



**BOVİNE HERPESVİRÜS-1'İN FARKLI KANSER HÜCRE
HATLARINDA APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Melisa BEYHAN YILMAZ

1198209103

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM
DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Dilek MUZ

Tez No: 141

2022-TEKİRDAĞ



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BOVİNE HERPESVİRÜS-1'İN FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA
APOPTOTİK VE OTOFAJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melisa BEYHAN YILMAZ

1198209103

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Dilek MUZ

Bu tez Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (proje no: NKÜBAP. 10.YL.22.366).

Tez No: 141

2022 - TEKİRDAĞ

KABUL VE ONAY

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tümör Biyoloji ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Doç. Dr. Dilek MUZ danışmanlığında yürütölmüş bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

30/06/2022



Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Jüri Başkanı



Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Üye



Kafkas Üniversitesi

Üye

Tümör Biyoloji ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Melisa BEYHAN YILMAZ'ın "*Bovine herpesvirüs-1*'in Farklı Kanser Hücre Hatlarında Apoptotik ve Otofajik Etkilerinin Araştırılması" başlıklı tezi 30/06/2022 günü saat 11:00'da Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliđi'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Ben manevi miras olarak hiçbir nas-ı katı, hiçbir dogma, hiçbir donmuş, kalıplaşmış kural bırakmıyorum. Benim manevi mirasım ilim ve akıldır. Benden sonra, beni benimsemek isteyenler, bu temel mihver üzerinde akıl ve ilmin rehberliğini kabul ederlerse, manevi mirasçılarım olurlar.

Mustafa Kemal Atatürk

Üç yıl süren yüksek lisans eğitimimi tezim ile sonuçlandırmanın gururunu yaşamaktayım. Bu süreçte akademik her konuda yol gösteren sayın Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Burhan TURGUT'a, eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım bölüm hocalarım sayın Doç. Dr. Bahadır BATAR'a, sayın Dr. Öğr. Üyesi Berna ERDAL'a, sayın Dr. Öğr. Üyesi Elif POLAT'a, sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevil KARABAĞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül İSAL ARSLAN'a ve yüksek lisans eğitimim boyunca hem manevi hem de akademik anlamda destekleri, bu yolda başarabileceğimi olan inancı ve tüm bilgi birikimini bana aktarmaya çalışarak sabırlı, etik, ve mesleğine aşık bir öğrenci olmam için uğraşan aynı zamanda hem bir öğretmen hem de bir bilim insanı olarak örnek alınması gerektiğine inandığım sayın danışman hocam Doç. Dr. Dilek MUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bilime olan sevgime inanan ve beni bu yolda hep destekleyen canım annem Melahat BEYHAN'a, babam İrfan BEYHAN'a, abim Ufuk BEYHAN'a, kız kardeşim Deniz BEYHAN'a, arkadaşlarım Deniz KILIÇASLAN'a ve Tuğçe TEKİN'e, hayatım boyunca her zorlukta hep yanımda olup ellerimi bırakmayan biricik eşim Mehmet Ali YILMAZ'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: NKÜBAP. 10.YL.22.366).

Melisa BEYHAN YILMAZ

2022-Haziran

ÖZET

Beyhan-Yılmaz, M. *Bovine herpesvirüs-1*'in Farklı Kanser Hücre Hatlarında Apoptotik ve Otofajik Etkilerinin Araştırılması, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2022. Kanser tedavisinde viroterapi olarak adlandırılan, onkolitik virüslerin kanser hücrelerin yıkımı için kullanımı kanser tedavisinde alternatif bir yol olarak önerilmektedir. Onkolitik virüs, seçici olarak kanser hücrelerinde lizise, apoptozise neden olmakta ve immün sistem hücrelerini uyatarak immünoterapiye katkı de sunmaktadır. Çok sayıda virüs bu amaçla aday gösterilirken avantaj ve dezavantajları tüm detaylarıyla yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Yapılan araştırmalarda farklı türlerde patojen olan hastalık etkeni vahşi virüs adaylarının seçilmesi, genetik yapıları üzerinde değişiklikler yapılarak rekombinant formlarının oluşturulması ve kullanımı süreçleri sonrasında bazı virüsleri onkolitik etkisinin önemli olduğunu göstermiştir. Projede önerilen BHV-1 patojen olarak hastalık meydana getirdiği konağı sığırdır. İnsanlarda herhangi bir hastalık etkeni olarak tanımlanmamıştır. Son yıllarda BHV-1 üzerine yapılan bazı araştırmalarda onkolitik potansiyelinin olabileceği önerilmektedir. Bu çalışmada, sığırlarda patojen olan *Bovine herpesvirus-1* (BHV-1) 'in farklı kanser hücre hatlarında neden olabileceği ölüm yollarından apoptotik ve otofajik onkolitik etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231), akciğer hücre hattı (A549), prostat kanseri hücre hatları (DU145 ve PC3) ve servix kanseri hücre hattı (Hela)'nda yapılacak apoptotik ve otofajik yollar araştırıldı. Hücre hatları farklı titrelerdeki birüs enfeksiyonuna ve zamana bağlı değişiklikler değerlendirildi. Virüsü enfeksiyonuna bağlı miktar ve zamana bağlı hücre kayıplarının arttığı, apoptotik hücre sayısının arttığı tespit edildi. Enfekte hücrelerde bazı markırların (BCL-2, ATG7, p62, kaspaz-8 ve kaspaz-9) ekspresyon seviyesinin zamana ve doza bağlı olarak değiştiği değerlendirildi. Bu kanser hücrelerindeki ölüm mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla daha fazla apoptotik markırların ve otofajik markırların kullanılması ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: BHV-1, apoptozis, otofaji, onkolitik virüs

Destekleyen Kurumlar: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

ABSTRACT

Beyhan-Yılmaz, M. Investigation of Apoptotic and Autophagic Effects of Bovine Herpesvirus-1 in Different Cancer Cell Lines, Tekirdağ Namık Kemal University Institute of Health Sciences, Department of Tumor Biology and Immunology Master's Thesis, Tekirdağ, 2022. The use of oncolytic viruses for the destruction of cancer cells, called virotherapy in cancer treatment, is recommended as an alternative way in cancer treatment. Oncolytic virus selectively causes lysis and apoptosis in cancer cells and contributes to immunotherapy by stimulating immune system cells. While many viruses are nominated for this purpose, their advantages and disadvantages are intensively researched in all details. Studies have shown that the oncolytic effect of some viruses is important after the selection of wild virus candidates that are pathogenic in different species, the creation and use of recombinant forms by making changes on their genetic structures. The BHV-1 pathogen proposed in the project is the bovine host. It has not been identified as a disease agent in humans. In recent years, some studies on BHV-1 have suggested that it may have oncolytic potential. In this study, it was aimed to investigate the apoptotic and autophagic oncolytic effects of bovine herpesvirus-1 (BHV-1), which is a pathogen in cattle, in different cancer cell lines. For this purpose, apoptotic and autophagic pathways in breast cancer cell line (MDA-MB-231), lung cell line (A549), prostate cancer cell lines (DU145 and PC3) and cervical cancer cell line (Hela) were investigated. Cell lines with different titers of infection and time-dependent changes were evaluated. It was determined that the amount and time-dependent cell losses increased due to virus infection, and the number of apoptotic cells increased. It was evaluated that the expression level of some markers (BCL-2, ATG7, p62, caspase-8 and caspase-9) in infected cells changed depending on time and dose. There is a need to use more apoptotic and autophagic markers to elucidate the death mechanisms in these cancer cells.

Keywords: BHV-1, apoptosis, autophagy, oncolytic virus

Supporting Institutions: Tekirdağ Namık Kemal University Scientific Research Projects Coordination Unit



Bu tezi aileme ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
TABLolar DİZİNİ	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tümör İmmünolojisi	4
2.1.1. Tümör Mikroçevresindeki Hücreler	4
2.1.2. İmmün Gözetim	7
2.2. Kanserde Tedavi Yöntemleri	9
2.2.1. Onkolitik Virüsler ve Viroterapi	9
3. MATERYAL VE METOT	44
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	44
3.2. Uygulanan Yöntemler	46
3.2.1. Hücreler ve virüsler	46
3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	47
3.2.3. Mikrotitrasyon Testi ve Plak Titrasyon Testi	49
3.2.4. Plak Titrasyon Testi	50
3.2.5. Virüsün Kanser Hücrelerine İnokülasyonu	51
3.2.6. Hücre Canlılığı Testi	52
3.2.8. ELISA Testleri	56
3.2.9. İstatistiksel Analiz	58

4. BULGULAR.....	59
4.1. Kanser Hücrelerinde Virüs Üremesi.....	59
4.2. MTT Testinin Sonuçları.....	81
4.3. Akridin Turuncusu/Etidyum Bromür Boyaması İle Apoptotik Hücrelerin Saptanması.....	87
4.4. ELISA Test Sonuçları.....	93
5. TARTIŞMA.....	98
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	105
KAYNAKLAR.....	107

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- 100DKID₅₀**: Enfekte Hücre Kültürünün Tamamında Enfeksiyon Oluşturan Virüs Sulandırma Oranı
- 293T**: Embriyonik Böbrek Hücreleri
- A549**: Akciğer Kanseri Hücre Hattı
- ACE**: Angiotensin-Converting Enzyme
- AIDS**: Acquired Immune Deficiency Syndrome
- AIF**: Apoptoz İndükleyici Faktör
- AMPK**: 5'-Adenozin Monofosfat (AMP) İle Aktive Edilmiş Protein Kinaz
- AO/EtBr**: Akridin turuncusu/Etidyum bromür
- APAF-1**: Apoptoz İlişkili Proteaz Aktive Eden Faktör 1
- ATGs**: Otofaji İle İlişkili Proteinler
- ATP**: Adenosine Triphosphate
- BAK**: BCL-2 Homoloğu Antagonist/Katil
- B-ALL**: Prekürsör B Lenfoblastik Lösemi
- BAX**: BCL-2 Bağlantılı Ölüm İndükleyici
- BCIC**: Meme Kanseri Kök Hücresi
- BCL-2**: B Hücreli Lenfoma-2
- BCL-XL**: Ekstra Büyük B Hücreli Lenfoma Proteini
- BHV-1**: Bovine herpesvirus-1
- BID**: BH3 Etki Alanı İle Etkileşen Ölüm Agonisti
- BOS-1**: TAM'ları Tümör Bölgesine Göç Ettiren Kanser Hücreleri Tarafından Salgılanan Koloni Uyarıcı Faktör
- Ca⁺²**: Kalsiyum
- CAD**: Kaspaz Tarafından Aktive Edilmiş DNAaz
- CAF**: Kanserle İlişkili Fibroblastlar
- CARD**: Kaspaz Aktivasyon ve Toplama Bölgesi
- CAR-T**: Kimerik Antijen Reseptörü
- CAV**: Chicken Anemia Virus
- CDs**: Yüzey Farklılaşma Antijenleri

CMA: Şaperon Aracılı Otofaji

COOH: Karboksil Grubu

CPE: Sitopatik Etki

CXCL₁₃: Kemokin Ligandı 13

Cyt-C: Sitokrom C

dATP: Deoksiadenozin Trifosfat

DC: Dendritik Hücre (Dendritic Cell)

DD: Ölüm Domaini (Death Domain)

DISC: Ölüm Tetikleyen İletici Kompleks

DKID₅₀: Enfekte Hücre Kültürünün En Az Yarısında Enfeksiyon Oluşturan Virüs Sulandırma Oranı

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Dülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DRs: Ölüm Reseptörleri

DU-145: Androjen-duyarlı prostat kanser hücreleri

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMA: Avrupa İlaç Ajansı

EMT: Epitelyal Mezenşimel Geçiş

ER: Endoplazmik Retikulum

FADD: FAS İlişkili Ölüm Bölgesi

FAS-L: FAS Ligandı

FBS: Fetal Dana Serum

FDA: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi

FOXP3: Transkripsiyon Faktörü

GMCSF: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

GRASP65: 65 kDa'luk Golgi Birleştirici Protein 1

Gs: Glikoproteinler

Hela: Servikal kanser hücreleri
HEp-2: İnsan Epidermoid Larinks Karsinom
HMGB₁: Yüksek Mobilite Grup Kutusu 1
HSC70: Isı Şok Proteini 70
HSP: Isı Şok Proteini
HSVs: Herpes Simpleks Virüsler
ICAD: Kaspaz Tarafından Etkinleştirilen DNAaz İnhibitörü
IFNs: İnterferonlar
IFN- γ : İnterferon-gamma
IKK: KB Kinaz İnhibitörü
ILs: İnterlökinler
IMRT: Yoğunluk Modülasyonlu radyasyon tedavisi
iDC: İmmatür Dendritik Hücre
JAK-STAT: Janus Kinaz/Sinyal Dönüştürücüleri ve Transkripsiyon
JNK: C-jun N-ucu Kinazı
KB: İnsan ağız epidermoid karsinoma hücreleri
LAMPs: Lizozomal İlişkili Zar Proteinleri
LC3: Mikrotübül İle İlişkili Protein 1A/1B-Hafif Zincir 3
LT:Litre
M_{1/2}: Makrofaj Tipleri
MAPK: Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MCF-7: Meme kanseri hücre hattı
MDA-MB-231: Meme Kanseri Hücre Hattı
MDBK: Sığır Böbrek Hücre Hattı
MDM2: E3 Protein Ubikuitin Ligaz
MDSC: Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler
MHC: Major Histocompatibility Complex
miRNA: Mikro RNA
ML:Mililitre
MOMP: Mitokondriyal Dış Zar Geçirgenliği
mRNA: Mesenger RNA
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

- mTORC1:** mTOR kompleksi-1
- MTT:** 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
- MV:** Measles Virüs
- N_{1/2}:** Nötrofil Tipleri
- NDV:** Newcastle hastalığı virüsü
- NF-KB:** Nükleer Faktör- Kappa B
- NGF:** Sinir Büyüme Faktörü
- NH₂:** Amino Grubu
- NK:** Doğal Öldürücü Hücre
- NKp46:** Doğal Öldürücü Hücre Reseptörü
- NKT:** Natural Killer T cell
- NOXA:** Proapoptotik protein
- P53:** Tümör İnhibe Edici Protein
- PAMP:** Patojen İlişkili Moleküler Kalıplar
- PBS:** Phosphate-buffered saline
- PC3:** Prostat Kanseri Hücre Hattı
- pDC:** Plazmasitoid Dendritik Hücre
- PDL₂:** Antijen Sunan İmmün Hücrelerin Yüzeyinde Bulunan Zar Proteinini
- PFU:** Pock Forming Unit
- PRR:** Kalıp Tanıma Reseptörü
- PSMA:** Prostata Özgü Membran Antijeni
- PTEN:** Fosfataz ve Tensin Homoloğu
- PUMA:** Apoptosizde P53 Düzenleyici Protein
- RAS:** G-Proteini Türünde Bir Proto-Onkogen ve Bunu Kodlayan Gen
- RB:** Retinoblastoma
- RNA:** Ribonükleik Asit
- ROCK1:** Rho İlişkili Protein Kinaz 1
- ROS:** Reaktif Oksijen Türleri
- RPM:** Rotor per minute
- SMAC:** Mitokondri Kökenli İkinci Kaspaz Aktivatörü
- SNAREs:** Veziküler Füzyon Sürecini Yöneten Proteinleri
- TA:** Tümör Antijenleri

TAM: Tümörle İlgili Makrofajlar

TfR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

TGF- β : Transforming Growth Faktör Beta

THs: Yardımcı T hücreleri

TK: Timidin Kinaz

TNF: Tümör Nekroz Faktör

TNFR: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü

TNFR1: Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü

TNF- α : Tümör Nekroz Faktörü- α

TRADD: TNF-R1 İlişkili Ölüm Bölgesi

TRAIL: TNF-Bağlantılı Apoptoz Tetikleyen Ligand

TRAIL-Rs: TNF-Bağlantılı Apoptoz Tetikleyen Ligand Reseptörleri

TREG: Düzenleyici T hücreleri

TSA: Tümöre Spesifik Antijen

TTA: Tümörle İlişkili Antijen

T-VEC: Talimogene laherparepvec

UV: Ultraviyole

UVRAG: UV Radyasyon Direnci İle İlişkili Gen Proteini

VISTA: T Hücre Aktivasyonunun V-Domain İmmunoglobulin Baskılayıcısı

VSV: Veziküler Stomatitis Virus

μ l: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2-1 Onkolitik virüsler tarafından lokal ve sistemik anti-tümör bağışıklığının uyarılması	11
Şekil 2-2 A) BHV-1 genomunun organizasyonu. B) BHV-1'in viral yapısı	14
Şekil 2-3 BHV-1'in yaşam döngüsü	17
Şekil 2-4 Onkolitik virüs olarak BHV-1'in özellikleri	18
Şekil 2-5 Apoptozis, iki ana alternatif yolla çalışır: ölüm reseptörü aracılı (veya ekstrinsik) ve mitokondriye bağımlı (veya intrinsik)	23
Şekil 2-6 Dışsal yolak	25
Şekil 2-7 Fas kaynaklı apoptotik sinyal yolu	27
Şekil 2-8 TNF ile indüklenen hücre ölümü sinyali.	29
Şekil 2-9 Apoptozisün mitokondriyal kontrolü.	31
Şekil 2-10 Efektör kaspazların apoptozisdeki rolleri.	33
Şekil 2-11 Kaspaz-8'in apoptozis de rolü	34
Şekil 2-12 Apoptozom oluşumu ve kaspaz-9 aktivasyonu.	35
Şekil 2-13 Apoptozun BCL-2 ailesi tarafından düzenlenmesi.	36
Şekil 2-14 Memeli apoptozomunun oluşumu	37
Şekil 2-15 P53'ün apoptozisdaki rolleri	39
Şekil 2-16 Memelilerde otofaji mekanizmalarının şematik gösterimi	42
Şekil 3-1 Thoma lamı ile hücre sayımı.	48
Şekil 3-2 Virüs titresini hesaplamak için virüslerin sulandırılması.	50
Şekil 3-3 MTT yönteminde MTT solüsyonu ve DMSO uygulamasında hücreler arası renk farklılıklarına bir örnek.	53
Şekil 3-4 MTT uygulamasının 96 gözlü pleyttteki deney düzeneği	54
Şekil 3-5 AO/EtBr boyamasının 96 gözlü pleyttteki deney düzeneği	55
Şekil 3-6 ELISA testlerinin uygulama düzeneği.	58
Şekil 4-1 BHV-1 cooper (referans) suşunun MDBK hücresinde üremesi.	60
Şekil 4-2 96 gözlü pleytlerde uygulanan plak testi sonuçları.	61
Şekil 4-3 A549 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 24.saat mikroskop görüntüleri	62
Şekil 4-4 A549 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonun 30.saat mikroskop görüntüleri.	63
Şekil 4-5 A549 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 enfeksiyonunun 48.saat sonrası mikroskop görüntüleri.	64
Şekil 4-6 A549 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 72.saat mikroskop görüntüleri.	65
Şekil 4-7 DU145 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun mikroskop görüntüleri.	66
Şekil 4-8 DU145 hücre hattının farklı dozlarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 30.saat mikroskop görüntüleri.	67

