immunotherapy: moving forward with peptide T cell vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 47, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.07.003>
- Kumai, T., Kobayashi, H., Harabuchi, Y., & Celis, E. (2017). Peptide vaccines in cancer — old concept revisited. *Current Opinion in Immunology*, 45, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.11.001>
- Kumai, T., Lee, S., Cho, H.-I., Sultan, H., Kobayashi, H., Harabuchi, Y., & Celis, E. (2017). Optimization of Peptide Vaccines to Induce Robust Antitumor CD4 T-cell Responses. *Cancer Immunology Research*, 5(1), 72–83. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0194>
- Kuriakose, A., Chirmule, N., & Nair, P. (2016). Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. *Journal of Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1298473>
- Lahiri, A., Maji, A., Potdar, P. D., Singh, N., Parikh, P., Bisht, B., Mukherjee, A., & Paul, M. K. (2023). Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Molecular Cancer*, 22(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01740-y>
- Lai, T., Yang, Y., & Ng, S. K. (2013). Advances in mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals*, 6(5), 579–603. <https://doi.org/10.3390/ph6050579>
- Larocca, C., Bs, P., & Schlom, J. (2011). *Viral Vector Y Based Therapeutic Cancer Vaccines*. 17(5), 359–371.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271(5256), 1734–1736. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>
- Lee, P. Y., Saraygord-Afshari, N., & Low, T. Y. (2020). The evolution of two-dimensional gel electrophoresis - from proteomics to emerging alternative applications. *Journal of Chromatography. A*, 1615, 460763. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460763>
- Li, L., & Petrovsky, N. (2016). Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. In *Expert Review of Vaccines* (Vol. 15, Issue 3). <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124762>
- Li, Y., & Cozzi, P. (2007). MUC1 is a Promising Therapeutic Target for Prostate Cancer Therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 7(3). <https://doi.org/10.2174/156800907780618338>
- Lim, M., Badruddoza, A. Z. M., Firdous, J., Azad, M., Mannan, A., Al-Hilal, T. A., Cho, C.-S., & Islam, M. A. (2020). Engineered Nanodelivery Systems to Improve DNA Vaccine Technologies. *Pharmaceutics*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010030>
- Lin, C.-Y., Huang, K.-Y., Kao, S.-H., Lin, M.-S., Lin, C.-C., Yang, S.-C., Chung, W.-C., Chang, Y.-H., Chein, R.-J., & Yang, P.-C. (2023). Small-molecule PIK-93 modulates the tumor microenvironment to improve immune checkpoint blockade response. *Science Advances*, 9(14), eade9944. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9944>
- Lipp, J. J., Wang, L., Yang, H., Yao, F., Harrer, N., Müller, S., Berezowska, S., Dorn, P., Marti, T. M., Schmid, R. A., Hegedüs, B., Souabni, A., Carotta, S., Pearson, M. A.,