Şekil 4-9 DU145 hücre hattının farklı sulandırmalardaki BHV-1 ile enfeksiyonunun 48.saatten sonraki mikroskop görüntüleri.	68
Şekil 4-10 DU145 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 72.saate mikroskop görüntüleri.	69
Şekil 4-11 Hela hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 24.saate mikroskop görüntüleri.	70
Şekil 4-12 Hela hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 48.saatten sonraki mikroskop görüntüleri.	71
Şekil 4-13 Hela hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 72.saate mikroskop görüntüleri.	72
Şekil 4-14 PC3 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 24.saate mikroskop görüntüleri.	73
Şekil 4-15 PC3 hücrelerinde farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 30.saate mikroskop görüntüleri.	74
Şekil 4-16 PC3 hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 48.saatten sonraki mikroskop görüntüleri.	75
Şekil 4-17 PC3 hücrelerinde farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 72.saate mikroskop görüntüleri.	76
Şekil 4-18 MDA-MB-231 hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 16.saate mikroskop görüntüleri.	77
Şekil 4-19 MDA-MB-231 hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 24.saate mikroskop görüntüleri.	78
Şekil 4-20 MDA-MB-231 hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 48.saate mikroskop görüntüleri.	79
Şekil 4-21 MDA-MB-231 hücrelerinde farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunun 72.saate mikroskop görüntüleri.	80
Şekil 4-22 BHV-1 ile enfekte MDBK hücrelerinde zamana ve virüs dozuna bağlı olarak hücre canlılığının MTT testiyle belirlenmesi.	81
Şekil 4-23 MDBK hücre hattının BHV-1'in farklı sulandırmalarla enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisiteyi gösteren grafik.	82
Şekil 4-24 Hela hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisiteyi gösteren grafik.	83
Şekil 4-25 MDA-MB-231 hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisiteyi gösteren grafik.	84
Şekil 4-26 PC3 hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisiteyi gösteren grafik.	85
Şekil 4-27 DU145 hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisiteyi gösteren grafik.	86
Şekil 4-28 A549 hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisiteyi gösteren grafik.	87
Şekil 4-29 BHV-1 ile enfekte DU-145 hücrelerinde AO/EtBr boyamasının görüntüsü.	88

Şekil 4- 30 BHV-1 ile enfekte MDA-MB-231 hücrelerinde virüs titresi ve zamana bağlı AO/EtBr boyamasının görüntüsü.	89
Şekil 4-31 BHV-1 ile enfekte Hela hücrelerinde virüs titresi ve zamana bağlı AO/EtBr boyamasının görüntüsü.	91
Şekil 4- 32 BHV-1 ile enfekte PC-3 hücrelerinde virüs titresi ve zamana bağlı AO/EtBr boyamasının görüntüsü.	92
Şekil 4- 33 BHV-1 ile enfekte A549 hücrelerinde virüs titresi ve zamana bağlı AO/EtBr boyamasının görüntüsü.....	93
Şekil 4- 34 BCL-2 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.	94
Şekil 4- 35 Kaspaz-9 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.	94
Şekil 4- 36 p62 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri. ...	95
Şekil 4- 37 ATG7 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.	95
Şekil 4- 38 Kaspaz-8 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.	96

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2-1 BHV-1'in önemli proteinleri ve bu proteinlerin işlevleri.....	15
Tablo 3-1 Tez çalışması boyunca kullanılan cihazlar ve markaları.....	45
Tablo 3-2 Çalışmada kullanılan kanser hücreleri ve özellikleri.....	47



1. GİRİŞ

Kanser dünya çapında ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. GLOBOCAN'ın verilerine göre 2020 yılında 10 milyon insan kanser nedeni ile hayatını kaybetmiştir (Sung ve diğ. 2021). Kanser, insan genomunda görülen mutasyonların hücre fonksiyonlarında değişikliklere neden olmasıyla meydana gelmektedir (Trafialek ve Kolanowski 2014; Cumberbatch 2015). Kanserleşmiş hücreler, sağlıklı hücrelerin aksine üst üste bir dizilim göstererek hücre ilişkilerini bozarak önemli genlerin inaktive olmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte hücre döngüsünde anormal proliferasyon meydana gelir (Alberghina ve diğ. 2012). Sağlıklı hücrelerde hücre bölünmesi ve hücre büyümesinden sorumlu proto-onkogenler, genetik mutasyonlar sayesinde onkogenlere dönüşerek kanserli hücrelerin daha hızlı bir şekilde büyüüp çoğalmasını sağlar. Hücrelerde tümör baskılayıcı genlerin yokluğu da kanserleşmiş hücrenin kontrolsüz çoğalmasına katkı sunar. Bu sebeple kanserleşmiş hücreler, hücrelerin onarım mekanizmalarından kurtularak başka dokulara (kan dolaşımı yoluyla) metastaz yapabilmektedir. Yine kanserleşmiş hücreler immünseleksiyon, immün tanıma için gerekli moleküllerin kaybı, T hücre cevabının olmaması, immün yanıtların baskılanması, antijenin maskelenmesi ve lenfosit adezyonu için gerekli moleküllerin kaybı gibi yollar ile immün sistemden kaçmaktadır. Epigenetik faktörler de kanserleşmede önemlidir, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları gibi mekanizmalar da kanser oluşumunda önemli rollere sahiptirler (Portela ve Esteller 2010; Sharma ve diğ. 2010).

Günümüzde kanser tedavisi için cerrahi operasyon, kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedaviler, sitokin tedavisi, antianjiyogenik tedavi, immünoterapi, CAR-T hücre terapisi gibi birçok tedavi yöntemi kullanılmıştır. Bu tedavi yöntemleri arasında dikkat çekenlerden biri de terapötik faydaları yapılan çalışmalarla ortaya konulan viroterapidir (Kelly ve Russell 2007; Toth ve diğ. 2010). Onkolitik viroterapi, kanser hücrelerini öldürmek için kendini kopyalayabilen virüslerin kullanıldığı tedavi türüdür. Ancak her virüs bu tedavi için uygun değildir. Onkolitik virüsler, kanser hücresi için patojenik olmaları, kanserli hücreleri spesifik hedefleyebilmeleri, hedefledikleri kanser hücrelerini öldürebilmeleri ve genetik mühendisliğiyle değiştirilerek anti-kanser faktörleri ifade edebilir hale getirebilmeleri

gibi özellikleri bulunur (Russell ve diğ. 2012; Maroun ve diğ. 2017). Birçok onkolitik viroterapide kullanılacak virüsler keşfedilmiş olsa da hala birçok virüs viroterapide kullanılması için keşfedilmeyi beklemektedir. Bu tedavinin prensibi virüslerin kendi mekanizmalarıyla ya da genetik mühendisliğiyle virüsün genomunda yapılacak değişiklikler ile sağlıklı hücelere zarar vermeden sadece kanserli hücreleri hedef alarak enfekte ederek bu hücreleri öldürme yeteğine dayanır (Cervantes-Garcia ve diğ. 2008). Onkolitik virüsler, tümör hücrelerini direkt olarak öldürebilen virüslerdir. Bu virüsler sahip oldukları nükleik asit tipine bağlı olarak DNA virüsleri ve RNA virüsleri olmak üzere ikiye ayrılır (Bommareddy ve diğ. 2018).

Onkolitik virüs aracılı kanser tedavisi üç önemli mekanizma üzerinden işler. Bu mekanizmalardan ilki onkolitik virüslerin tümörlü alandaki kanser hücreleri ve endotel hücreleri direkt enfekte edebilmeleridir. İkinci mekanizma Kanser hücrelerini otofaji, nekroptozis, apoptozis gibi hücre ölümüne zorlamalarıdır. Üçüncü mekanizma ise, immün sistemden kaçarak hayatta kalan kanser hücrelerine sitotoksik etki göstermeleridir (Breitbach ve diğ. 2007; Breitbach ve diğ. 2013). Kanser viroterapisinde birkaç vahşi tip onkolitik virüs kullanıldı. Bunlar arasında bir de insan virüsü olan Reovirüs bulunmaktadır. Reovirüs dışında çocuk felci virüsü olarak bilinen Coxsackievirüs, konakçısı kanatlılar olan Newcastle hastalığı virüsü, konakçısı böcekler, atlar, inekler ve domuzlar olan Veziküler stomatit virüsü (VSV) ve konakçısı sıçanlar olan Parvovirüs H1 gibi virüsler bulunmaktadır (Danthi ve diğ. 2010; Errington ve diğ. 2008; Au ve diğ. 2011; Zamarin ve Palese 2012; Lichty ve diğ. 2004).

Bovine herpesvirüs-1 (BHV-1) sığırlarda üst solunum yolu enfeksiyonu ve genital sistem enfeksiyonları ile karakterize hastalıklara neden olur. Virüsün konaktaki kuluçka süresi 8-16 gün aralığındadır. Konağa giriş yapan BHV-1 nazal epitelle yerleşir ve burada primer çoğalmasını tamamlar. Nazal epitellerden ayrılan virüsler nazofarenkstekki trigeminal sinirin duyuşal akson terminallerine ilerler. BHV-1'in nükleokapsidi trigeminal ganglionu geçer. Buraya yerleşen virüs immün sistem yanıtını geciktirir. Viral enfeksiyon beraberinde genital sistem hastalıkları, üreme bozuklukları, abortlara neden olmaktadır. BHV-1 sığırlarda, immün sistem inhibisyonunun neden olur. Bu inhibisyon CD4⁺ hücrelerin azalışına ve apoptozise

neden olmaktadır (Hushur ve diğ. 2004; Rodrigues ve diğ. 2010; Kampa ve diğ. 2004; Prysliak ve diğ. 2011). Bu virüs sağlıklı insan hücrelerine giriş için gerekli ligand/reseptörleri bulundurmadiğından sağlıklı insan hücrelerini enfekte edememektedir. Ancak konak hücresinde neden olduğu hücre ölümleri ve aynı genusta yer alan ilk onkolitik virüslerden olan *İnsan herpesvirüs-1* ve *İnsan herpesvirüs-2* ile yapıları benzediği için bu virüsün onkolitik viroterapi için aday virüs olarak görülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda özellikle akciğer kanserinde BHV-1'in enfeksiyonunun gerçekleştiği ancak sağlıklı insan hücrelerinde enfeksiyonun gerçekleşmediği gösterilmiştir. Bunun en önemli sebeplerinden biri sadece kanser hücreleri yüzeyinde eksprese olan bazı reseptörlere ligand bağlayabilmesidir. Bununla birlikte BHV-1'in kanser hücrelerini enfekte edebildiği gösterildi fakat hangi hücre yolaklarını kullanarak kanser hücrelerini ölüme zorladığı henüz aydınlatılamamıştır (Geraghty ve diğ. 1998; Campadelli-Fiume ve diğ. 2000; Winkler ve diğ. 1999).

Bu tez çalışmasında, sığırlarda patojen olan *Bovine herpesvirüs-1*'in (BHV-1) insan kökenli akciğer, meme, prostat ve rahim ağzı kanseri hücrelerindeki onkolitik etkilerinin incelenmesi ve virüs enfeksiyonunun bağlı hücre apoptotik ve otofajik ölüm yolaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tümör İmmünolojisi

İmmün sistem, organizmaya dışarıdan giren başka bir organizmayı, proteini, partikülü ayırt edebilir ve enfekte olmuş hücelere (kendi hücrelerine) saldırarak o hücreleri yabancı organizmalardan arınmasını sağlar.

2.1.1. Tümör Mikroçevresindeki Hücreler

T Lenfositler

T lenfositler yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücreleri ve düzenleyici T hücreleri olmak üzere üç gruptan oluşur. T lenfositler adaptif anti-tümör tepkisini ortaya çıkaran hücrelerin başında gelir. T lenfositler IL-2 ve IFN γ üretimi CD4⁺ hücreleri aktive ederken CD4⁺ hücrelerde CD8⁺ hücreleri aktive ederek kanser-immüno düzenleme aşamalarından eliminasyonuna yol açar. CD4⁺ yardımcı T hücresi alt kümeleri olan Th2/17 IL4/5/13/17A/17F/21/22 sitokinlerinin üretiminden sorumludur. Bu yardımcı T hücreleri doku iltihabı ve protümörojenik etki gösterirler. Bununla birlikte CD8⁺ T hücresi periferik immün yanıtı yöneten CD25 ve FOXP₃ proteinlerinin ekspresyonunu sağlayan immün sistemin baskılanmasında görev alan düzenleyici T hücreleri (tregler) tarafından düzenlenir. Tümör mikroçevrede treglerin seviyesi diğer T lenfositlerine göre yüksektir. Treglerin ana amacı antitümör etkiyi baskılamaktır (Fridman ve diğ. 2012; Pacella ve Piconese 2019; Zhang ve diğ. 2020).

B Lenfositler

Tümör mikroçevresinde B lenfosit birikimi, tümörlü dokunun sınırına lokalize halde bulunur. Tümör sınırına lokalize olmayan B lenfositler içi boşalmış lenf düğümlerine ve üçüncül lenfoid dokulara lokalize olur. Tümör mikroçevresinde B lenfositler, hem antitümör etkisi gösterebilir hem de tümör teşvik edici olarak görev alır. Antitümör etkisin T hücrelerinin uyarılmasını artıracak etki ile gösterir. Mide, rahim ağzı, akciğer, yumurtalık vb. kanser türlerinde CD20⁺ (tümör infiltre eden) B hücreleri iyi prognoza neden olur. B lenfositin antitümör etkisine rağmen, protümör etkisine de neden olabilir. Bazı çalışmalarda CXCL₁₃ (kemokin)'lerin

toplanmasına neden olduğu B hücrelerinin lenfositler tarafından üretilen ve diğer hücreler için zehirli olan bir protein (lenfotoksin) üreterek tümörlü prostat hücrelerini teşvik ettiği gösterildi (Dilillo ve diğ. 2010; Ammirante ve diğ. 2010; Shalapur ve diğ. 2015).

NK (Doğal Öldürücü) Hücreler

NK (doğal öldürücü) hücreler, kanser hücrelerini granül salınımı ile tanı ve perforin-granzim yoluyla kanser hücrelerini öldürür. Bununla birlikte NK hücreleri sadece kanser hücrelerini direkt öldürmekle kalmaz sitokin ve kemokin üretimine de katılır. Sitokin ve kemokin üreterek, antitümör immün yanıtı tetikler. Yapılan bir çalışmada NK hücresinin NKp46 (doğal sitotoksik reseptörü) aktivasyonu ile IFN γ 'nın ekspresyonunun artmasını sağladığını ve bu artmanın fibronektin-I'in (bir polipeptide bağlanmış bir veya daha fazla karbonhidrat zincirine sahip olan bir glikoprotein) ekspresyonunu sağladığı gösterildi. Fibronektin-I, tümör hücrelerinde fazlaca eksprese edilir. Fibronektin-I'in ekspresyonunun artırılması metastatik tümör kolonisinin yayılımını önlediği kanıtlandı (Zingoni ve diğ. 2017; Glasner ve diğ. 2018; Sungur ve Murphy 2014).

Dendritik Hücreler (DC)

Dendritik hücreler, mikropla ilişkili moleküller ya da hücre hasarıyla ilgili moleküller olmadığında yani dendritik hücre sinyali almadığında immünolojik teloreans ya da baskılamayı etkilemeyen immatür halde iDC (immatür dendritik hücreler) bulunur. Dendritik hücrelere sinyal geldiğinde, MHC'ye (majör doku uygunluk kompleksi) benzer antijenler ile etkileşime girip, bu antijenleri T hücrelerine sunan miyeloid hücrelerdir. Dendritik hücreler en iyi antijen sunumu (APC) yapabilen hücrelerdir. Dendritik hücre alt tiplerinin çeşitli görevleri bulunur. Bu görevler; Dendritik hücre işleme ve antijen sunma, sitotoksik T hücre (CD8⁺) bağışıklığı ve humoral bağışıklığı aktive eden CD14⁺'lerin aktivasyonu (CD14⁺'ler DC'leri antijen sunumuna hazırlar), IFN-I'in yüksek ekspresyonunun sağlanması (IFN-I'in salgılanmasını sağlayan plazmasitoid (pDC)) (Banchereau ve Steinman 1998; Martinek ve diğ. 2019).

Makrofajlar

Tümör mikroçevresinde en çok bulunan hücreler kansere bağlı inflamasyonun düzenlenmesini sağlayan tümörle ilişkili makrofajlardır (TAM). Yapılan çalışmalar tümör mikroçevresindeki TAM'ların tümör teşvik edecek şekilde çalıştığını gösterdi. Makrofajın alt tiplerinden M₁'ler (proinflamatuvar makrofaj) IFN γ , TNF α ve yabancı partiküller gibi sitokinler tarafından yönlendirilir. M₁'ler yardımcı T hücresi-I (Th₁) yanıtını artırır. Makrofajın diğer alt tipi M₂, IL4/13 sitokinlerin salınımını takiben tümör gelişimin sağlar. M₂, T hücresi bağışıklığını engeller ve bu engelleme sonucunda da tümör gelişimine devam eder. Yapılan birçok çalışmada TAM'ların genelde hepatoselüler karsinom ve yumurtalık kanserinde T hücre bağışıklığını bloke ettiği gösterildi. TAM'lar inhibitör bir molekül olan B₇-H₄ ve VISTA (immün check-point) aracılığıyla PD-L₂'nin (T hücre aktivasyonunu inhibe eder) ekspresyonuna neden olur. Genel olarak tümör mikroçevresindeki makrofajlar tümör gelişimini teşvik eder. Ayrıca TAM'lar BOS-1 (TAM'ları tümör bölgesine göç ettiren kanser hücreleri tarafından salgılanan koloni uyarıcı faktör) salgılanmasıyla ilişkilidir. BOS-1'in salgılanması EGF'yi (epidermal büyüme faktörü) serbestlenir ve kanser hücrelerinin metastazını tetikler (Mantovani ve diğ. 2017; Murray ve diğ. 2014; Kryczek ve diğ. 2006; Sun ve Ingman 2014; Pathria ve diğ. 2019).

Nötrofiller (EU)

Nötrofiller, bağışıklık sistemine saldıran bakterilere karşı savaşan beyaz kan hücreleridir. Bu hücreler dolaşımdaki beyaz kan hücrelerin %60'ını oluşturur. Tümör mikroçevresinde nötrofillerin alt tiplerinden N₁ antitümör etkisi gösterirken, N₂ protümörojenik etkisi bulunur. Kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'lar) TGF- β salgılayarak protümörojenik nötrofillerin aktivasyonunu sağlarken, antitümörojenik nötrofillerin baskılanmasını sağlar. IL1 β salgılanması tümörle ilişkili nötrofillerin aktivasyonunu sağlar. Tümörle ilişkili nötrofiller aktive olduktan sonra NK hücrelerinin inhibisyonunu sağlar. NK hücrelerinin inhibisyonu kanser metastazını artırır (Lecot ve diğ. 2019; Fridlender ve diğ. 2009; Granot ve Joblonska 2015; Sade-Feldman ve diğ. 2016).

Kanserle İlişkili Fibroblastlar (CAF)

Kanserle ilişkili fibroblastlar, tümör mikroçevresinde en aktif rol oynayan hücrelerdir. CAF'lar EMT geçişini sağlayan TGF- β 'nın (transformasyon büyüme faktörü-beta) salınmasını sağlar. CAF'lar tümör kolonilerine mezankimal özellikler kazandırır bu da tümör kolonilerinin gelişmesini sağlar. CAF'lar IL6 salınımını teşvik eder. IL6'da CAF'ların tümör hücrelerinin immün sisteme direncini sağlayacağı iletişimi kurmasını sağlar (Biffi ve Tuveson 2018; Gascard ve Tlsty 2016).

Myeloid Kaynaklı Baskılayıcı Hücreler (MDSC)

Myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (MDSC), tümör mikroçevresinde bulunan ve tümörlü hücrenin tespitini zorlaştıran inhibitör bağışıklık hücrelerinin alt tiplerinden biridir. Myeloid kaynaklı baskılayıcı hücrelerden monositik-MDSC'ler antitümör etkileri bastırır ve immünolojik yanıtları engelleyerek metastazı teşvik eder (Epideryal-mezankimal geçişi (EMT)).

İnvazyonu tetikler ve monositik MDSC'ler de bu geçişin kontrolünü sağlar. Bununla birlikte diğer bir tip myeloid kaynaklı baskılayıcı hücrelerden granülositik-MDSC'ler EMT geçişini engeller. MDSC, koloni stimüle edici faktör'ü (CSF-1) inhibe ederek tümör infiltrasyonunu sağlar (Nagara ve diğ.2013; Holmgaard ve diğ. 2016; Sistigu ve diğ. 2017).

2.1.2. İmmün Gözetim

İmmün gözetim, bağışıklık sisteminin kanserli ya da kanser öncesi hücreleri tanınması ve invazyona başlamadan bu kanserli hücreleri yok etmektir. Tümör hücreleri immün gözetim doğru şekilde işlemesine rağmen bazı durumlarda gelişimlerine devam edebilirler. Kanser immüno-düzenleme üç aşamadan oluşur. Bu aşamalar eliminasyon, denge ve kaçıştır.

Kanser-immüno Düzenleme

Eliminasyon

Kanser-immüno düzenlemede eliminasyon, organizmada oluşan kanserli hücrelerin ortadan kaldırılması için immün sisteminin bir sürecidir. Bu süreç kanser hücrelerine doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık uyarılarını kapsar. Doğuştan gelen bağışıklıkta, makrofajlar ve kanserli doku çevresinde bulunan stromal hücreler tarafından salınan sitokinler IL-12, IFN- γ gibi inflamatuvar sitokinlerin salınmasını sağlayacak bağışıklık hücrelerini inflamatuvar alanına toplar ve bu da NK (doğal öldürücü hücreler), NKT (doğal öldürücü T hücreleri), ve sitotoksik T hücrelerini aktive eder. Aynı zamanda adaptif immün sistemde NK hücreleri dendritik hücrelerin olgunlaşp kanserli bölgeye tümör boşaltıcı lenf düğümlerine (TDLN) göçünü sağlar. NK ve makrofajlar perforin, TRAIL, ROS gibi sitotoksik mekanizmaları aktive eder. Bu mekanizmalar tümör hücrelerini apoptozise götürür. Aynı zamanda sitokin üretimine neden olur. Sitokin üretimi ayrıca hem tümör antijenleri (TA) serbestler hem de sitotoksik T hücrelerine antijen sunumu ile sonuçlanır. Serbestlenen TA'lar kendilerine özgü T lenfositlerini tümör bölgesine çeker ve anjiyogenez engellenir. T lenfositlerin apoptozise gitmeyen tümör hücrelerine saldırmasına neden olur ve kanserli hücre ölür (Smyth ve diğ. 2000; Takeda ve diğ. 2001; Zitvogel ve diğ. 2006).

Denge

Eliminasyon aşamasında kısmi temizleme olduğunda devreye denge aşaması girer. Bu evrede gelişen tümör ile bağışıklık arasında geçici bir denge oluşmasıdır. Bu süreç boyunca tümör hücreleri hareketsiz kalabilir ya da gelişmeye devam edebilir ama bu gelişim hızı yavaşlayarak olur. Denge aşaması devam ederken immün hücreler mümkün olduğunda tümör kolonilerini yok etmeye devam eder. Bu aşamada immün sistem tarafından bir baskı uygulanır. Bu baskı, tümör gelişimini immün sistem tarafından kontrol altına alındığını gösterir. Bununla birlikte immün sistemin temizleyemediği tümör kolonileri olabilir. Bu durumdaki tümör hücreleri immün sisteme direnç göstererek immün hücrelerden kaçabilir (Swann ve Smyth 2007).

Kaçış

Bu aşamada, bağışıklık hücreleri tümör gelişimini durduramaz. Tümör hücreleri invaziv ve metastatik özellik kazanmaya başlar. Kaçış aşaması beş farklı aşamada gerçekleşir. Bunlar; MHC ekspresyonunun azalması ya da T hücrelerine antijen sunumunun gerçekleşmemesi, antiapoptotik protein ekspresyonunun artarak hücre ölümünü engellemesi, antijen işleme yetersizlik, interferon sinyal yolunda meydana gelen kusurlar ve bağışıklık baskılanması için tümör mikroçevresine immün sistemi baskılayan hücrelerin göç etmesidir (Swann ve Smyth 2007; Jahangir ve diğ. 2020).

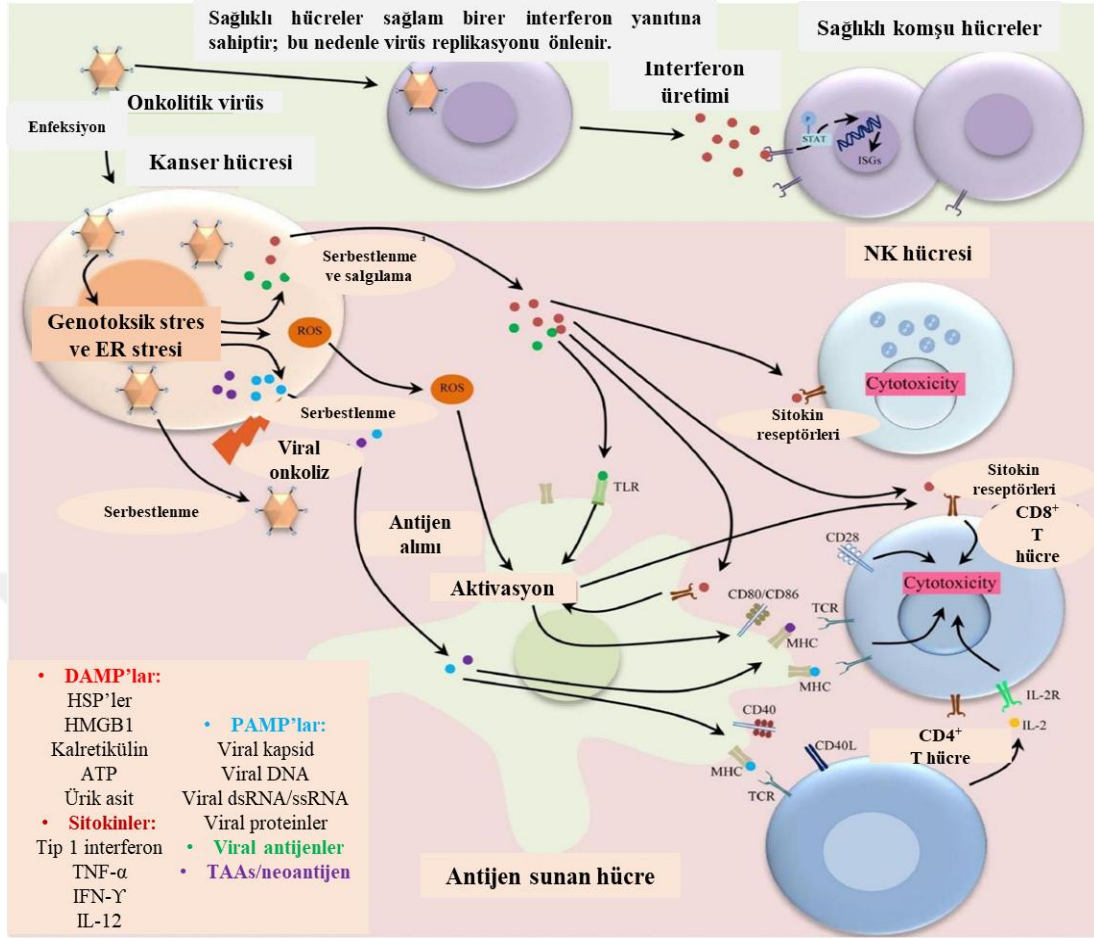
2.2. Kanserde Tedavi Yöntemleri

Dünya çapında ölümlerin en büyük nedenlerinden biri olan kanser tedavisi oldukça zor ve hastaların hayat kalitesini etkileyen bir süreci kapsar. Kanser, yüzyıllardır insanlığın uğraştığı bir hastalık olsa da modern bir hastalık olarak kabul edilir. Kanserde en büyük zorluklar yüzlerce farklı gendeki mutasyonların tümör gelişimine katkıda bulunması, metastaz, epitelial hücreleri, stromal hücreleri ve kan hücrelerini etkileyebilmesi ve kanserin stabil kalmadan sürekli yeni mutasyonlar biriktererek gelişmesidir (Duffy 2013; Zehir ve diğ. 2017). Kanser tedavisi için kanserin kökeni, lokalize olduğu bölge ve nasıl ilerlediğine göre seçilir ve farklılık gösterir. Kanser için birçok tedavi yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları, cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, gen tedavisi ve viroterapidir (Dorai ve Aggarwal 2004).

2.2.1. Onkolitik Virüsler ve Viroterapi

Viroterapi, virüslerin kanser tedavisinde terapötik olarak kullanılmasına imkan tanıyan önemli bir mekanizmadır. Evrim süreci boyunca ölümsüzleşmiş hücreler, hücre ölüm mekanizmalarına direnç gösterebilme, immün gözetimden kaçma gibi yetenekler kazandıran bir dizi mutasyon geçirir. Bu hücrelerin kazandığı yetenekler onları onkolitik virüsler için ideal hedefler haline getirebilir ve bu virüsler kanserli hücreleri enfekte etmek için, bu hücrelerin geçirdiği bir dizi mutasyona uğramış boşlukları hedef almaktadır. (Hanahan ve Weinberg 2011). Onkolitik

viroterapinin başarılı olması hem tümör hedefli olmasına hem de immün yanıtın devamlılığına bağlıdır. Onkolitik virüsler (OV), sağlıklı hücre zarlarında tutunacakları bir reseptör bulunmadığından bu hücreleri enfekte edemezken kanser hücre yüzeyinde eksprese olan birçok reseptöre (örneğin, CD46, CD54, CD55, CD155, integrinler) spesifik tutunabilirler (Russell ve diğ. 2012). JAK-STAT (Janus kinaz sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon faktörü), IFN (interferon) vb. sinyal yolları kanser hücrelerinde inhibe olabilmektedir bu da onkolitik virüslerin hücrelere tutunup girmesine ve bu hücrelerde hayatta kalmasını kolaylaştırır. Kanser hücrelerinde aktive olan onkogenlerin ve anormal protein ekspresyonu viral ekspresyonu ve bununla birlikte onkolitik aktiviteyi arttırabilmektedir. Kanser hücreleri, hücre siklusunun düzenlenmesi, hücresel proliferasyon, pro-onkogenlerin onkogenlere dönüşmesi ve tümör baskılayıcı genlerin inhibe olması gibi sebeplerden sağlıklı hücrelerden ayrılır. Bu anormallikler viral replikasyonu kolaylaştırmak için zemin hazırlar (Hanahan ve Weinberg 2011; Adair ve diğ. 2012; Elde ve diğ. 2009; Fend ve diğ. 2017; Kaufman ve diğ. 2015). Onkolitik virüsler kanser hücre yüzeyine tutunup hücre içinde yaşamını sürdürdükten sonra tümör hücrelerini parçalar ve bu parçalanma PAMP (hastalık etkenlerine eşlik eden moleküler yapılar), HSP (ısı şok proteini), HMGB1 (Yüksek mobilite grup kutusu 1) gibi DAMP'ların (hasarla ilişkili moleküler yapıları) serbestleşmesine neden olur. Bu durum NK (doğal öldürücü) hücreler ile makrofajların sitokin salgılatmasıyla sonuçlanır. Aynı zamanda tümörlü hücre lizisinden sonra TTA (tümörle ilişkili antijen) ve TSA'ların (tümöre spesifik antijen) salınması APC'ler (antijen sunan hücre) tarafından CD4⁺ hücrelere sunulmasına neden olur. CD4⁺ hücreler de adaptif bağışıklığı aktive eder ve adaptif bağışıklığın aktive edilmesi CD8⁺ hücrelerin direkt kanserleşmiş hücreleri ortadan kaldırmak için ortama toplanması ile sonuçlanır (Şekil 2.1) (Kaufman ve diğ. 2015; Felt ve diğ. 2015; Saha ve diğ. 2016; Harrington ve diğ. 2019; Kanerva ve diğ. 2013).



Şekil 2-1 Onkolitik virüsler tarafından lokal ve sistemik anti-tümör bağışıklığının uyarılması (Goradel ve diğ. 2021).

Onkolitik viroterapide ilk olarak bir *Picornavirüs* olan Rigvir (ECHO-7) kullanıldı. Rigvir ile yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar alındı ve Rigvir başta Letonya olmak üzere birçok ülkede 2004 yılında onaylanmış ilk onkolitik viroterapi ürünü olmuştur. Rigvir'den sonra ikinci olarak tasarlanan onkolitik virüs olan H101 (oncorine) 2005 yılından beri Çin'de solid tümör tedavisinde kullanılmaktadır (Alberts ve diğ. 2018). Onkolitik virüs araştırmalarının sonuçlarında elde edilen onkolitik ajanlardan biri de, GMCSF (Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör) transgenini kodlayan *İnsan herpes simplex-1* (HSV1) virüsü ile tasarlanmış onkolitik virüs Talimogene laherparepvec (T-VEC) dir. T-VEC ile yapılan klinik faz III çalışmalarında 3. ve 4. evre kanser hastalarında %19-20'lik kalıcı yanıt sağladı. Bu çalışmalar ile birlikte GMCSF onkolitik virüs olmadan kanser hastalarına deri altından enjekte edildi ve etkinliğin T-VEC'e göre düştüğü gözlemlendi. Bu sonuçlar

T-VEC'in 2015 yılında FDA tarafından onay almasına neden oldu ve böylece FDA onaylı ilk onkolitik viroterapi ürünü oldu. Bu onay ile birlikte bilim insanları viroterapinin umut vaad ettiğini düşündü ve çalışmalara hız kesmeden devam etti. Daha sonrasında yeni bir çalışma olarak pembrolizumad bir virüs ile birleştirilerek kanser hastalarına verildi ve %62-65 oranında koruyuculuk sağlandı ve tedaviyi takiben tümörlü bölgede sitotoksik T hücre göçü görüldü (Santos ve diğ. 2020; Andtbacka ve diğ. 2019; Ribas ve diğ. 2017). Aynı zamanda yapılan çalışmalarla tümörü gerilediği de gösterilen kızamık virüsü de kanser immünoterapisinde kullanıldı. Bu çalışmalardan birinde onkolitik kızamık virüsünün Burkitt lenfomayı gerilediği gösterildi (Bluming ve Ziegler 1971). Onkolitik virüsler kanser tedavisinde antitümör immün yanıtı aktive ettiği için gerçek bir immünoterapi yöntemi olmuştur.

Herpesvirüs

Herpesvirüsler, *Herpesviridae* ailesine mensup çift sarmallı DNA genomuna sahip, zarlı virüsleridir. Bu virüsler onkolitik viroterapide her zaman ilgi çekici olmuştur. Örneğin, 1988'de tasarlanan NV1020 virüsü viral genomunda ICPO (transkripsiyonel başlangıç bölgesi) ve ICP₄ (RNA polimeraz-II'nin aracılık ettiği transkripsiyon hızının düzenleyici proteini) gen bölgelerinde delesyonlar bulunur. Bununla birlikte bu virüse TK (Timidin kinaz) ekspresyonunu düzenleyen $\alpha 4$ eklenmiştir. Bu bölgenin eklenmesi bu virüsü tedavide ilaçlara duyarlı olduğu için güvenli hale getirir. Bu virüsle yapılan klinik çalışmalarda kolorektal kanserlerde (kalın bağırsakta (kolon) ve kalın bağırsağın son kısmında (rektum) görülen kanserler) metaztazı önlediği görüldü (Geevarghese ve diğ. 2010). Onkolitik virüs olarak kullanılan HSV-1 ile yapılan çalışmada Martuza ve diğ. (1991)'de insanlarda beyin veya omurilikte oluşabilen primer kötü huylu beyin tümörü olan glioblastomanın TK (timidin kinaz) bölgesinde oluşan bir mutasyonu taşıyacak şekilde tasarlanan HSV-1 tarafından glioblastoma hücrelerinin yok edilebileceği gösterildi. Bununla birlikte kanser tedavisinde sıkça HSV-1'in kullanılması için çalışmalara başlandı ve diğer bir onkolitik HSV'de, Todo ve diğ. (2001)'de tasarlanan G47 Δ 'dir. Bu onkolitik virüs üç farklı mutasyona sahiptir. HSV-G207 virüsünün $\gamma 34.5$ ve $\alpha 47$ ve ICP6 genlerinin silinip bu genler yerine *E.coli* LacZ geni

eklenir. γ 34.5 ve α 47 genleri dışında bu virüsten silinen ICP6 geni, viral DNA sentezini gerçekleştiren ribonükleotid redüktaz enziminin alt birimini kodlar. Bu virüs yoksunluğunda virüs çoğalamaz. 2015 yılında ilk FDA onaylı rekombinant HSV-1 virüsü Talimogene laherparepvec (T-VEC) tasarlandı. Talimogene laherparepvec, HSV-1 viral genlerinden γ 34.5 ve α 47 geninde delesyon sahiptir. Delesyonu sağlanan genlerden γ 34.5, HSV-1'in enfekte ettiği hücrelerde viral enfeksiyon sonrası viral proteinlerin sentezini durdurmasını önler ve bu gen yerine insan GM-CSF (Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör) geni eklenmiştir. Bu modifiye virüs sadece tümör hücrelerinde çoğalma eğilimindedir bu da bu onkolitik virüsü kanser tedavisinde güvenilir hale getirir. T-VEC'de silinmiş diğer bir gen olan α 47 geninin HSV-1'deki işlevi ise, antijen sunumunu sağlayan yüzey reseptörlerinin azalmasına neden olur. Bu gen bölgesinde delesyon oluşmasının iki önemli sonucu vardır. İlk sonuç, bu bölgedeki silinme antitümöral etkinliği artırır. İkinci sonucu ise, US11 (tagument proteininin ekspresyonunu sağlayan gen) geninin ekspresyonunun artmasıdır. Bu genin ekspresyonunun artışı tümör hücrelerinde viral replikasyonun artışına neden olur. Bu bölgeye eklenmiş GM-CSF ile yapılan çalışmalar gösteriyor ki tümör hücrelerinde antitümöral etkinliğin artması ile sonuçlanır. Yine aynı çalışmalarda tümör hücrelerinin tanıyan CD8⁺ ile CD4⁺ ve FoxP3 hücrelerde artış olduğu gözlemlendi (Barve ve diğ. 2008; Kaufman ve diğ. 2010; Andtbacka ve diğ. 2015; Coffin 2016).