- Sommergruber, W., Kocher, G. J., & Hall, S. R. R. (2022). Functional and molecular characterization of PD1(+) tumor-infiltrating lymphocytes from lung cancer patients. *Oncoimmunology*, 11(1), 2019466. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.2019466>
- Liu, C., Lu, Z., Xie, Y., Guo, Q., Geng, F., Sun, B., Wu, H., Yu, B., Wu, J., Zhang, H., Yu, X., & Kong, W. (2018). Soluble PD-1-based vaccine targeting MUC1 VNTR and survivin improves anti-tumor effect. *Immunology Letters*, 200, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.06.004>
- Lodise, T. P., & Drusano, G. L. (2014). Use of pharmacokinetic/pharmacodynamic systems analyses to inform dose selection of tedizolid phosphate. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 58 Suppl 1, S28–34. <https://doi.org/10.1093/cid/cit615>
- Lopes, A., Vandermeulen, G., & Pr  at, V. (2019). Lopes A, Vandermeulen G, Preat V. Cancer DNA vaccines: current preclinical and clinical developments and future perspectives. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):146. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 38(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1154-7>
- MacCallum, C. J. (2010). Reporting animal studies: good science and a duty of care. In *PLoS biology* (Vol. 8, Issue 6, p. e1000413). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000413>
- Madan, R. A., Bilusic, M., Heery, C., Schlom, J., & Gulley, J. L. (2012). Clinical evaluation of TRICOM vector therapeutic cancer vaccines. *Seminars in Oncology*, 39(3), 296–304. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2012.02.010>
- Madan, R. A., Mohebtash, M., Arlen, P. M., Vergati, M., Rauckhorst, M., Steinberg, S. M., Tsang, K. Y., Poole, D. J., Parnes, H. L., Wright, J. J., Dahut, W. L., Schlom, J., & Gulley, J. L. (2012). Ipilimumab and a poxviral vaccine targeting prostate-specific antigen in metastatic castration-resistant prostate cancer: A phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet Oncology*, 13(5). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70006-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70006-2)
- Madhi, H., Lee, J.-S., Choi, Y. E., Li, Y., Kim, M. H., Choi, Y., & Goh, S.-H. (2022). FOXM1 Inhibition Enhances the Therapeutic Outcome of Lung Cancer Immunotherapy by Modulating PD-L1 Expression and Cell Proliferation. *Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*, 9(29), e2202702. <https://doi.org/10.1002/advs.202202702>
- Maeng, H. M., & Berzofsky, J. A. (2019). Strategies for developing and optimizing cancer vaccines. *F1000Research*, 8(May), 1–14. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18693.1>
- Mahni  -Kalamiza, S., Kotnik, T., & Miklav  i  , D. (2012). Educational application for visualization and analysis of electric field strength in multiple electrode electroporation. *BMC Medical Education*, 12, 102. <https://doi.org/10.1186/1472-6920-12-102>
- Mai, T. J., Ma, R., Li, Z., & Bi, S. C. (2016). Construction of a fusion plasmid containing the PSCA gene and cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and its anti-tumor effect in an animal model of prostate cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(11), 1–6. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165620>
- Maira-Litr  n, T. (2017). Immunization of mice. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2017. <https://doi.org/10.1002/cpmb.30>
- Mao, W., Cai, Y., Chen, D., Jiang, G., Xu, Y., Chen, R., Wang, F., Wang, X., Zheng, M., Zhao, X., & Mei, J. (2022). Statin shapes inflamed tumor microenvironment and enhances immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. *JCI Insight*, 7(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.161940>

- Masemann, D., Meissner, R., Schied, T., Lichty, B. D., Rapp, U. R., Wixler, V., & Ludwig, S. (2021). Synergistic anti-tumor efficacy of oncolytic influenza viruses and B7-H3 immune-checkpoint inhibitors against IC-resistant lung cancers. *Oncoimmunology*, 10(1), 1885778. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1885778>
- Maslak, P. G., Dao, T., Bernal, Y., Chanel, S. M., Zhang, R., Frattini, M., Rosenblat, T., Jurcic, J. G., Brentjens, R. J., Arcila, M. E., Rampal, R., Park, J. H., Douer, D., Katz, L., Sarlis, N., Tallman, M. S., & Scheinberg, D. A. (2018). Phase 2 trial of a multivalent WT1 peptide vaccine (galinpepimut-S) in acute myeloid leukemia. *Blood Advances*, 2(3), 224–234. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017014175>
- McCarthy, E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa Orthopaedic Journal*, 26, 154–158.
- McCormack, V. A., & Boffetta, P. (2011). Today's lifestyles, tomorrow's cancers: trends in lifestyle risk factors for cancer in low- and middle-income countries. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 22(11), 2349–2357. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq763>
- McKay, R. R., Hafron, J. M., Ferro, C., Wilfehrt, H. M., Fitch, K., Flanders, S. C., Fabrizio, M. D., & Schweizer, M. T. (2020). A Retrospective Observational Analysis of Overall Survival with Sipuleucel-T in Medicare Beneficiaries Treated for Advanced Prostate Cancer. *Advances in Therapy*, 37(12), 4910–4929. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01509-5>
- Melief, C. J. M., & van der Burg, S. H. (2008). Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nature Reviews. Cancer*, 8(5), 351–360. <https://doi.org/10.1038/nrc2373>
- Melief, C. J. M., van Hall, T., Arens, R., Ossendorp, F., & van der Burg, S. H. (2015). Therapeutic cancer vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3401–3412. <https://doi.org/10.1172/JCI80009>
- Mendes, G. P., Vieira, P. S., Lanceros-Méndez, S., Kluskens, L. D., & Mota, M. (2015). Transformation of Escherichia coli JM109 using pUC19 by the Yoshida effect. *Journal of Microbiological Methods*, 115, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.05.012>
- Miao, D., & Van Allen, E. M. (2016). Genomic determinants of cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 41, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.010>
- Morse, M. A., Gwin, W. R., & Mitchell, D. A. (2021). Vaccine Therapies for Cancer: Then and Now. In *Targeted Oncology* (Vol. 16, Issue 2). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s11523-020-00788-w>
- Morton, C. L., & Houghton, P. J. (2007). Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nature Protocols*, 2(2), 247–250. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.25>
- Mukherjee, P., Ginardi, A. R., Tinder, T. L., Sterner, C. J., & Gendler, S. J. (2001). MUC1-specific cytotoxic T lymphocytes eradicate tumors when adoptively transferred in vivo. *Clinical Cancer Research*, 7(11 SUPPL.).
- Mullen, P., Ritchie, A., Langdon, S. P., & Miller, W. R. (1996). Effect of Matrigel on the tumorigenicity of human breast and ovarian carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 67(6), 816–820. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960917\)67:6<816::AID-IJC10>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960917)67:6<816::AID-IJC10>3.0.CO;2-#)
- Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination

- in cell culture. *Cell Journal*, 13(4), 203–212.
- Ogi, C., & Aruga, A. (2013). Clinical evaluation of therapeutic cancer vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(5), 1049–1057. <https://doi.org/10.4161/hv.23917>
- Olson, B., Li, Y., Lin, Y., Liu, E. T., & Patnaik, A. (2018). Mouse Models for Cancer Immunotherapy Research. *Cancer Discovery*, 8(11), 1358–1365. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0044>
- Ott, P. A., & Wu, C. J. (2019). Cancer Vaccines: Steering T Cells Down the Right Path to Eradicate Tumors. *Cancer Discovery*, 9(4), 476–481. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1357>
- Ozyigit, I. I. (2020). Gene transfer to plants by electroporation: methods and applications. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 3195–3210. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05343-4>
- Pandey, S., & Dvorakova, M. C. (2019). Future Perspective of Diabetic Animal Models. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 20(1), 25–38. <https://doi.org/10.2174/1871530319666190626143832>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Prasad, V. V., & Gopalan, R. O. (2015). Continued use of MDA-MB-435, a melanoma cell line, as a model for human breast cancer, even in year, 2014. *NPJ Breast Cancer*, 1, 15002. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.2>
- Prochazka, M., Gaskins, H. R., Shultz, L. D., & Leiter, E. H. (1992). The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(8), 3290–3294. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3290>
- Qin, F., Xia, F., Chen, H., Cui, B., Feng, Y., Zhang, P., Chen, J., & Luo, M. (2021). A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.633776>
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Futter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S. K., & Sansom, D. M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: A molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 332(6029), 600–603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>
- Rosalia, R. A., Quakkelaar, E. D., Redeker, A., Khan, S., Camps, M., Drijfhout, J. W., Silva, A. L., Jiskoot, W., van Hall, T., van Veelen, P. A., Janssen, G., Franken, K., Cruz, L. J., Tromp, A., Oostendorp, J., van der Burg, S. H., Ossendorp, F., & Melief, C. J. M. (2013). Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *European Journal of Immunology*, 43(10), 2554–2565. <https://doi.org/10.1002/eji.201343324>
- Rowshanravan, B., Halliday, N., & Sansom, D. M. (2018). CTLA-4: A moving target in immunotherapy. In *Blood* (Vol. 131, Issue 1). <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-741033>
- Ruan, J., Duan, Y., Li, F., & Wang, Z. (2017). Enhanced synergistic anti-Lewis lung carcinoma effect of a DNA vaccine harboring a MUC1-VEGFR2 fusion gene used with GM-CSF as an adjuvant. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(1).