HSV-1 dışında HSV-2'nin de onkolitik viroterapide kullanımı için çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalardan biri ICP₁₀ (HSV-2 ribonükleotid redüktaz) delesyonu ile tasarlanan HSV-2 virüstür (Fu ve diğ. 2007; Li ve diğ. 2007). Bu çalışmada yumurtalık kanserinde HSV-1'den daha etkin olduğu da gösterilmiştir. Diğer bir çalışma ise, Li ve diğ. (2007)'de siklofosfamidin (kemoterapötik ilaç - bağışıklık sistemini baskılar) ile kombinasyonunu içerir. Bu çalışmada virüs ve siklofosfamidin birlikte akciğer kanseri olan farelerde antitümör etkileri kanıtlanmıştır.

Bovine herpesvirüs-1 (BHV-1)

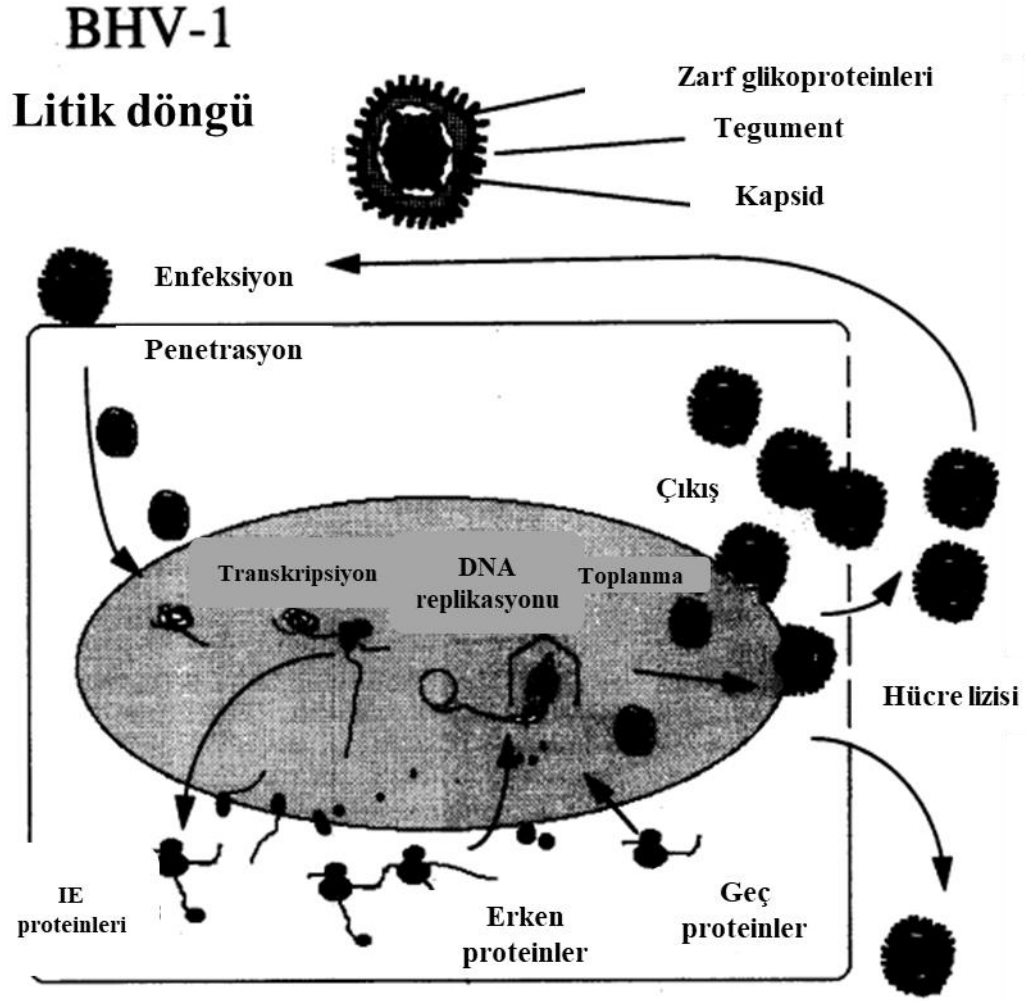
Bovine Herpesvirüs-1 Herpesviridae'nin Alphaherpesvirinae alt familyasının bir üyesi olup, sığılarda rhinotracheitis ve pnömoni gibi solunum yolları

Tablo 2-1 BHV-1'in önemli proteinleri ve bu proteinlerin işlevleri (Biswas ve diğ. 2013).

Protein Adı	Görevi
BICP4	Bazı gen promotörlerinin transaktivatörü
gB (glikoprotein gB)	Bağlanma, giriş, yayılım, füzyon
gC (glikoprotein gC)	Bağlanma
gD (glikoprotein gD)	Giriş, yayılım
gI (glikoprotein gB)	Yayılım
gH (glikoprotein gH)	Yayılım
Vhs (Konak hücrede protein sentezi durdurma)	Konak hücre protein sentezinin hızlıca durdurulması
VP16 (α TIF-alfa genlerinin dönüştürücüsü)	BHV-1 erken (IE) genlerinin transaktivatörü
BICP0	Viral promotörlerin aktivatörü
VP8	Protein kinazi; α TIF tasarımı

BHV-1 konağa giriş yaptıktan sonra, replike olabilmek için konak hücre proteinlerini kullanır ve mikrotübüller boyunca çekirdeğe aktarılır. BHV-1 nükleer zarf boyunca tomurcuklanır ve yeni virionlar zarflanır (Hunter 2001). Zarflanan virionlar hücre içi keseciklere alınır ve bu kesecikler yardımıyla sitoplazmaya geçer. Sitoplazmaya geçen virionlar buradan sitoplazma zarına geçer ve hücreden salınır (Knipe ve diğ. 2001).

Sığırlarda BHV-1 enfeksiyonu apoptozise, inflamasyon ve yüksek düzeyde virüs yayılımına sebep olur. BHV-1 gen ekspresyonu 3 farklı aşamada gerçekleşir (hemen erken (IE), erken (E) veya geç (L)). IEtu1 (hemen erken transkripsiyon ünitesi-1), viral gen ekspresyonu ve DNA replikasyonunun gerçekleşmesi için BICP0 ve BICP4 proteinlerini kodlar. IEtu2 ise, BICP22 proteinini kodlar. Bazı zarflı virüslerde viral zarfla nükleokapsit arasında bulunan ve virüse ek bir dayanıklılık sağlayan yapısal protein VP16/GTIF (tegument proteini), tegumentte bulunan ve IE promotörlerinin hedefli olarak aktivasyonunu sağlayan bir proteindir. VP16 proteini konak hücresinde bulunan hücresel proteinlerden Oct1 ve HCF-1 (transkripsiyon faktörleri) ile bağlanır ve bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks IE promotörlerindeki bazı dizilere bağlanır. Yine BHV-1 gen ekspresyonunun aşamalarından olan E (erken gen ekspresyonu) genleri BHV-1 DNA'sının replike olmasını sağlayan yapısal proteinleri kodlarken L (geç gen ekspresyonu) genleri ise, bulaşıcı virüs partiküllerini oluşmasını sağlayan proteinleri kodlar (Şekil 2.3) (Wirth ve diğ. 1991; Bratanich ve diğ. 1992; Jones 1998; Inman ve diğ. 2004; Jones 2009).

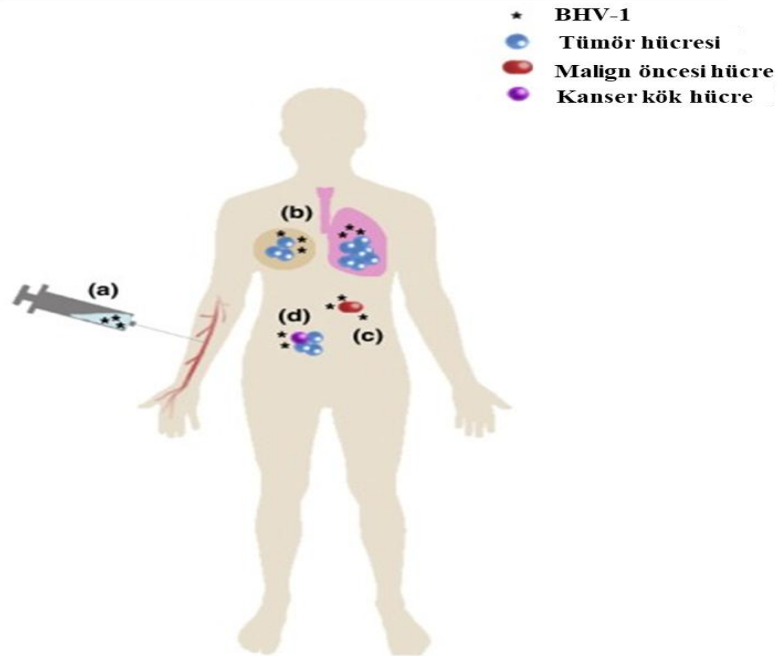


Şekil 2-3 BHV-1'in yaşam döngüsü (Turin ve diğ. 1999).

BHV-1'in Onkolitik Etkileri

BHV-1'in HSV-1 ve HSV-2 ile birçok biyolojik benzer özelliği vardır (Winkler ve diğ. 1999; Rampling ve diğ. 2000; Kemeny ve diğ. 2006). BHV-1'in yapısı ve yaşam döngüsü HSV-1'e benzer, BHV-1, HSV-1'in reseptörü olan heparan sülfat ve nektin-1'e bağlanabimesine rağmen HSV-1 ve HSV-2'nin giriş reseptörü olan nektin-2'ye bağlanamaz. Ancak insan kanser hücrelerinin yüzeyinde ekspresyonu fazla olan tümör migrasyonu ve tümör invazyonu ile ilişkili bir reseptör olan CD155'e bağlanabilir. Bu da BHV-1'in HSV-1 gibi onkolitik etki gösterebileceğini yani sağlıklı insan hücrelerini enfekte edememesine karşın insan kanser hücrelerini enfekte edebildiğini göstermektedir (Geraghty ve diğ. 1998;

Campadelli-Fiume ve diğ. 2000). Geçmiş yıllarda da BHV-1'in onkolitik etkileri olabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır. BHV-1'in onkolitik etkilerine dair ilk kanıtlara 1960'lı yılların başında yayınlanan bir raporda yer verilmiştir. Bu rapora göre BHV-1 ile enfekte edilen Hela (serviks kanseri hücresi) hücre hattı, HEp-2 (tip-I kollajenin hepasellüler karsinoma hücresi) hücre hattı ve KB (ağız epidermal karsinomu hücresi) hücre hattında sitopatik etkisi olduğu gösterilmiştir (Hammon ve diğ. 1963). Yapılan çalışmalarda insan meme kanser hücrelerini enfekte edebildiği gösterilen BHV-1'in hücrelerde gösterdiği litik etkinin diğer virüslerde olduğu gibi tip I interferon (tip I IFN) ile ilişkilendirilememiştir (Rodrigues ve diğ. 2010). Cuddington ve diğ. (2013)'in yaptığı çalışmada BHV-1'in alt tiplerinden bağımsız bir şekilde meme kanseri hücreleri ile BCIC (meme kanseri kök hücresi) hedef aldığı ve bu hücrelerin kümeleşerek çoğalmasını engellediğini gösterdi. Bununla birlikte MCF-7 hücre hattı BHV-1 ile enfekte edildiğinde tümör oluşturma kapasitesi baskılandığını ortaya koydu. Cuddington ve Mossman (2014)'in yaptığı diğer bir çalışmada ise, bazı kanser hücre hatlarını enfekte eden BHV-1'in, hücre hatlarının %72'sinde hücre canlılığını azalttığı ve BHV-1'in litik döngüsüne izin verdiği gösterildi (Şekil 2.4).



Şekil 2-4 Onkolitik virüs olarak BHV-1'in özellikleri (Cuddington ve Mossman 2014).

Adenovirüs

Adenovirüsler, *Adenoviridae* ailesine mensup zarfsız, çift sarmallı DNA virüsleridir. Viroterapide en çok kullanılan onkolitik virüslerden biridir. Onkolitik adenovirüsler, eski dönemlerden beri klinik çalışmaları yapılan virüsler arasındadır. Yapılan çalışmalarda ONYX015 virüsünden E1A ve E1B genlerinin delesyonu ile tasarlanan H101 baş boyun kanseri için Çin'de onaylandı. Bir başka çalışmada Δ 24RGD (DNX2401) (integrin bağlayıcı olarak tasarlanmış adenovirüs) apoptotik yanıtlar geliştiğini gösterdi (Yu ve Fang 2007; Jiang ve diğ. 2019).

Retrovirüs

Retrovirüsler, hücreleri lizise uğratmadan yayılım gösterir ve mitotik hücreleri enfekte edebilme yeteneğine sahiptir. Bir retrovirüs olan Toca-511 sitozin deaminazı ekspre edecek gen eklenerek tasarlandı. Toca-511'e eklenen bu gen 5-florositozini (antifungal bir ilaç) 5-florourasile (bir kanser ilacı) dönüştürür. Tasarlanan bu retrovirüsün klinik çalışmalarda hafıza T hücrelerinin neden olduğu uzun hayat süresine ve antitümör etkisine neden olduğu gösterildi. Aynı zamanda Toca-511 günümüzde malign glioma için klinik denemelere başlandı ve ilk raporlarda antitümör etkisi olduğuna dair kanıtlar sunuldu (Cloughesy ve diğ. 2016).

Measles Virüsü (MV)

Measles (kızamık) virüsü (MV), *Paramyxoviridae* ailesinin bir mensubu olup zarflı ve tek sarmallı bir RNA virüsüdür. MV nektin-4, CD150 ve CD46 reseptörlerini kullanarak konakçı hücrelere giriş sağlar. CD46 tümör hücre yüzeyindeki ekspresyon seviyeleri arttığı için MV tümör hücrelerini spesifik olarak enfekte edebilir (Anderson ve diğ. 2004). Kanserli hücreler MV tarafından oluşturulan viral enfeksiyona diğer hücrelere göre daha duyarlıdır. Bunun sebebi ise, kanserli hücrelerin kusurlu interferon sistemine sahip olmalarıdır. Onkolitik MV ile yapılan bazı çalışmalarda, nötrofiller ve dendritik hücreleri uyarak bağışıklık tepkisine yol açtığı, bununla birlikte tümörlü hücrelerde lizisi artırdığı ve antitümör bağışıklık tepkisini uyardığı gösterildi (Grote ve diğ. 2003; Guillerme ve diğ. 2013). MV onkolitik terapisinin büyük bir dezavantajı vardır. Dünya genelinde kızamık

hastalığı geçirildiği için toplum bağışıklığı kazanıldı ve bu bağışıklık nedeniyle onkolitik virüs tümör hücresine ulaşmadan immün sistem hücreleri tarafından temizlenir. Bunun üstesinden gelmek için çeşitli stratejiler uygulanır. Bunlardan şimdiye kadar en etkili olanı bu onkolitik virüsün mezenkimal kök hücre içinde organizmaya verilmesidir. Böylece virüs immün sistem hücreleri tarafından tanınmadan tümörlü dokuya ulaşabilir. Onkolitik MV'nin klinik denemelerinde yumurtalık kanser ve multipl miyelom (plazma hücresi adı verilen bir tür beyaz kan hücresinden oluşan kanser türü) vb. kanser türlerinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Mader ve diğ. 2009; Galanis ve diğ. 2010; Dispenzieri ve diğ. 2017).

Newcastle Hastalığı Virüsü (NDV)

Yapılan çalışmalarda vahşi tip Newcastle virüsünün (NDV), apoptotik yollar ile tümör hücrelerini ölüme sürüklediği gösterildi. Ancak bu virüsü kliniğe uyarlayan bir çalışma yapılmamıştır. Bununla birlikte klinik öncesi deneylerde umut vaad etmektedir (Zamarin ve Palese 2012).

Reovirüs

Reovirüs, *Reoviridae* ailesinin bir üyesi olup, zarfsız ve çift sarmallı RNA virüsüdür. Reovirüsler Ras sinyal yolağını aktivasyonunu sağlar. Bu sinyal yolağı tümör hücrelerinde yukarı regüle edilir. Realsin, reovirüsün onkolitik viroterapi için geliştirilmiş vahşi bir versiyondur. FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ve EMA (Avrupa İlaç Ajansı) Reovirüsün bir versiyonu olan Realsin'in mide, yumurtalık, pankreas kanser vb. birçok kanser türünde, yaşamı tehdit eden ya da engellilik yaratan nadir hastalıkların teşhisi, önlenmesi ya da tedavisi için kullanılan beşeri tıbbi ürünlerden biri yani yetim ilaç olarak tanımlandı (Gong ve diğ. 2016; Fukuhara ve diğ. 2016).

Vaccinia Virüsü

Vaccinia (aşı) virüsü, *Poxviridae* ailesine mensup çift sarmallı DNA virüsüdür. IFN-I (tip-I interferon) duyarlılığı sebebiyle kanser hücrelerini öldürebilme yeteneği olduğu için onkolitik viroterapide kullanılacak doğal onkolitik bir virüstdür. Onkolitik viroterapi için vaccinia virüsünün birçok avantajı vardır. Bu

avantajlardan en önemlileri yaklaşık 8 saat yaşam döngüsü, hipoksik (oksijen yoksunluğu) ortam vb. stres ortamlarında çoğalabilme yeteneğidir. Hücre zarından giriş için spesifik bir reseptörü bulunmaz bu da virüs-konak zar füzyonunu kolaylaştırır (Chung ve diğ. 1998; Puhmann ve diğ. 2000; Wang ve diğ. 2004). Bununla birlikte vaccinia virüsünün transkripsiyonu için konak hücre proteinlerine ihtiyacı yoktur ve tüm viral eylemleri stoplazmada gerçekleştirir. Vaccinia virüsünde yapılan ilk çalışmalarda TK(timidin kinaz) bölgesinde delesyona sahip versiyonu kullanılmıştır. Bu virüsün sağlıklı dokuya zarar vermemesi için yeni bir virüs tasarlandı ve bu vaccinia virüsünde F_{14.5}L ve A₅₆R genlerinde mutasyon ile tasarlanmıştır. Bu genlerden F_{14.5}L geni vaccinia virüste salgı sinyal peptidi kodlarken A₅₆R geni ise, hemaglutinin üretiminde görevlidir. Badrinath ve diğ. (2016)'de yaptıkları çalışmada JX-549, TK gen delesyonu oluşturulup, silinen gen yerine GM-CSF eklenerek tasarlandı ve klinik denemelerinde faz-I'de antitümöral aktivitesi gösterdi. Heo ve diğ. (2013)'de yaptığı çalışmada JX-549 hepatoselüler karsinomada (karaciğerin epitelial kökenli en sık görülen primer malign tümör) antitümör etkilerini kanıtladı (Hiley ve diğ. 2010; Heo ve diğ. 2013; Park ve diğ. 2015; Yaghchi ve diğ. 2015).

Veziküler Stomatit Virüsü (VSV)

Veziküler stomatit virüsünün konak seçiciliği interferon sinyalleşme yoksunluğuna bağlıdır. Tümör hücrelerinde de interferon sinyalleri yetersizdir. Onkolitik viroterapi için tasarlanan VSV aşırı interferon β eksprese edecek şekilde tasarlanmıştır. Bunun sebebi ise, normal hücreleri enfeksiyondan korurken tümör hücrelerinde immün yanıtı neden olmasıdır. Karaciğer kanseri için klinik çalışmalara devam edilmektedir (Lichty ve diğ. 2004).

Coxsackievirüs

Coxsackievirüs, Tümör dokularında güçlü immün yanıtı neden olur. Bu virüsün klinik denemelerinde vahşi bir tipi olan coxsackievirüs A21 kullanıldı ve deneyler sonucunda 3. ve 4. evre melanomlu hastalarda kanserin gerilediği bildirilmiştir (Kemball ve diğ. 2010).

Onkolitik Virüslerin Neden Olduğu Hücre Ölüm Yollarından Apoptozis ve Otofaji

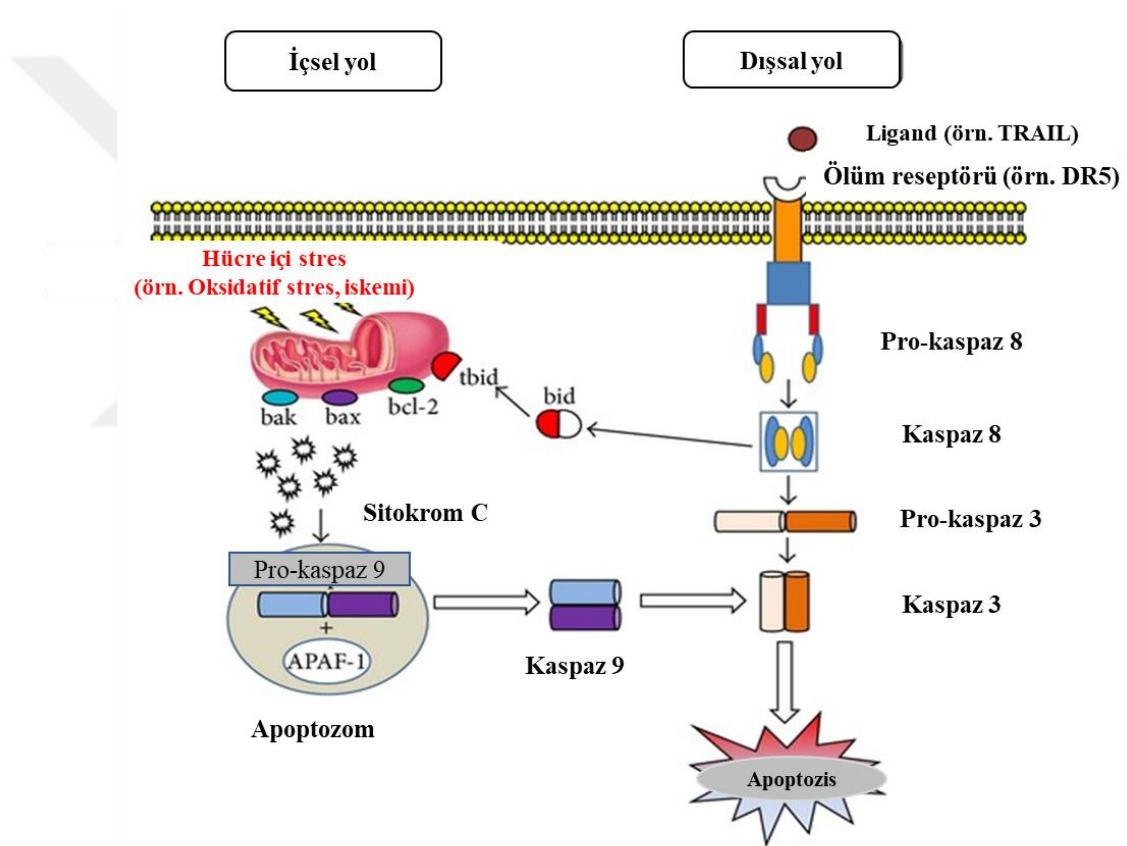
Apoptozis

Apoptozis diğer adıyla programlı hücre ölümü; hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin işleyişi, hormona bağlı atrofi (normal büyüklükteki bir organın sonradan küçülmesi), embriyonik gelişim ve kimyasala bağlı ölüm gibi süreçlerde rol oynamaktadır. Apoptotik hücreler normal hücreye göre bazı farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklardan en belirginini ışık mikroskopunda sağlıklı hücrelerde görülmeyen büzülme ve piknozun (küçülme) görülmesidir. Apoptotik hücrede büzülme gerçekleşirken hücre çekirdeği yoğunlaşır ve bu yoğunlaşmanın ardından hücre çekirdeği parçalanır (karyorrhexis). Çekirdeğin parçalanması ile birlikte apoptotik hücre komşu hücrelerden ayrılır bu olay hücrede uzantıların oluşmasına sebep olmaktadır ve daha sonra hücre apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimcikler, hücrenin paketlenmiş organellerini ve çekirdek parçalarını içeren zarla kaplı küçük cisimciklerdir (Elmore 2007; Saraste ve Pulkki 2000; Kerr ve diğ. 1994).

Apoptotik hücre zarlarında normal hücre zarında görülmeyen bir takım değişiklikler apoptotik hücreleri fagositik hücreler tarafından tanınması için önemlidir. Normal hücrede iç zarda bulunan fosfotidil serin molekülü apoptotik hücrelerde dış zara göç eder bu göç aminofosfolipid transferaz enzimi aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Bu göç sayesinde apoptotik hücreler fagositik hücreler tarafından tanınır ve makrofajlar, parankimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosit edilir ve fagolizozom içinde ortadan kaldırılır (Elmore 2007; Saraste ve Pulkki 2000; Kerr ve diğ. 1994). Apoptozis gerçekleşirken nekrozda (doğal hücre ölüm yolağı) görülen enflamasyon görülmemektedir (Saraste ve Pulkki 2000). Bunun en önemli sebepleri ise;

- Apoptotik hücrelerde hücre işçi materyal hücre dışına salınmaması,
- Komşu hücreler tarafından parçalanmaları ve
- pro-enflamatuar sitokin üretmemeleridir.

Apoptotik cisimciklerde DNA'lar 50 kb'lık parçalara bölünür. Bu işlem için kaspaz proteinleri CAD'ları (DNaz) aktifleştirilir daha sonrasında ise nükleozomal birimlerin bozunması ve DNA'nın tamamen parçalanması ile süreç devam eder. Apoptotik cisimcikler fagositik hücreler tarafından yutulduktan sonra DNaz-II enzimi tarafından DNA bozunur ve süreç tamamlanır (Nagata ve diğ. 2003; Elmore 2007). Apoptozis, hücre dışı ve hücre içi sinyaller tarafından yönlendirilen çeşitli eksentrik ve insentrik sinyaller tarafından kontrol edilir (Jan ve Chaudhry 2019). Apoptozis mekanizması iki ana süreç ile ölümü yönetir; mitokondriyal yolak ve ölüm reseptörü yolağı ile ölüm gerçekleşir (Şekil 2.5) (Green ve Llambi 2015).

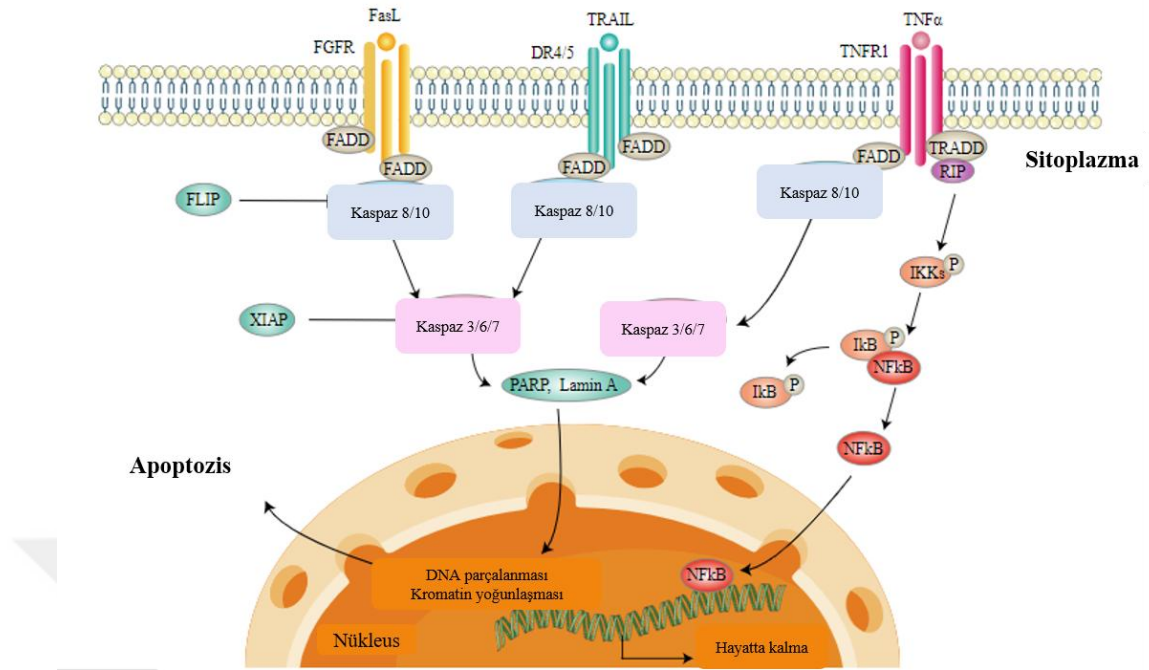


Şekil 2-5 Apoptozis, iki ana alternatif yolla çalışır: ölüm reseptörü aracılı (veya ekstrinsik) ve mitokondriye bağımlı (veya intrinsik) (Loreto ve diğ. 2014).

Dışsal Yol -Ekstrinsik Yol

Ekstrinsik yol ölüm reseptörü yolu olarak da adlandırılır. Bu yol hücre dışı uyaranlar ile tetiklenir ve ölüm reseptörlerinin ölüm ligandlarına bağlanarak başlattığı bir yoldur. Bu reseptörler Tümör nekroz faktörü (TNF) gen ailesinde yer almaktadır ve yaklaşık 20'den fazla proteinden oluşarak hücrede ölüm, sağkalım, bağışıklık regülasyonu, farklılaşma gibi hücresel olayları düzenlerler (Fulda ve Debatin 2006).

Ölüm reseptörleri, hücrenin ölüm sinyali almasını takiben bu sinyali hücre yüzeyinden hücre içine kadar ileten yaklaşık 80 amino asitlik sitoplazmik bir alan olan ölüm bölgesi adı verilen bölgeyi tanımlar. En iyi karakterize edilen ölüm reseptörleri arasında CD95 (APO-1 / Fas), TNF reseptörü 1 (TNFR1), TNF ile ilişkili apoptozisi indükleyen ligand-reseptör 1 (TRAIL-R1) ve TRAIL-R2 bulunur (Fulda ve Debatin 2006). Hücre dışı uyaranların tetiklendiği bu yolak, TNF, FAS-L (CD95L) veya TRAIL ölüm ligandlarının bir başka hücrenin zarında bulunan kendi reseptörlerine bağlanmaları ile başlatılır (Fulda ve Debatin 2006). TNF, FAS-L veya TRAIL uyaranların sitotoksik T veya NK hücrelerinin zarlarında üçlü protein yapılar olarak ifade edilmektedir. Bu uyaranlar, patojenle enfekte olmuş hücrenin zarında bulunan reseptörlerine bağlanıp ölüm kaskadını başlatırlar. Ligandların reseptörler ile etkileşime geçmesiyle birlikte reseptörlerin sitoplazmik ucunda bulunan DD (death domain) bölgeleri, adaptör protein FADD ile prokaspaz-8 proteinlerini bir araya getirip ölüm tetikleyen iletici kompleksin (death inducing signaling complex- DISC) oluşumunu sağlar. Prokaspaz-8 DISC oluşumundan sonra kesime uğrar ve kaspaz-8'e dönüşür. Bu aktivasyon olayı kaspaz -3, -6, -7'yi aktive ederek apoptozis kaskadının tamamlanmasını sağlamaktadır (Şekil 2.6) (Fulda ve Debatin 2006).



Şekil 2- 6 Dışsal yolak (Elmore 2007)

TRAIL Ölüm Ligandı

TRAIL (Apo-2L); TNF- α ve FasL (CD95) ligandlarının oluşturduğu hücre dışı uyaranların tetiklediği apoptozis yolunda görev yapan ligand ailesinin bir üyesidir. TRAIL ligandları hücre zarına lokalize olmuş olarak bulunmaktadır bununla birlikte zarda çözülmüş halde de bulunabilmektedirler. Diğer hücre dışı uyaranların hücre içine iletimini sağlayan ligandlar gibi TRAIL ligandlarında DD alanı içeren sitoplazmik uzantıları bulunmaktadır ve bu uzantılar sayesinde hücre içine sinyal iletimini sağlamaktadır (Bretz ve diğ. 1999; Jin ve diğ. 2004). TRAIL'ın TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) ve Osteoprotegerin olmak üzere beş farklı reseptörü bulunmaktadır. Bu reseptörlerden TRAIL-R1,R2 ölüme neden olan reseptörler iken TRAIL-R3, R4 ve osteoprotegerin ölüm önleyici reseptörlerdir (Jin ve diğ. 2004).

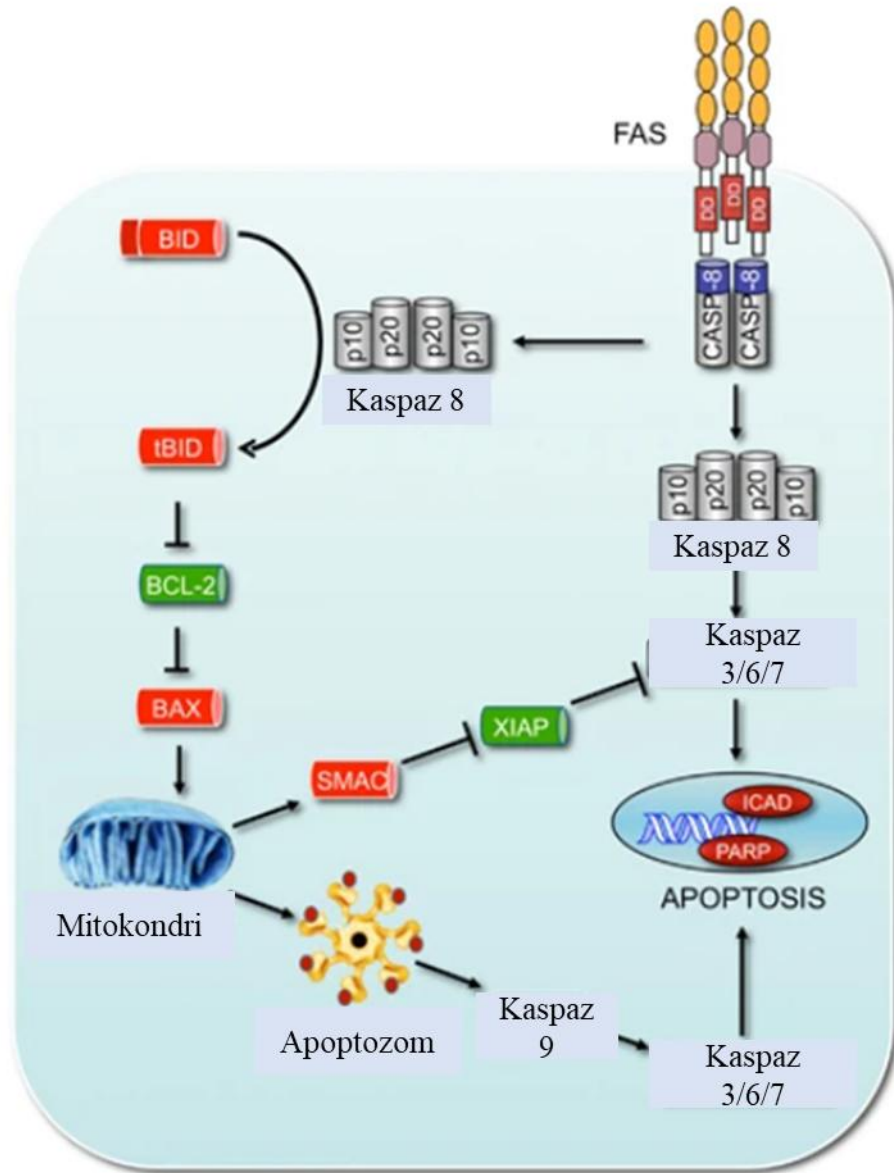
Hücreye dışarıdan gelen uyarılar ile ölüm ligandları reseptörleriyle etkileşir ve bu etkileşim sonucunda DISC oluşumu için sinyaller hücre içi ölüm alanlarına iletilir (Leblanc ve Ashkenazi 2003).

Ekstrinsik yolda, hücre dışı sinyallerin TNF benzeri ligandlar ile hücre içine iletimi sağlanır. TRAIL ligandı TRAIL reseptörlerinden DR4 ve DR5'e bağlanmasıyla apoptozis indüklenir. TRAIL'in reseptörüne bağlanması, reseptörün trimerizasyonu ve reseptörün hücre içi DD'sinin kümelenmesi ile sonuçlanır. Bu kümelenmeyi takiben ölüme neden olan kompleks (DISC) oluşumu gerçekleşir. DD'lerin trimerizasyonu, FADD'ın toplanmasına ve FADD'ın toplanması da kaspaz-8 ve -10'un bağlanması ve aktivasyonuna yol açar. Aktif kaspaz-8 ve -10 daha sonra efektör kaspaz-3'ü parçalar ve hücre ölümü gerçekleşir (Wang ve El-deirly 2003).

Fas Ölüm Ligandı (CD95-L)

CD95 ligandı olan Fas-L, birçok dokudan (dalak, timus, akciğer, testis, kalp ve ince bağırsak vb.) eksprese edilen tip-II transmembran proteinidir (Martins ve diğ. 1999). Sitotoksik T hücreleri, NK hücreleri ve monositlerin yüzeyinden eksprese edilir Fas reseptörü (CD95, APO-1) ise tip-I membran proteini olmakla birlikte sinir büyüme faktörü (NGF) ve tümör nekroz faktörü (TNF) ile aynı ailedendir (Ahmad ve diğ. 2001).

Fas reseptör-ligand etkileşi Fas'ın trimerizasyonu ve bunu takiben Fas ölüm alanı'na (FADD) sinyalin ulaşmasına neden olmaktadır (Ferrer ve diğ. 2001). FADD, DISC oluşturmak üzere kaspaz-8-10'un ASP bölgelerinden kesilmesini sağlayarak aktifleşmelerini sağlar. DISC, efektör kaspazlar olan kaspaz-3-6-7'ın proteoliz yoluyla ölüm sinyalini başlamasına neden olan kaspaz-8 ve kaspaz-10'un otokatalitik işlemesine ve aktivasyonuna aracılık eder. Fas sinyali aynı zamanda mitokondrinin membran geçirgenliğini destekleyen BİD' in ekspresyonu ile mitokondriden cytochrome c'nin salınımını takiben oluşan apoptozom adı verilen sitozolik kaspazları aktive edici kompleksin kofaktörü olarak görev yapmaktadır (Şekil 2.7) (Yamada ve diğ. 2017).