<https://doi.org/10.1111/1440-1681.12654>

- Safi, F., Kohler, I., Beger, H. - G, & Röttinger, E. (1991). The value of the tumor marker CA 15- 3 in diagnosing and monitoring breast cancer. A comparative study with carcinoembryonic antigen. *Cancer*, 68(3). [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910801\)68:3<574::AID-CNCR2820680322>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910801)68:3<574::AID-CNCR2820680322>3.0.CO;2-B)
- Schlom, J. (2012). Therapeutic cancer vaccines: Current status and moving forward. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(8). <https://doi.org/10.1093/jnci/djs033>
- Shah, P., Forget, M.-A., Frank, M. L., Jiang, P., Sakellariou-Thompson, D., Federico, L., Khairullah, R., Neutzler, C. A., Wistuba, I., Chow, C.-W. B., Long, Y., Fujimoto, J., Lin, S.-Y., Maitra, A., Negrao, M. V, Mitchell, K. G., Weissferdt, A., Vaporciyan, A. A., Cascone, T., ... Bernatchez, C. (2022). Combined IL-2, agonistic CD3 and 4-1BB stimulation preserve clonotype hierarchy in propagated non-small cell lung cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(2). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-003082>
- Sharma, P., & Allison, J. P. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science*, 348(6230), 56–61. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8172>
- Sharpless, N. E., & Depinho, R. A. (2006). The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(9), 741–754. <https://doi.org/10.1038/nrd2110>
- Shi, Y., Liu, C. H., Roberts, A. I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Zeng, R. Y., Tan, H. S. W., Das, G., & Devadas, S. (2006). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: What we do and don't know. *Cell Research*, 16(2), 126–133. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310017>
- Shin, S.-P., Seo, H.-H., Shin, J.-H., Park, H.-B., Lim, D.-P., Eom, H.-S., Bae, Y.-S., Kim, I.-H., Choi, K., & Lee, S.-J. (2013). Adenovirus expressing both thymidine kinase and soluble PD1 enhances antitumor immunity by strengthening CD8 T-cell response. *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(3), 688–695. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.252>
- Shirvani, R., Yazdanpanah, S., Barshan-tashnizi, M., & Shahali, M. (2019). A Novel Methanol-Free Platform for Extracellular Expression of rhGM-CSF in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 61(7), 521–527. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00182-6>
- Sikder, H., Huso, D. L., Zhang, H., Wang, B., Ryu, B., Hwang, S. T., Powell, J. D., & Alani, R. M. (2003). Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. *Cancer Cell*, 4(4), 291–299. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00245-9)
- Silveira, M. M., Oliveira, T. L., Schuch, R. A., McBride, A. J. A., Dellagostin, O. A., & Hartwig, D. D. (2017). DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. In *Vaccine* (Vol. 35, Issue 42). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.067>
- Siolas, D., & Hannon, G. J. (2013). Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Research*, 73(17), 5315–5319. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1069>
- Smith, B. D., Smith, G. L., Hurria, A., Hortobagyi, G. N., & Buchholz, T. A. (2009). Future of cancer incidence in the United States: burdens upon an aging, changing nation. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(17), 2758–2765. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.8983>

- Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., Walsh, L. A., Postow, M. A., Wong, P., Ho, T. S., Hollmann, T. J., Bruggeman, C., Kannan, K., Li, Y., Elipenahli, C., Liu, C., Harbison, C. T., Wang, L., Ribas, A., ... Chan, T. A. (2014). Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 371(23). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1406498>
- Soares, K. C., Rucki, A. A., Wu, A. A., Olino, K., Xiao, Q., Chai, Y., Wamwea, A., Bigelow, E., Lutz, E., Liu, L., Yao, S., Anders, R. A., Laheru, D., Wolfgang, C. L., Edil, B. H., Schulick, R. D., Jaffee, E. M., & Zheng, L. (2015). PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T-cell infiltration into pancreatic tumors. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 38(1), 1–11. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000062>
- Soerjomataram, I., & Bray, F. (2021). Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 18(10), 663–672. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00514-z>
- Sondak, V. K., Liu, P.-Y., Tuthill, R. J., Kempf, R. A., Unger, J. M., Sosman, J. A., Thompson, J. A., Weiss, G. R., Redman, B. G., Jakowatz, J. G., Noyes, R. D., & Flaherty, L. E. (2002). Adjuvant immunotherapy of resected, intermediate-thickness, node-negative melanoma with an allogeneic tumor vaccine: overall results of a randomized trial of the Southwest Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(8), 2058–2066. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.08.071>
- Soong, R. S., Trieu, J., Lee, S. Y., He, L., Tsai, Y. C., Wu, T. C., & Hung, C. F. (2013). Xenogeneic Human p53 DNA Vaccination by Electroporation Breaks Immune Tolerance to Control Murine Tumors Expressing Mouse p53. *PLoS ONE*, 8(2), 4–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056912>
- Spano, D., Heck, C., De Antonellis, P., Christofori, G., & Zollo, M. (2012). Molecular networks that regulate cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 22(3), 234–249. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.03.006>
- Spitzer, M. H., Carmi, Y., Reticker-Flynn, N. E., Kwek, S. S., Madhiredy, D., Martins, M. M., Gherardini, P. F., Prestwood, T. R., Chabon, J., Bendall, S. C., Fong, L., Nolan, G. P., & Engleman, E. G. (2017). Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168(3), 487-502.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.022>
- Stribbling, S. M., & Ryan, A. J. (2022). The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. *Nature Protocols*, 17(9), 2108–2128. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00709-3>
- Ström, J. O., Theodorsson, A., Ingberg, E., Isaksson, I.-M., & Theodorsson, E. (2012). Ovariectomy and 17 β -estradiol replacement in rats and mice: a visual demonstration. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 64, e4013. <https://doi.org/10.3791/4013>
- Sun, M., Yang, S., Huang, H., Gao, P., Pan, S., Cheng, Z., He, Z., Wang, Z., Sun, J., & Liu, F. (2022). Boarding Oncolytic Viruses onto Tumor-Homing Bacterium-Vessels for Augmented Cancer Immunotherapy. *Nano Letters*, 22(12), 5055–5064. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.2c00699>
- Susini, V., Fierabracci, V., Barria, G., Dodoli, L., Caponi, L., Paolicchi, A., & Franzini, M. (2021). Signal Enhancement in Oriented Immunosorbent Assays: A Balance between Accessibility of Antigen Binding Sites and Avidity. *Biosensors*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/bios11120493>
- Tait, A. S., Brown, C. J., Galbraith, D. J., Hines, M. J., Hoare, M., Birch, J. R., & James, D. C.

- (2004). Transient production of recombinant proteins by Chinese hamster ovary cells using polyethyleneimine/DNA complexes in combination with microtubule disrupting anti-mitotic agents. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(6), 707–721. <https://doi.org/10.1002/bit.20265>
- Tang, B., Wang, Y., Xu, W., Zhu, J., Weng, Q., Chen, W., Fang, S., Yang, Y., Qiu, R., Chen, M., Mao, W., Xu, M., Zhao, Z., Cai, S., Zhang, H., & Ji, J. (2023). Macrophage xCT deficiency drives immune activation and boosts responses to immune checkpoint blockade in lung cancer. *Cancer Letters*, 554, 216021. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.216021>
- Teixeira, L., Medioni, J., Garibal, J., Adotevi, O., Doucet, L., Durey, M.-A. D., Ghrieb, Z., Kiladjian, J.-J., Brizard, M., Laheurte, C., Wehbe, M., Pliquet, E., Escande, M., Defrance, R., Culine, S., Oudard, S., Wain-Hobson, S., Doppler, V., Huet, T., & Langlade-Demoyen, P. (2020). A First-in-Human Phase I Study of INVAC-1, an Optimized Human Telomerase DNA Vaccine in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 26(3), 588–597. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1614>
- Tentler, J. J., Tan, A. C., Weekes, C. D., Jimeno, A., Leong, S., Pitts, T. M., Arcaroli, J. J., Messersmith, W. A., & Eckhardt, S. G. (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 9(6), 338–350. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.61>
- Thomas, S., & Prendergast, G. C. (2016). *Chapter 43 Cancer Vaccines : A Brief Overview*. 1403, 755–761. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7>
- Thompson, C. B., & Allison, J. P. (1997). The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. In *Immunity* (Vol. 7, Issue 4, pp. 445–450). [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80366-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80366-0)
- Tiu, B. C., Zubiri, L., Iheke, J., Pahalyants, V., Theodosakis, N., Ugwu-Dike, P., Seo, J., Tang, K., Sise, M. E., Sullivan, R., Naidoo, J., Mooradian, M. J., Semenov, Y. R., & Reynolds, K. L. (2022). Real-world incidence and impact of pneumonitis in patients with lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a multi-institutional cohort study. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(6). <https://doi.org/10.1136/jitc-2022-004670>
- Tomayko, M. M., & Reynolds, C. P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 24(3), 148–154. <https://doi.org/10.1007/BF00300234>
- Tong, X., Dong, C., & Liang, S. (2024). Mucin1 as a potential molecule for cancer immunotherapy and targeted therapy. *J Cancer*, 15, 54–67. <https://doi.org/10.7150/jca.88261>
- Tran, N. H., Qiao, R., Xin, L., Chen, X., Liu, C., Zhang, X., Shan, B., Ghodsi, A., & Li, M. (2019). Deep learning enables de novo peptide sequencing from data-independent-acquisition mass spectrometry. *Nature Methods*, 16(1), 63–66. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0260-3>
- Valencia, K., Echepare, M., Teixeira, Á., Pasquier, A., Bértolo, C., Sainz, C., Tamayo, I., Picabea, B., Bosco, G., Thomas, R., Agorreta, J., López-Picazo, J. M., Frigola, J., Amat, R., Calvo, A., Felip, E., Melero, I., & Montuenga, L. M. (2022). DSTYK inhibition increases the sensitivity of lung cancer cells to T cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of Experimental Medicine*, 219(12). <https://doi.org/10.1084/jem.20220726>
- Van Der Burg, S. H., Arens, R., Ossendorp, F., Van Hall, T., & Melief, C. J. M. (2016).