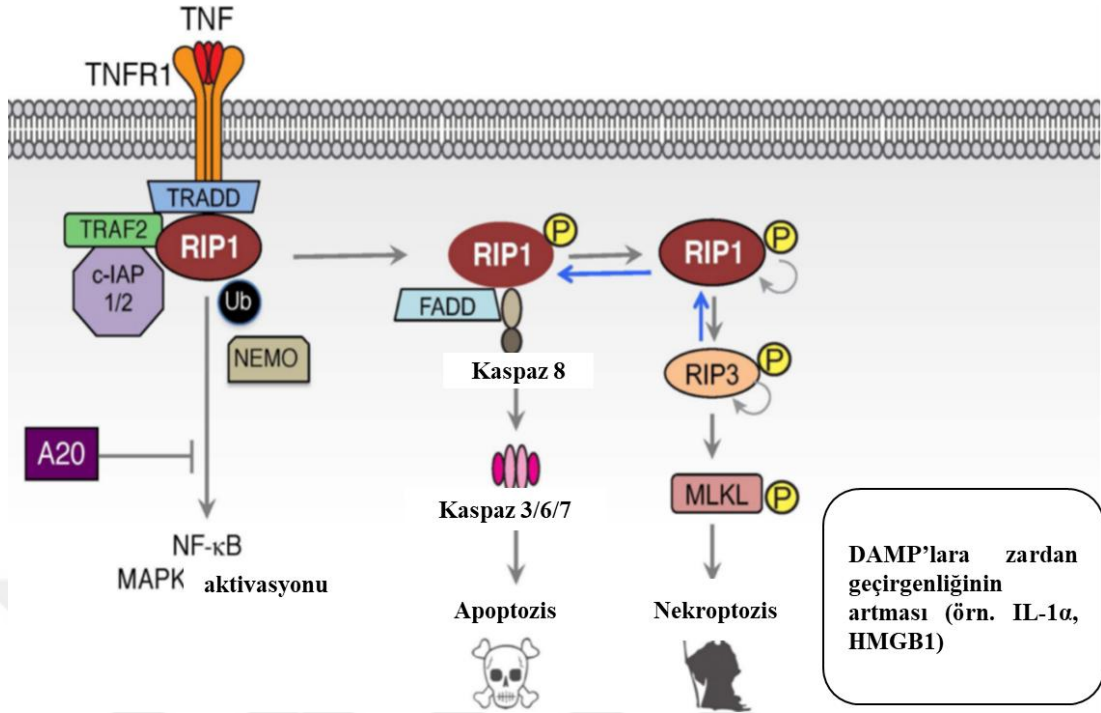
Şekil 2- 7 Fas kaynaklı apoptotik sinyal yolu (Kaufmann ve diğ. 2012).

Tümör Nekroz Faktörü

Tümör nekroz faktörü (TNF) proinflamatuvar bir sitokin olup, septik şok, sitokin indüksiyonu, hücre proliferasyonu, hücre efarekllaşması ve hücre ölüm yollarından apoptozis gibi hücrel mekanizmalarda rol oynamaktadır (Lin ve diğ. 1999). TNF ligand ailesi ile TNF reseptörü (TNF-R) ailesi üyelerinin etkileşimi ile hücrel mekanizmalar aktifleşir. TNF reseptörleri TNF-R1 (TNF reseptör tip 1;

CD120a; p55 / 60) ve TNF-R2 (TNF reseptör tip 2; CD120b; p75 / 80) olmak üzere iki farklı reseptörü kapsamaktadır. Bu reseptörler hücre membranında bulunan TNF'yi (memTNF) çözünür olarak sitoplazmada bulunan TNF'ye (sTNF) bağlar (Wajant ve diğ. 2003). TNF-R1 ve TNF-R2, gen ekspresyonunu kontrol eden I- κ B kinaz (IKK), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 veya p42 / 44 mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolları ile birlikte hücre için önemli olan hücre içi birçok sinyali başlatır (Varfolomeev ve Ashkenazi 2004). Ayrıca TNF, sitotoksik lökositlerin patojenle enfekte olmuş hücreleri öldürmesine aracılık etmek için FasL ve Apo2L / TRAIL gibi "profesyonel" ölüm ligandlarıyla birlikte çalışır (Varfolomeev ve Ashkenazi 2004).

TNF reseptörü-1 (TNF-R1) dışsal apoptotik yolda fas, DR4 ve DR5 ligandları ile etkileşir. Bu reseptörün varlığında kompleks I oluşur ve bu kompleksin oluşumu TRADD aracılı sinyalizasyonun başlamasını tetikler. TRADD sinyalizasyonun başlaması IKK/NF- κ B yolağının aktivasyonunu sağlar. Bu yolağın aktivasyonu sağlandıktan sonra TRADD bazı biyokimyasal modifikasyonlar sonrası kompleks I ve TNF-R1'den ayrılarak sitozelde serbestlenir. Bu serbestlenme FADD ve kaspaz-8'in sitozolik bir kompleks olan kompleks-II'ye bağlanmasını tetikler ve bu da dışsal apoptotik yolağını başlamasına neden olur (Şekil 2.8) (Varfolomeev ve Ashkenazi 2004).



Şekil 2- 8 TNF ile indüklenen hücre ölümü sinyali (Webster ve Vucic 2020).

İçsel Yol- İntrensik Yol

Apoptozis'in içsel yolağı diğer adı ile mitokondriyal yolak doğrudan ya da spesifik kinazlar ile uyarılan proapoptotik bir protein olan Bax'ın aktivasyonu ile başlamaktadır. Bax'ı bir takım olaylar dizilimi (oksidanlar, Ca^{+2} yükselmesi, pH değişiklikleri) aktive edebilir (Radogna ve diğ. 2007). Mitokondri yüzeyinde bulunan Bcl-2 proteini de içsel apoptotik yolda önemli roller oynamaktadır (Kannan ve Jain 2000). Bununla birlikte onkoproteinler de bazı iç stresler (doğrudan DNA hasarı, hipoksi, sağkalım faktörlerinin yokluğu vb.) ile intrinsik yolağı başlatabilmektedir.

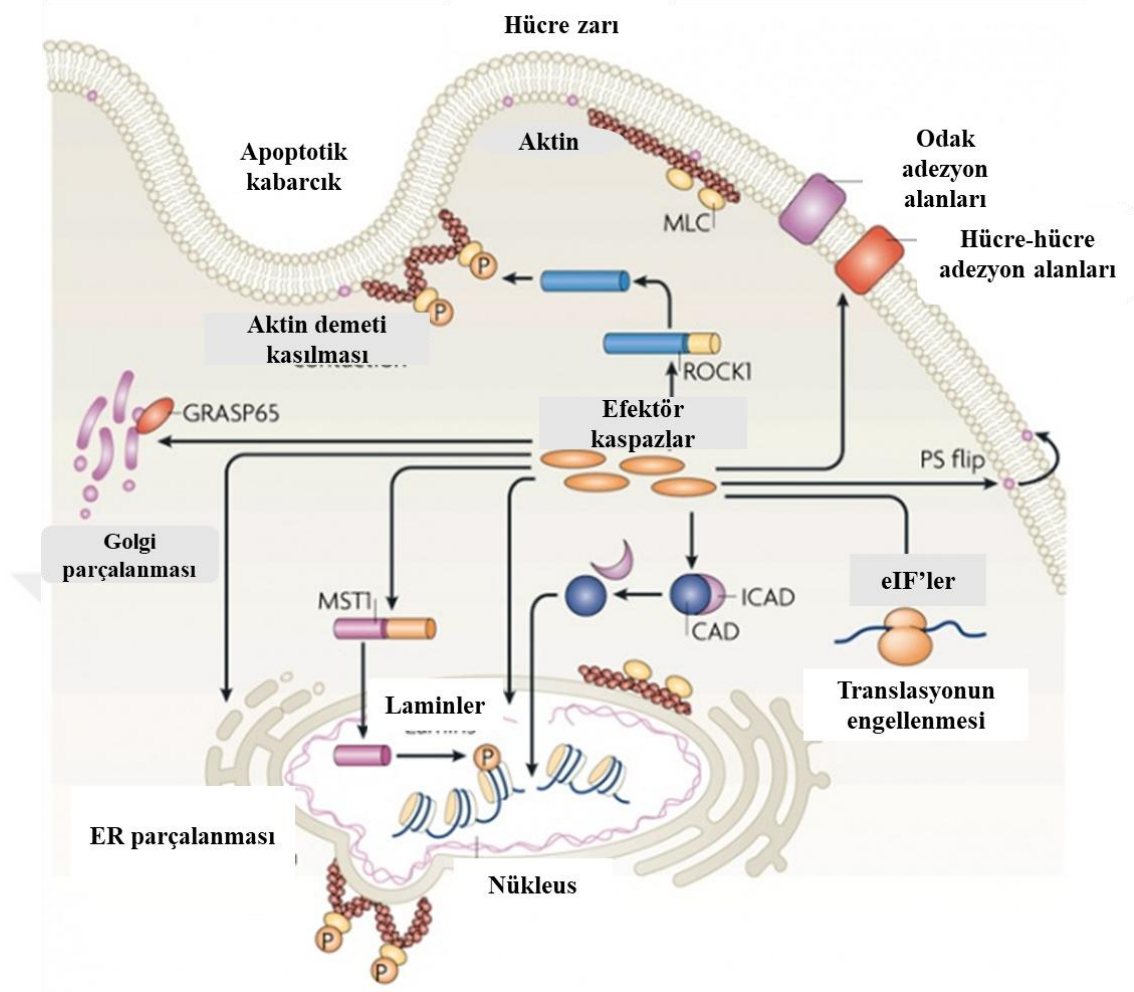
Tümör önleyici bir transkripsiyon faktörü olan p53'de herhangi bir iç stres sinyali ile birlikte pro-apoptotik Bax, Bak, PUMA ve Noxa proteinlerinin ekspresyon seviyesini yükseltirken anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin ekspresyonun düşmesine sebep olmaktadır. Bu durum da hücrelerin intrinsik yolağın başlamasına sebep olmaktadır. Buna Ek olarak, p53 tümör baskılayıcı proteini ekstrinsik yolda rol oynayan reseptörlerden RAS (CD95) ve TRAIL-R2'nin (TRAIL reseptörü-2)

ekspresyonunu da artırabilmektedir. Sonuç olarak p53 proteini sadece instrinsik yolda değil ekstrinsik yolda da görev almaktadır (Johnstone ve diğ. 2002).

İnstrinsik yolağın en önemli organeli mitokondridir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden bazıları mitokondri dış zar yüzeyine lokalize halde bulunurlar. Hücreye herhangi bir içsel stres sinyali geldiğinde mitokondri dış zar yüzeyinde bulunan pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonu p53 tarafından artırılır bu da mitokondri dış zar yüzeyinde bulunan porların açılmasına neden olur. Mitokondri zarında açılan porlar iyonların ve çözülmüş halde bulunan moleküllerin mitokondri iç zarından geçmesini kolaylaştırır. Mitokondri iç zarı geçirgen hale geldikten sonra mitokondriyal matrikse su akışı gerçekleşir bu su akışını takiben organelin şişmesi ve bozunması gerçekleşir. Mitokondri bozunması elektron taşıma sisteminde (ATP üretimi) önemli bir faktör olan sitokrom C ve SMAC'ın sitoplazmaya geçmesine neden olur (Giorgio ve diğ. 2005). Mitokondriden sitoplazmaya geçen sitokrom C adaptör molekülüne yani Apaf-1'e bağlanır. Bu etkileşim Apaf-1 proteininde modifikasyonlara neden olur ve bu modifikasyonlar heptamerik bir yapı olan apoptozisom oluşumuyla sonuçlanır. Apoptozisom oluşumu sitozolde serbest bulunan prokaspaz-9'un asp bölgesinden kesilerek aktifleşmesine ve onu takiben efektör kaspaz 3-6-7'den birini aktif olmasını sağlar. Bu da hücrenin ölümü ile sonuçlanır (Şekil 2.9) (Lopez ve Tait 2015).

Kaspazların birçok üyesi bulunmasına rağmen apoptotik hücre ölümünde rol oynadığı kesinleşmiş bazı kaspazlar bulunmaktadır. Bunlardan ekstrinsik yolda başlatıcı olarak görev alan kaspaz-8 ve 10 ile intrinsik yolda başlatıcı olarak görev alan kaspaz-9 ve apoptotik ölümü sonuçlandıracak olan efektör kaspazlar 3, 6 ve 7'dir. Efektör olarak çok kaspaz 3 görev alırken, yapılan çalışmalarla kaspaz 6 ve 7'nin de efektör olarak rol oynadığı kabul edilmiştir (Kumar 2007).

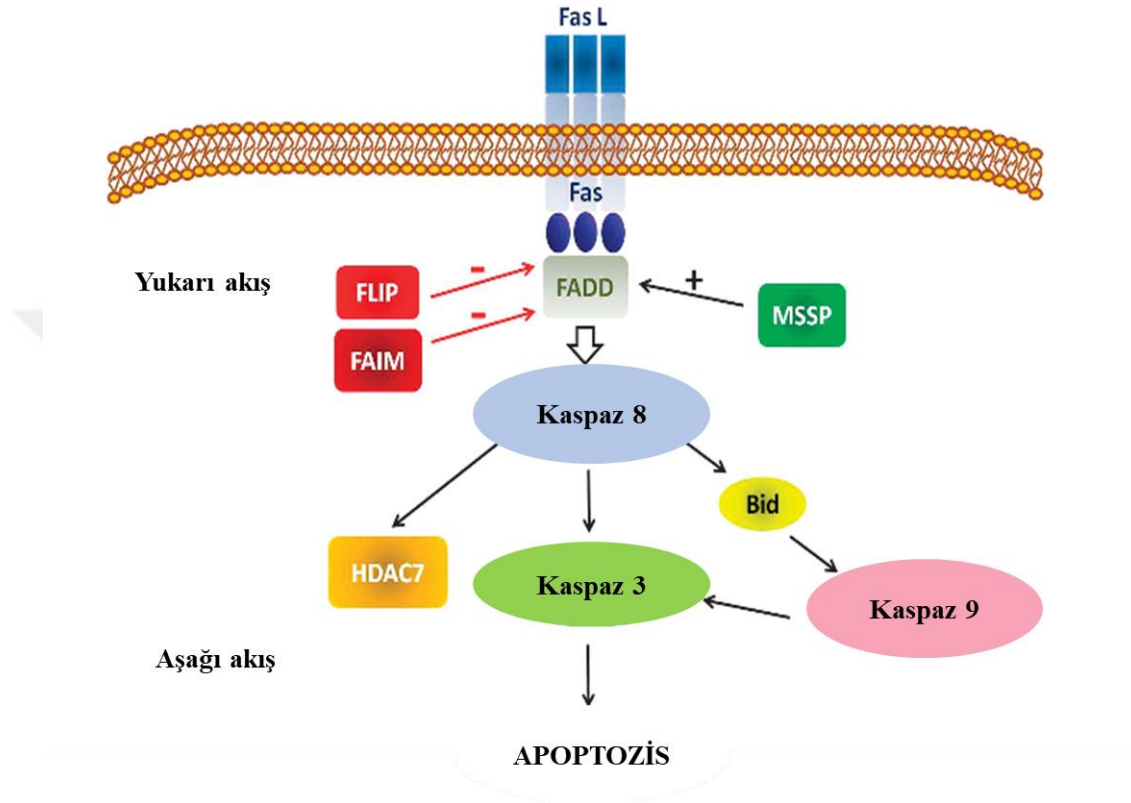
Efektör kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz -3, -6, -7 diğer kaspazlar gibi hücreye ölüm sinyali ulaşana kadar zimojen halde bulunurlar. Aktifleşmelerinin ardından homodimer bir yapı oluşturur ve katalitik aktiveleri artar (Shi 2004). Bu proteinlerin aktifleşmesi için aspartat kalıntılarının asp bölgelerinden kesilmesi gerekir (Troy ve diğ. 2011). Bu proteinler herhangi bir pro-domaine ihtiyaç duymaksızın, adaptör bir moleküle bağlanmalarına gerek olmadan aktifleşebilirler. Kendiliğinden dimerleşen efektör kaspazlar aktifleşmek için sadece başlatıcı kaspaz sinyallerine ihtiyaç duyarlar, sinyal gelir gelmez proteolitik bir kesim sonucu büyük ve küçük alt birimi birbirinden ayrılır ve efektör kaspazlar aktif hale gelir (Matsuura ve diğ. 2016). Bu proteinlerin aktifleşmesini takiben hücrede spesifik substrat yıkımları, organel bozulmaları, hücre bileşenlerinde bozulma gibi etkiler meydana gelir. Aynı zamanda kaspaz ile aktive edilmiş DNaz inhibitörü (ICAD) bozunur bunu takiben kaspaz ile aktive edilmiş DNaz (CAD) hücre içinde salgılanmaya başlar bununla eş zamanlı olarak hücrede zarf proteinlerinin bozunması, adezyon moleküllerinin proteolizisi, hücre iskeleti düzenleyicisi ROCK1'in (rho-ilişkili, sarmal bobin içeren protein kinaz 1) proteolizisi gibi olaylar meydana gelir. Bu olaylar aktin hücre iskeletinde bozunma, plazma membranın daralması, tübül ve mikrotübül ile ilişkili motor proteinlerin yıkımlanması ile sonuçlanır. Efektör kaspazların hücrede meydana getirdiği diğer bir olay örgüsü ise, GRASP65 gibi golgi aygıtından salgılanan proteinlerinin golgi aygıtından ayrılmasını sağlayarak golgi aygıtının yıkımlanmasına neden olmasıdır (Şekil 2.10) (Bruce ve diğ. 2002).



Şekil 2- 10 Efektör kaspazların apoptozisdeki rolleri (Bruce ve diğ. 2002).

Başlatıcı kaspazlardan biri olan kaspaz-8 programlanmış hücre ölümü apoptozis dışında enflamasyon sırasında sitokin aktivasyonunda rol oynayan bir sistein proteazdır. Kaspaz-8 de diğer kaspazlar gibi hücreye ölüm sinyali gelmedikçe zimojen halde ve pro-kaspaz şeklinde bulunur. Kaspaz-8'in aktivasyonu için diğer kaspazlar gibi belli bölgelerinden kesime uğraması gerekir. Hücrede kaspaz-8'in otoaktivasyon yolu ile aktive olabilirken, başka moleküller ile trans-uyarılma ile de aktifleşebilir (Kruidering ve Evan 2008). Bu protein ekstrinsik yolak yani ligand-reseptör ilişkili apoptozis yolda görevlidir. Eksentrisik yolakta görev alan reseptörlerin ligandları ile etkileşmesi sonucu sinyal alan FADD damainin hücre içine sinyali iletmesi ve bu sinyal ile kaspaz-8'in aktive olmasını sağlar. Kaspaz-8'de

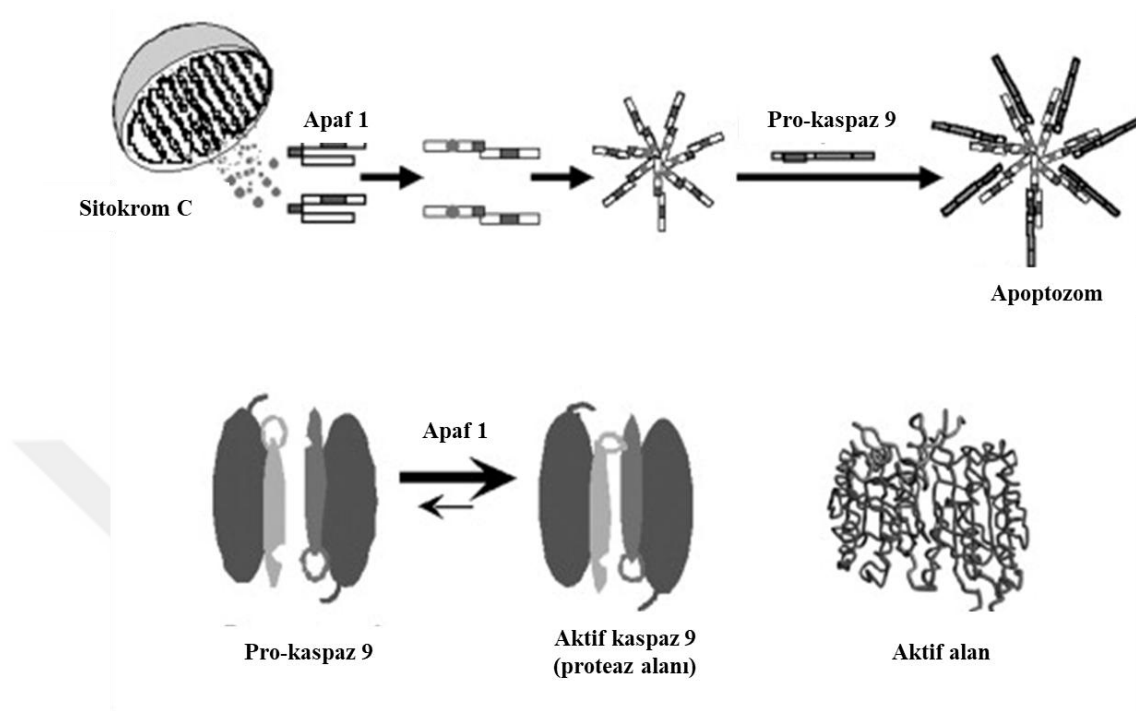
ya efektör kaspazlara iletir, ya da Bcl-2 ile etkileşen proteini parçalayarak mitokondirinin zar geçirgenliğinin artmasını ve ardından sitokrom C'nin sitozole salınmasını sağlayarak apoptotik ölümün gerçekleşmesine katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.11) (Kruidering ve Evan. 2008).



Şekil 2- 11 Kaspaz-8'in apoptozis de rolü (Pozzesi ve diğ. 2014).

Kaspaz-8 gibi başlatıcı bir kaspaz olan prokaspaz-9'da diğer kaspazlar gibi CARD alanı bulundurur. Ancak aktivasyonu için iki alt birime bölünmesi gerekmez. Bu proteinin aktivasyonu için sitozolde monomer olarak bulunan ve aynı zamanda zimojen olan adaptör Apaf-1 proteinin CARD bölgesine kendi CARD bölgesini bağlaması gerekmektedir. Bu bağlanma sırasında enerji (dATP) gerekir (Pagliari ve diğ. 2010). İnstrinsik yolda mitokondriden salınan sitokrom C'nin Apaf-1'e tutunması prokaspaz-9'un CARD bölgesini Apaf-1'in CARD bölgesine bağlamasını tetikler ve sitozolde apoptozom oluşumu gerçekleştirir. Bu oluşum kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Aktivasyonu takiben kaspaz-9'a ulaşan sinyal ile kaspaz-9

efektör kaspazların alt birimlerine ayrılmalarını sağlar ve apoptozis gerçekleşir (Şekil 2.12) (Jha ve Kitsis 2011).



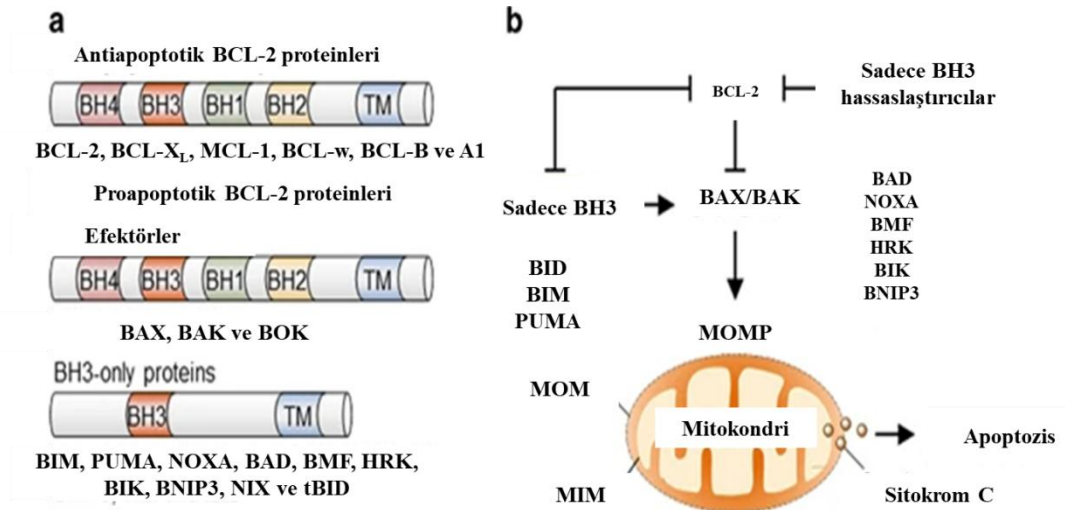
Şekil 2- 12 Apoptozom oluşumu ve kaspaz-9 aktivasyonu (Pagliari ve diğ. 2010).

BCL-2 Ailesi

BCL-2 ailesi proteinleri içsel apoptotik yolda mitokondri dış zar geçirgenliğini düzenler. Bu protein ailesi apoptozu tetikleyebilmekle birlikte apoptozu inhibe de edebilir. Bu protein ailesi, proapoptotikler, antiapoptotikler ve sadece BH3 proapoptotikler olmak üzere 3'e ayrılır. Bu proteinlerin üzerinde 4 farklı BH alanı bulunur. Her protein bu 4 BH alanının tamamını bulundurmamakla birlikte bu alanlardan en az birini bulundurur (Şekil 2.13) (Kale ve diğ. 2018; Maji ve diğ. 2018).

BCL-2 proteinlerinin apoptozis için büyük bir önemi vardır. Bu proteinlerin ekspresyonları apoptozis hücrenin sağkalımını ya da hücrenin ölümünü belirler. Antiapoptotik BCL-2 proteinleri mitokondri başta olmak üzere endoplazmik retikulum ve plazma zarında integral protein olarak bulunur. Proapoptotikler ise,

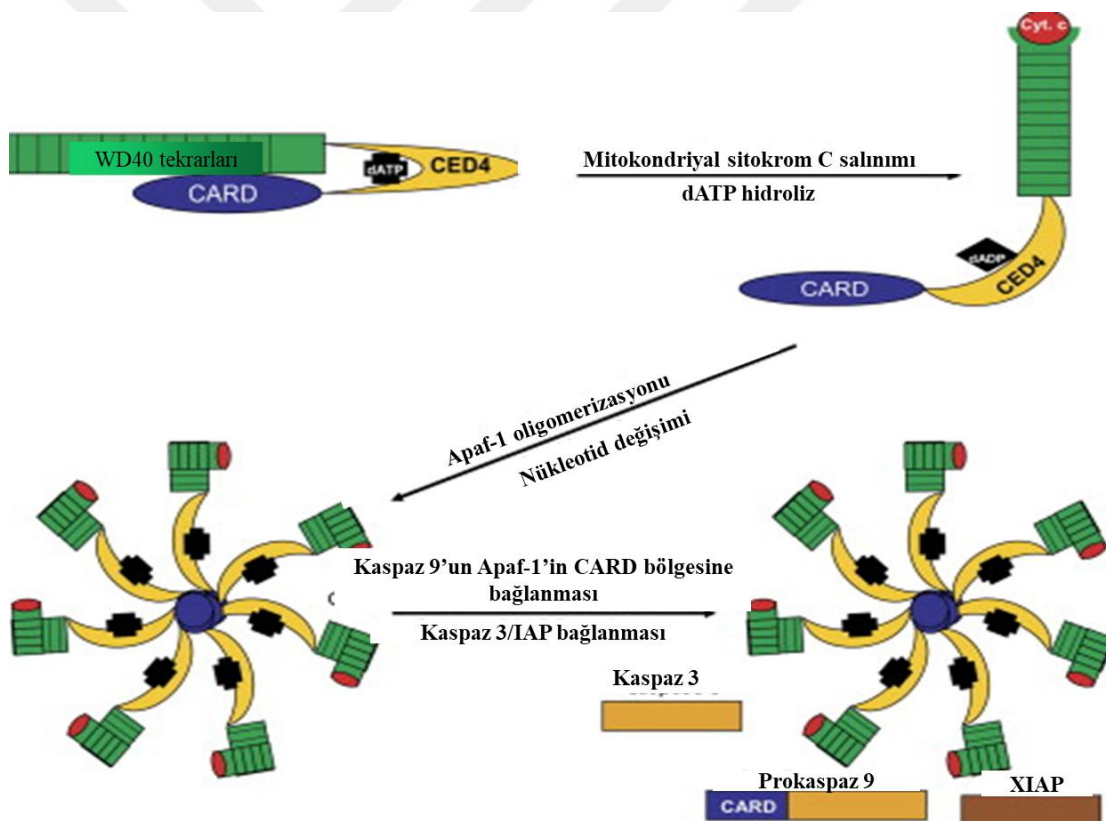
sitozolde serbest halde ya da hücre iskeletine yerleşmiş halde bulunur. Bununla birlikte hücreye apoptotik bir sinyalin ulaşması ile bu proapoptotik proteinler buldukları alandan mitokondri dış zarına doğru harekete başlar ve mitokondri dış zarına yerleşir. Bu yerleşim için bir dizi değişikliğe uğramaları gerekir (Gross ve diğ. 1999). Bazı antibiyotikler, UV, büyüme reseptörlerinin eksikliği, endoplazmik retikulum stresi ve DNA hasarı gibi hücrel farklılıklarda proapoptotik proteinlerden en önemlileri Bax ve Bak proteinleri mitokondri iç zarına geçişi sağlayamazlar. Ancak içsel yolak için bu proteinlerin aktive olması gerekir. Bu proteinler zimojen halde iken sitozolde serbest olarak yada mitokondri dış zarına gevşek bir şekilde bağlı bulunurlar. Apoptotik sinyallerin hücreye gelmesi ile birlikte bu proteinler bir dizi değişikliği takiben aktive olur ve iç zara lokalize olurlar. İç zarda bu proteinler dimer oluşturur ve iç zar yüzeyinde por oluşumuna neden olurlar bu porlardan sitokrom C salınır ve iç zar ile dış zar arasına geçer. Bunu takiben sitokrom C ve smac sitozole geçer. Bu proteinlerin sitozole geçmesi sitozolde apoptozomun oluşumuna neden olur. Apoptozom kompleksi apaf-1, sitokrom C ve prokaspaz-9'dan oluşur. Bu yapı efektör kaspazların kesimine ve aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon hücreyi apoptozis ile ölüme sürükler (Şekil 2.13) (Pihan ve diğ. 2017).



Şekil 2-13 Apoptozun BCL-2 ailesi tarafından düzenlenmesi. **a)** BCL-2 protein ailesi, apoptozun düzenlenmesindeki işlevsel rollerine ve taşıdıkları BCL-2 homoloji (BH) alanlarının sayısına göre üç gruba ayrılır. **b)** BCL-2 proteinlerinin apoptotik rolleri (Pihan ve diğ. 2017).

APAF-1

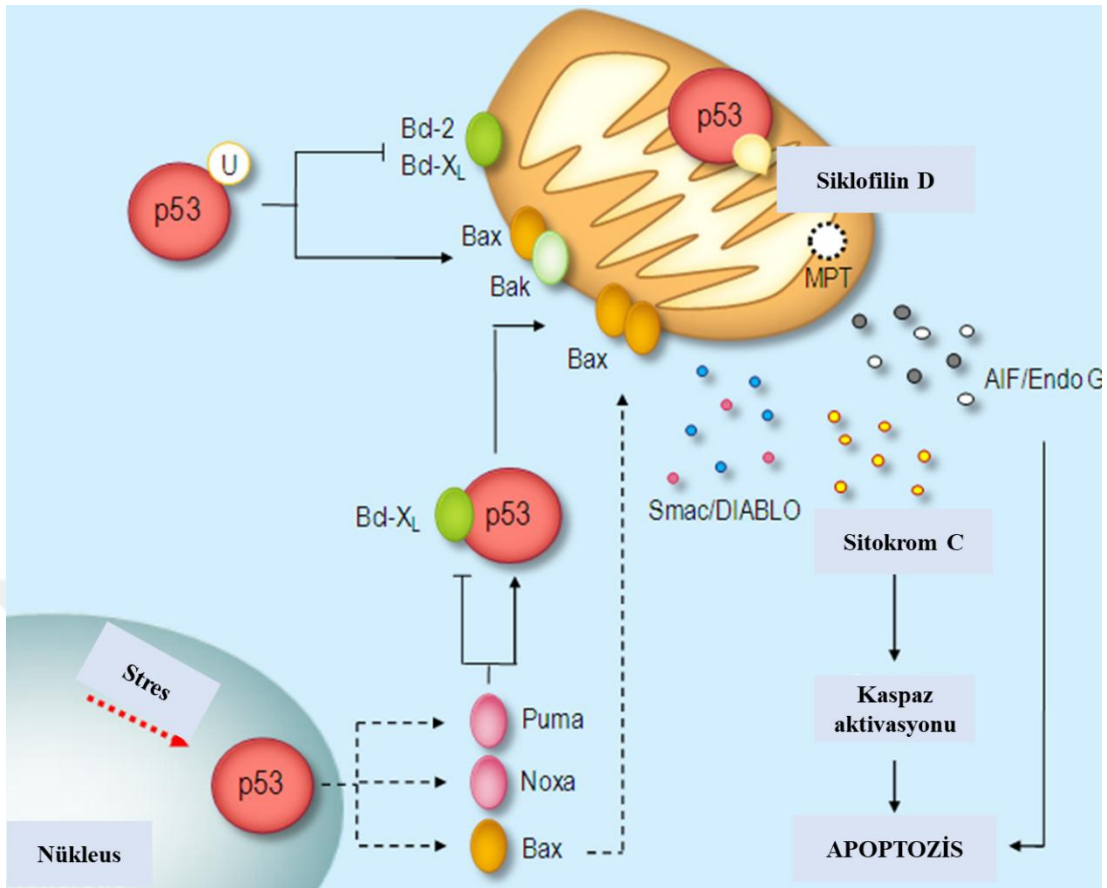
Apoptotik proteaz aktive edici faktör-I (apaf-1) içsel apoptotik yolun aktivasyonu için gelen sinyalleri takiben mitokondriden salınan sitokrom C (cyt-c) ile pro-kaspazı aktive edebilmek için sitozolde oluşacak apoptozom kompleksinde yer alır (Shakeri ve diğ. 2017). Bu protein üzerinde üç fonksiyonel alan içerir. Bu alanlar prokaspaz-9'u kendi üzerine bağlayabilmek için bulunan CARD alanı, CED-4 alanı ve C-terminal WD-40 tekrarıdır (Bratton ve diğ. 2001). Apaf-1 ve cyt-c etkileşimi için enerji (ATP) gereklidir. Sitozolde bu etkileşimin gerçekleşmesi apoptozom adı verilen kompleksin oluşmasına neden olur (Şekil 2.14) (Koch ve Lendon 2000). Apoptozom holoenzim oluşturmak için kendine kaspaz-9'u bağlar ve bu bağlanma sonucunda efektör kaspazlar aktive edilir (Cain ve diğ. 2002).



Şekil 2- 14 Memeli apoptozomunun oluşumu (Cain ve diğ. 2002).

P53 Proteini

p53 proteini hasar görmüş ya da başka bir organizmanın istilasına uğramış hücrelerin hücre döngüsüne girmelerini engelleyerek apoptozise zorlar (Haupt ve diğ. 2003). p53 birçok hücre mekanizmasında yer alır. Bu mekanizmalar arasında en önemlileri, hücre döngüsünün susturulması, hücre yaşlanması, DNA onarımı ve hücre ölümüdür (Aubrey ve diğ. 2018). p53 proteini, pek çok genin transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bunlar, sadece BH3 domaininde proapoptotik proteinleri (Puma, Noxa, Bad, Bax, Bak, p53AIP1); ölüm reseptörleri (Fas, Dr4, Killer / Dr5); ve apoptozis yürütme faktörleri (Apaf1, kaspaz 6, Bnip3L) (Chen 2016). p53 kendi inhibitörü olan mdm2 ile birlikte zimojen olarak bulunur. Ancak hücre stres sinyalleri aldığımda mdm2 inaktive olur ve p53 ile ayrılır ve p53 aktive olur (Haupt ve diğ. 2003). Aktive olan p53, sitozolde ubiuitinasyona uğrar ve sitozolde birikmeye başlar ve BCL-xL'a bağlanır ve puma ekspresyonunu düzenler. Daha sonra sitozolik p53 Bax oligomerizasyonunu ve mitokondriyal translokasyonu düzenler. Mitokondride p53 bax ve bak'ın oligomerizasyonundan sorumludur. P53 bax ve bak'ın ekspresyonunu artırdıktan sonra Bcl-2 ve Bcl-XL mitokondri iç zarında siklofilin D ile kompleks oluşturarak mitokondrinin zar bütünlüğünün bozulmasına neden olur ve p53 birikimi dolayısıyla içsel apoptotik yolak aktive olur (Şekil 2.15) (Chen 2016).



Şekil 2- 15 P53'ün apoptozisdaki rolleri (Chen 2016).

Apoptozis ve Kanser İlişkisi

Apoptozisin kanserli hücrelerdeki durumunu ortaya koymak için yapılan bazı çalışmalarda apoptozisin kanser gelişimine katkıda bulunabileceği öngörülmüştür (Lowe ve Lin 2000). Kanser hücrelerinin hayatlarını devam ettirebilmek için organizmada kullandıkları en önemli yolak kanser inaktivasyonudur (Brown ve Attardi 2005). Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü, hücrenin sürekli büyüme sinyali alması, invazyon ve metastaz gibi kanserleşme olaylarının hepsi apoptotik yolları aktive etmektedir. Ancak kanserli hücrelerin çoğalabilmeleri için apoptozisi baskılaması gerekir. Bunun için de genellikle proapoptotik proteinlerin yıkılması, kaspaz proteinlerinin işlevsizleştirilmesi, antiapoptotik proteinlerin yukarı regülasyonu ve BAX/BAK kaybı yolunu tercih ederler (Letai 2017). Kanser hücresi için apoptozise uğramamak tümörün başlaması, ilerlemesi ve sürdürülmesi için en

önemli olaydır. Kanser hücrelerinin apoptozisten kaçabilmesi için proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin dengesinin bozulması, kaspaz fonksiyonunun azalması ve ölüm sinyali mekanizmasının bozulması gerekmektedir (Wong 2011).

Onkolitik Virüsler ve Apoptozis

Onkolitik virüsler, kanser hücrelerini hedefleyebilen ve öldürebilen virüslerdir. Bu virüsler apoptozu tetkleyebilir. Bununla birlikte onkolitik virüslerin ürettikleri viral proteinler apoptozu indüklemekle birlikte, apoptozu baskılayabilir ya da gecikmesine sebep olabilir. Enfekte hücrelerde virüsler apoptotik cisimcikler ile taşınabilir ve bu taşınma ile konakta virüs enfeksiyonu belirtileri olmadan tüm konağı enfekte edebilir (Roulston ve diğ. 1999). Bazı çalışmalar onkolitik virüslerin proapoptotik proteinlerin ekspresyonuna neden olabileceğini düşündürmüştür. Aynı zamanda onkolitik virüslerin IFN-I'in (interferon I), GM-CSF'in (granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör) ve bazı sitokinlerin (özellikle IL-12 (interlökin 12)) uyarılması ile antijen sunumuna neden olarak bağışıklık sisteminin aktive ettiği gösterilmiştir (Washburn ve Schirmacher 2002; Wong ve diğ. 2010; Ahn ve Bekaii-Saab 2017).