- Vaccines for established cancer: Overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nature Reviews Cancer*, 16(4), 219–233. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.16>
- van Duikeren, S., Fransen, M. F., Redeker, A., Wieles, B., Platenburg, G., Krebber, W.-J., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., & Arens, R. (2012). Vaccine-Induced Effector-Memory CD8 + T Cell Responses Predict Therapeutic Efficacy against Tumors . *The Journal of Immunology*, 189(7), 3397–3403. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201540>
- Varudkar, N., Oyer, J. L., Copik, A., & Parks, G. D. (2021). Oncolytic parainfluenza virus combines with NK cells to mediate killing of infected and non-infected lung cancer cells within 3D spheroids: role of type I and type III interferon signaling. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 9(6). <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002373>
- Vishnu, P., & Tan, W. W. (2010). Update on options for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *OncoTargets and Therapy*, 3, 39–51. <https://doi.org/10.2147/ott.s5818>
- Wada, H., Noguchi, Y., Marino, M. W., Dunn, A. R., & Old, L. J. (1997). T cell functions in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12557–12561. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12557>
- Wallstabe, L., Göttlich, C., Nelke, L. C., Kühnemundt, J., Schwarz, T., Nerreter, T., Einsele, H., Walles, H., Dandekar, G., Nietzer, S. L., & Hudecek, M. (2019). ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models. *JCI Insight*, 4(18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126345>
- Wang, S., Li, Y., Liu, Z., Tian, W., Zeng, Y., Liu, J., Zhang, S., Peng, Y., & Wu, F. (2023). Efficacy and safety of first-line immune checkpoint inhibitors combined with chemotherapy for extensive-stage small cell lung cancer: A network meta-analysis. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 178, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2023.02.003>
- Wang, Y., Liu, C., Xia, Q., Wang, P., Li, B. O., Lu, Z., Sun, J., Wu, H., Yu, B., Wu, J., Yu, X., Kong, W., Zhang, H., & Cong, X. (2014). Antitumor effect of adenoviral vector prime protein boost immunity targeting the MUC1 VNTRs. *Oncology Reports*, 31(3), 1437–1444. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2950>
- Wang, Y. Q., Zhang, H. H., Liu, C. L., Xia, Q., Wu, H., Yu, X. H., & Kong, W. (2012). Correlation between auto-antibodies to survivin and MUC1 variable number Tandem repeats in colorectal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(11), 5557–5562. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.11.5557>
- Weng, Y., Shao, L., Ouyang, H., Liu, Y., Yao, J., Yang, H., Luo, Y., Wang, H., Zhao, Z., Mou, H., Zhou, Z., & Zhang, Y. (2012). A unique MUC1-2-VNTR DNA vaccine suppresses tumor growth and prolongs survival in a murine multiple myeloma model. *Oncology Reports*, 27(6), 1815–1822. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1707>
- Wilson, N. S., El-Sukkari, D., & Villadangos, J. A. (2004). Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood*, 103(6), 2187–2195. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2729>
- Wu, L., Hu, X., Tang, H., Han, Z., & Chen, Y. (2014). Valid application of western blotting. *Molecular Biology Reports*, 41(5), 3517–3520. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3215-5>

- Xi, Y., & Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, 14(10), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174>
- Xu, Y., Yuen, P. W., & Lam, J. K. W. (2014). Intranasal DNA vaccine for protection against respiratory infectious diseases: The delivery perspectives. In *Pharmaceutics* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6030378>
- Yan, Y.-D., Zhao, Y., Zhang, C., Fu, J., Su, Y.-J., Cui, X.-L., Ma, E.-L., Liu, B.-L., Gu, Z.-C., & Lin, H.-W. (2022). Toxicity spectrum of immunotherapy in advanced lung cancer: A safety analysis from clinical trials and a pharmacovigilance system. *EClinicalMedicine*, 50, 101535. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101535>
- Yang, H., Sun, B., Ma, W., Fan, L., Xu, K., Jia, Y., Xu, J., Wang, Z., & Yao, F. (2022). Multi-scale characterization of tumor-draining lymph nodes in resectable lung cancer treated with neoadjuvant immune checkpoint inhibitors. *EBioMedicine*, 84, 104265. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104265>
- Yang Lee, L. Y., Izzard, L., & Hurt, A. C. (2018). A review of DNA vaccines against influenza. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01568>
- Yang, S., Kuang, Y., Li, H., Liu, Y., Hui, X., Li, P., Jiang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Xu, A., Li, S., Liu, P., & Wu, D. (2013). Enhanced Production of Recombinant Secretory Proteins in *Pichia pastoris* by Optimizing Kex2 P1' site. *PLoS ONE*, 8(9), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075347>
- Yin, Y., Wu, C., Song, J., Wang, J., Zhang, E., Liu, H., Yang, D., Chen, X., Lu, M., & Xu, Y. (2011). DNA immunization with fusion of CTLA-4 to hepatitis B virus (HBV) core protein enhanced Th2 type responses and cleared HBV with an accelerated kinetic. *PloS One*, 6(7), e22524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022524>
- Yokosuka, T., Kobayashi, W., Takamatsu, M., Sakata-Sogawa, K., Zeng, H., Hashimoto-Tane, A., Yagita, H., Tokunaga, M., & Saito, T. (2010). Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. *Immunity*, 33(3). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.006>
- Young, P. A., Morrison, S. L., & Timmerman, J. M. (2014). Antibody-cytokine fusion proteins for treatment of cancer: engineering cytokines for improved efficacy and safety. *Seminars in Oncology*, 41(5), 623–636. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.08.002>
- Yu, Y., Zeng, D., Ou, Q., Liu, S., Li, A., Chen, Y., Lin, D., Gao, Q., Zhou, H., Liao, W., & Yao, H. (2019). Association of Survival and Immune-Related Biomarkers With Immunotherapy in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis and Individual Patient-Level Analysis. *JAMA Network Open*, 2(7), e196879. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.6879>
- Zhang, F., Li, Y., Fan, M., Jia, R., Xu, Q., Guo, J., Yu, F., & Tian, Q. (2007). Enhanced efficacy of CTLA-4 fusion anti-carries DNA vaccines in gnotobiotic hamsters. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(8), 1236–1242. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00600.x>
- Zhang, M., Fan, Y., Nie, L., Wang, G., Sun, K., & Cheng, Y. (2022). Clinical Outcomes of Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With Advanced Non-small Cell Lung Cancer and Preexisting Interstitial Lung Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *Chest*, 161(6), 1675–1686. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.12.656>
- Zhang, S., Zhang, H., Shi, H., Yu, X., Kong, W., & Li, W. (2008). Induction of immune

- response and anti-tumor activities in mice with a DNA vaccine encoding human mucin 1 variable-number tandem repeats. *Human Immunology*, 69(4–5), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.02.006>
- ZHANG, S. zi, ZHANG, H. hong, ZHANG, W., SHI, H. liang, YU, X. hui, KONG, W., & LI, W. (2008). Establishment of a Tumor-bearing Mouse Model Stably Expressing EGFP Labeled Human MUC1 VNTRs. *Chemical Research in Chinese Universities*, 24(4), 505–510. [https://doi.org/10.1016/S1005-9040\(08\)60106-3](https://doi.org/10.1016/S1005-9040(08)60106-3)
- Zhang, X., Claerhout, S., Prat, A., Dobrolecki, L. E., Petrovic, I., Lai, Q., Landis, M. D., Wiechmann, L., Schiff, R., Giuliano, M., Wong, H., Fuqua, S. W., Contreras, A., Gutierrez, C., Huang, J., Mao, S., Pavlick, A. C., Froehlich, A. M., Wu, M.-F., ... Lewis, M. T. (2013). A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Research*, 73(15), 4885–4897. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4081>
- Zhao, Y., Wei, Z., Yang, H., Li, X., Wang, Q., Wang, L., & Li, S. (2017). Enhance the anti-renca carcinoma effect of a DNA vaccine targeting G250 gene by co-expression with cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4(CTLA-4). *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 90, 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.015>
- Zhu, L., Liu, J., Zhou, G., Liu, T.-M., Dai, Y., Nie, G., & Zhao, Q. (2021). Remodeling of Tumor Microenvironment by Tumor-Targeting Nanozymes Enhances Immune Activation of CAR T Cells for Combination Therapy. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 17(43), e2102624. <https://doi.org/10.1002/smll.202102624>
- Zwaveling, S., Ferreira Mota, S. C., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G. B., Offringa, R., van der Burg, S. H., & Melief, C. J. M. (2002). Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(1), 350–358. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.350>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Ezgi DAĞ TAŞKESENLİĞİL
Doğum Tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Telefon:	
E-Posta:	
Eğitim Bilgileri	
Lise:	Erzurum Merkez Anadolu Lisesi (2011)
Lisans:	Atatürk Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2015)
Yüksek Lisans:	Atatürk Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü/Biyoteknoloji A.B.D. (2019)
Doktora	Atatürk Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü/Biyoteknoloji A.B.D. (2025)
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	Orta
Bildiriler	
- Cloning of GM-CSF gene into the pVAX1 DNA vaccine vector, 6th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2023) October 11-13, 2023, www.EurasianBioChem.org, Ezgi Dağ Taşkesenligil, Yağmur Ünver	

- Cloning of CTLA-4F2A gene into the pVAX1-GMCSF, ANKARA INTERNATIONAL CONGRESS ON SCIENTIFIC RESEARCH-IX, December 26-29, 2023, Ankara, www.ankarakongresi.org, Ezgi Dağ Taşkesenligil, Yağmur Ünver

Projeler

- Akciğer Kanserine Karşı Koruyucu ve Tedavi Edici DNA Aşı Adaylarının Geliştirilmesi, BAP, Araştırmacı, 2022-2025
- Akciğer Kanserine Karşı Geliştirilen DNA Aşı Adaylarının Fareler Üzerinde Tümöre Karşı Tedavi Edici Etkisinin Belirlenmesi, BAP, Araştırmacı, 2024-2025
- Manyetik Hipertermi uygulanmış Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptosis ve Ferroptosisin Aydınlatılması, BAP, Araştırmacı, 2023-2024

Kitap Bölümü

- Fen ve Matematik Bilimleri Teori, Güncel Araştırmalar ve Yeni Eğilimler 4, Kansere Karşı Geliştirilen Profilaktik Aşılar Bölüm V, Mart-2022, Ezgi Dağ TAŞKESENLİĞİL & Yağmur ÜNVER
- Fen Bilimleri & Matematikte Güncel Araştırmalar, Kansere Karşı Geliştirilen Terapötik Aşılar Bölüm 1, Mart-2023, Ezgi Dağ TAŞKESENLİĞİL & Yağmur ÜNVER