Örneğin, Rubella (Kızamıkçık) virüsünün neden olduğu apoptozun p53, BCL-2 proteinlerinin inaktive olduğu görülmüştür. Bu da Rubella virüsünün dışsal apoptotik yolağı aktive ettiğini düşündürmüştür (Hofmann ve diğ. 1999). Adenovirüsler çoğu kanser hücresinde hem p53 bağımlı hem de p53 bağımsız apoptozu indükleyebilir (Marcellus ve diğ. 1996). Aynı zamanda 293T (insan embriyonik böbrek hücreleri) hücre hattında kaspaz-8'i aktive ederek dışsal apoptotik yolağı başlatabilmektedir. *Bovine ephemeral fever virus* kaspaza bağlı apoptozu tetikler. *Tavuk anemi virüsü*, tümör hücrelerinde seçici olarak apoptozu indükleyebilen kaspaz indükleyici bir ajan olan apoptin üreterek antiapoptotik bir protein olan BCL-2'nin baskılanmasını sağlar ve apoptozun indükler (Danen van Oorschot ve diğ. 1997). Veziküler sitomatit virüsü (VSV), dışsal yolda görevli olan FAS reseptörünü aktive ederek apoptozu indükler. Parvovirüsler, direkt olarak tümör hücrelerini hedefleyebilen ve parçalayabilen mekanizmalara sahiptir. Parvovirüsler tarafından üretilen NS1 proteini ile doğrudan apoptozisi indükler (Gaddy ve Lyles 2007; Loktev ve diğ. 2012).

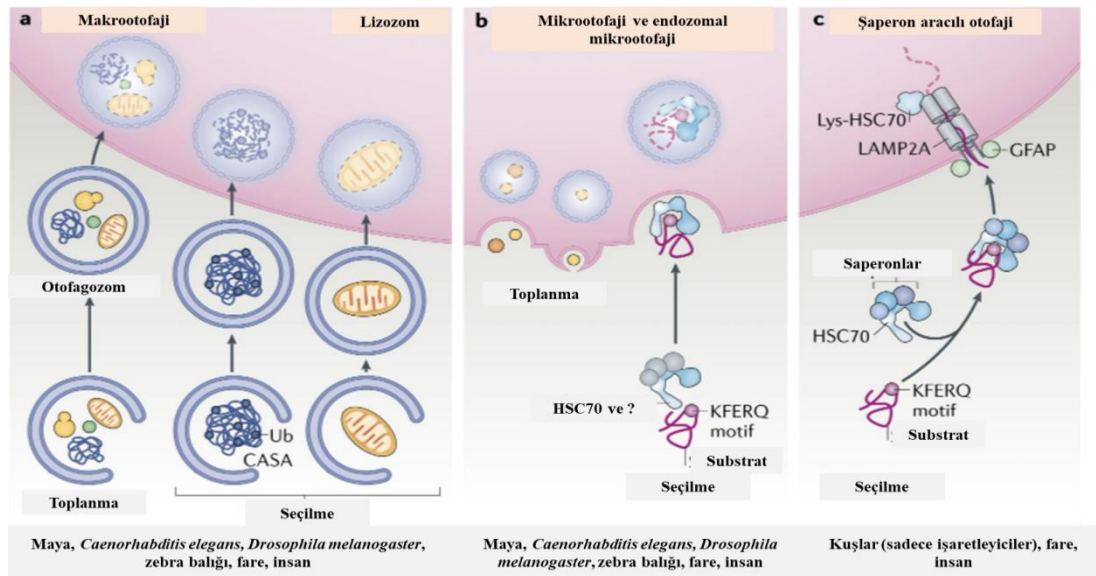
Otofaji

Otofaji, kendi kendini sindirme anlamına gelen ve hücredeki sitoplazmik bileşenlerin lizozomlar tarafından bozunmasına neden olan bir mekanizmadır. Tüm ökaryotik hücrelerde gerçekleşen otofajinin başlatılması için hücre içi ya da hücre dışı birkaç uyarın olması yeterlidir (Li ve diğ. 2020). Otofaji; açlık, hücre ölümü, tümör inhibisyonu, hücre gelişimi gibi sinyallerde rolü olan proteinlerin yanlış katlanması, kümelenmiş olarak bulunmaları ve mitokondri, endoplazmik retikulum, peroksizom gibi organellerin görevlerini yerine getiremedikleri durumlarda bu yapıları ortadan kaldırılmasını ya da parçalanmasını sağlayan fizyolojik bir süreçtir (Mizushima 2005; Mizushima 2007). Bu mekanizmanın hücre ölümü ile ilişkilendirilmesinin yanında hücredeki besin eksikliği sırasında hücrenin enerji akışında önemli bazı proteinlerin sağlanmasını sürdürülmesini de görev alarak hücre sağkalımında da önemli rolleri bulunur (He ve diğ. 2018). Otofaji, ATG (otofaji ile ilişkili gen ailesi) ve bir dizi gen tarafından kontrol edilmekte ve bu genler hücre ve doku tiplerine göre tümör gelişimine ya da tümör baskılanmasına neden olabilmektedir (Jiang ve diğ. 2019).

Otofajide önemli proteinlerden biri olan rapamisin memeli hedefi (mTOR), hücredeki stres, kanserli hücrelerin gelişmesi ve ilerlemesi, hücre proliferasyonu ile bağlantılıdır. Bu protein ayrı görevleri olan iki ayrı kompleksten (mTORC1 ve mTORC2) oluşur (Populo ve diğ. 2012). Sağlıklı hücrelerde mTORC1 kinazın aktifleşip ATG13'ü hiperfosforile etmesi ve bunun sonucunda da ATG13'ün ULK-FIP200 kompleksine katılamaması sağlanır. Fakat hücreler hücre içi ya da hücre dışı bir strese maruz kaldıklarında mTORC1 inhibe olur. mTORC1'in inhibisyonu ve aktivasyonu AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) tarafından düzenlenir (Kim ve diğ. 2011). AMPK'nın artması mTORC1'i inhibe eder ve bu inhibisyon sonucunda da otofajiyi aktive eden Unc-51 benzeri kinaz (ULK) defosforilize olarak aktive olur. Daha sonra ULK1 PAS (ön-otofagozomal; fagofor toplanma alanı) yapısına tutunur. Aktive olmuş ULK kompleksi sınıf III PI3K'nın aktivasyonuna neden olur. Bu aktivasyon sonrası Beclin-1 PAS üzerine diğer ATG proteinlerinin toplanmasına neden olur. Bu toplanma otofajide otofagozom oluşmasını sağlar (Torii ve diğ. 2016; Itakura ve diğ. 2008; Maiuri ve diğ. 2010; Li ve diğ. 2020).

Otofagozom oluşumunu takiben pro-LC3, ATG4B tarafından LC3-I'e dönüştürülür. Bu dönüşüm sonrası ATG3 ve ATG7'nin fosfatidiletanolamin (hücre zarlarını ve organel zarlarını oluşturan fosfolipit) ile etkileşime girerek LC3-I'in LC3-II'ye bölünmesini sağlar ve LC3-II'de otofagozomal içeriklerin lizozomal enzimlerce bozunması işlemi gerçekleşir (Stolz ve diğ. 2014; Wild ve diğ. 2014). Bu lizozomal enzimler bozulan amino asitleri ve amino asitler ile birlikte bozulan diğer molekülleri makromolekül oluşturarak metabolizmaya geri kazandırır (Glick ve diğ. 2010).

Günümüze kadar tanımlanmış üç farklı otofaji mekanizması mevcuttur. Bu mekanizmalar; Makrotofaji, şaperon aracılı otofaji (CMA) ve mikrotofajidir. Şaperon aracılı otofaji yapılan çalışmalar ile sadece memelilerde gözlendiği ortaya konulmuşken makrotofaji ve mikrotofaji memeli, bitkiler ve mantarlar ile birlikte diğer ökaryotik canlılarda da görülebilmektedir. Şaperon aracılı otofaji ve diğer otofaji türleri arasındaki bir diğer fark ise makrotofaji ve mikrotofaji organel içeriği bulunan sitoplazmanın bozunmasına neden olur fakat şaperon aracılı otofaji sadece çözümlü proteinlerin bozunmasında rol oynamaktadır (Şekil 2.16) (Todde ve diğ. 2009).



Şekil 2-16 Memelilerde otofaji mekanizmalarının şematik gösterimi (Kaushik ve Cuervo 2018).

Otofaji ve Kanser İlişkisi

Otofajik mekanizmalar, hücrede stres anında hücrel hemeostazın korunması için hasarlı organellerin ve yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasını sağlar. Ancak kanserli hücrelerde iki farklı rolü üstlenir. Otofajik mekanizmalar, tümör baskılanmasında rol alırken, tümör teşvikinde de rol oynayabilir.

Beclin1 proteinin ekspresyonunu sağlayan BECN1 geninin eksikliği genellikle meme, prostat, hepatoselüler karsinom, servikal skuamöz hücreli karsinom ve yumurtalık kanserlerde görülür. BECN1 geninin üretilmesine sebep olduğu beclin1 proteini otofajide fagofor oluşumunda rol oynar bu rolü ile otofajinin başlamasında görev alır. Bu proteinin eksikliği direkt olarak otofajinin çalışmaması ya da sinyallerinin azalmasına neden olur. Otofajinin gerçekleşmediği hücrelerde hücre proliferasyonunda artış gözlenir. Bu sonuçlar da beclin1'in kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı olarak görev aldığını gösterir. Aynı zamanda bazı çalışmalarda bazı kanser tiplerinde ATG proteinlerin azaldığı bildirildi. Bununla birlikte beclin1'in apoptozis ile ilişkisini sağlayan protein bax etkileşim faktörü-1 (bif-1) ile etkileşimi kanser hücrelerinde tümör inhibisyonunu sağlayarak otofajinin pozitif regülasyonuna neden olur. Bu proteinin, beclin1 ile etkileşiminin bozulması otofajinin de bozulmasına ve kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu sağlar (Liang ve diğ. 1999; Qu ve diğ. 2003; Coppola ve diğ. 2008).

Otofaji, tümörlü dokularda hücre ölümünü indükleyebildiği gibi, metabolit substratları ve hücre içi bileşenleri geri kazandırarak tümörlü dokunu enerji ihtiyacını karşılar. Yapılan bazı çalışmalarda ortaya konuldu ki otofajinin bozulması hücrede strese neden olur ve bu da hücre sağkalınının olumsuz etkilenmesine sebep olur. Bazı kanser tiplerinde otofajinin gerçekleşmesi tümörlü dokunun strese direnç geliştirmesini sağlar. Bu direnç ile birlikte tümör hücresinin sağkalımı artar. Bu tip kanser hücrelerinde otofajinin bozulması ya da inhibisyonu tümörlü hücrelerin hücre ölümüne gidişle sonuçlanır (Degenhardt ve diğ. 2006).

Onkolitik Virüsler ve Otofaji

Bazı çalışmalarda onkolitik virüslerin otofajik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Örneğin adenovirüs kaynaklı bir onkolitik virüs olan Telomelysin'in (OBP-301) epidermal büyüme faktörü reseptör eksenini E₂F₁-miR-7-EGFR yolağında miR-7'nin yukarı regülasyonunu sağlayarak hücre canlılığını engeller ve EGFR'nin (epidermal büyüme faktörü) aşağı regülasyonunu sağlayarak otofajik hücre ölümünü indükler. Bununla birlikte beclin-1'in ekspresyonunun artması otofajik hücre ölümünü indükleyerek onkolitik virüslerin terapötik etkisini artırır. Bir başka çalışmada adenovirüs genomuna Ad5/11 kimerik fiberi ile beclin-1 cDNA'sı kodlanmıştır. Bu onkolitik virüs lösemi hücrelerinde direkt olarak otofajik hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Bir başka çalışmada ise, beclin-1 ekspresyonunu sağlayan *Vaccinia* onkolitik virüsü lösemi ve myelomda anti tümör etkisi göstererek otofajik hücre ölümünü indüklediği ortaya konulmuştur (Tazawa ve diğ. 2012; Tong ve diğ. 2013; Li ve diğ. 2018). Zhang ve diğ. (2017)'de yaptıkları çalışmada ise, herhangi bir onkolitik virüs enfeksiyonu sonrası her hücrede otofajik hücre ölümünün gözlemlendiğini ve bu hücre ölümünün tümör oluşumunu etkilediğini göstermiştir. Furukawa ve diğ. (2017)'de yaptıkları çalışmada *Herpes simplex virüs-1* onkolitik virüsünde y34.5 geni delesyona uğratıldı. Bu onkolitik virüs bir deri kanseri olan skuamöz hücreli karsinomu hücrelerinde LC3 birikimine neden olduğu gösterilmiştir. Bu birikimde otofajik hücre ölümüne neden olur (Frukawa ve diğ. 2017; Zhang ve diğ. 2017; Jiang ve diğ. 2019).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Bu tez çalışması Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Viroloji Laboratuvarı, Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı ve Genomik-Proteomik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması boyunca kullanılan cihazlar tablo 3.1.'de belirtirmiştir.

Tablo 3- 1 Tez çalışması boyunca kullanılan cihazlar ve markaları.

Cihazlar	Markaları
Biyogüvenlik Kabini	Heal Force
İnvert Işık Mikroskop	ZEISS
ELISA Reader	BioTek/Epoch
Santrifüj	Elektro.mag
Pipetör	Isolab
Multi Kanal Otomatik Pipet	VWR
Tek Kanal Otomatik Pipetler	Thermo
Manyetik Isıtıcı	WiseStir/MSH-20A
Vorteks	WiseMix/VM-10
CO ₂ İnkübatör	Heal Force
Hassas Terazî	Uni Bloc/ATX224
Thoma Lamı	BOROX

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Hücreler ve virüsler

Bu tez çalışmasında, BHV-1 referans (Cooper) suşu kullanıldı. BHV-1 referans (Cooper) suşu MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) hücre hattında çoğaltıldı ve titre edildi. Virüs denemeleri için, insan akciğer kanseri hücre hattı (A549), insan prostat kanseri hücre hatları (PC-3 ve DU145), insan servix kanseri hücre hattı (Hela) ve insan meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) olmak üzere beş farklı kanser hücre hattı kullanıldı (Tablo 3.2). Hücreler %10 fetal bovine serumu (FBS/Capricorn Scientific, Cat no: FBS-11B) ilave edilmiş Dulbecco'nun modifiye Eagle's Medium (DMEM High Glucose with L- Glutamine, with Sodium Pyruvate/ Copricorn Scientific, Cat no: DMEM-HPA) içeren hücre üretme vasatı ile 37 °C'de %5 CO₂ 'li etüvde inkübe edildi.

Tablo 3-2 Çalışmada kullanılan kanser hücreleri ve özellikleri.

Hücre Hatları	Organizma	Doku	Hücre Tipi	Hastalık
MBA-MB-231	<i>Homo sapiens</i>	Göğüs, meme bezi	Epitel hücre	Adenokarsinom
PC-3	<i>Homo sapiens</i>	Kemik metastazı kökenli prostat	Epitel hücre	4. evre adenokarsinom
A549	<i>Homo sapiens</i>	Akciğer	Epitel hücre	Karsinom
Hela	<i>Homo sapiens</i>	Rahim, serviks, rahim ağzı	Epitel hücre	Adenokarsinom
DU-145	<i>Homo sapiens</i>	Prostat	Epitel hücre	Karsinom

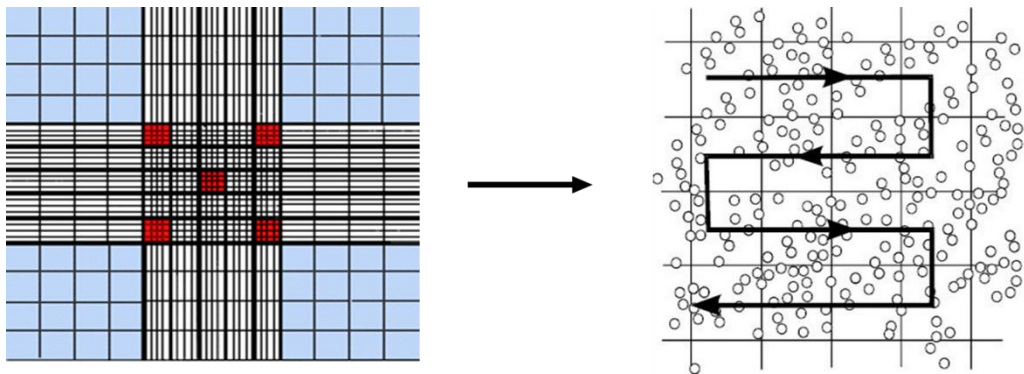
3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Stok hücrelerin bulunduğu kriyoviyaller dondurucudan çıkarıldı ve 37 °C bekletilerek hücrelerin çözünmesi sağlandı. Çözünen hücreler bir santrifüj tüpüne alınarak +4 °C'de 1200 rpm'de 3 dk boyunca santrifüjlendi. Hücrelerin santrifüj tüpünün dibine çökerek pellet oluşturmasının ardından tüpteki süpernatant sıvısı atıldı ve pellet 1 ml DMEM ile süspansiyon edilerek hücre kültürü flasklarına aktarıldı. Hücre ürettirme medyumuna eklenen hücreler 37 °C %5 CO₂ 'li etüvde inkübasyona bırakılarak hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı. Günlük mikroskopik kontrolleri yapıldı.

Monolayer tabakalandırılan hücrelerin flask yüzeyini kaplamalarını takiben gerçekleşecek hücre ölümlerini ve dejenerasyonunu önlemek için pasajlama işlemi yapıldı. Pasajlama işlemi için hücre kültürü flasklarının içerisindeki medyum dökülerek uzaklaştırıldı. Hücreler arası bağların yıkımlanması sağlayan tripsinizasyon işlemi için 37 °C’de bekletilen Trypsin/EDTA çözeltisi (Biowest, ID no: MS00BT100M) eklendi ve birkaç defa tüm yüzeye gelecek şekilde flask çalkalanıp Trypsin/EDTA çözeltisi dökülerek uzaklaştırıldı. Bu işlem iki defa yapıldı ve 37 °C %5 CO₂ ‘li etüvde 5-10 dk inkübasyona bırakıldı. Hücre kültürü flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine bir miktar medyum eklendi ve pipetaj yaparak tüm hücrelerin medyum içerisine toplanması sağlandı. Ardından hücreler yüzey alanı daha geniş bir flask içerisine aktarıldı ve üzerine hücre üretme medyumunu eklendi. İnkübasyona bırakılan hücrelerin her gün mikroskopik kontrolleri yapıldı ve gerektiğinde hücreler tekrar pasajlandı.

Hücrelerin Sayımı ve Diğer Testler İçin Hazırlanması

Hücreler virüs denemeleri, titrasyon testleri, apoptozis ve otofaji testlerinin yapılması amacıyla 96 kuyucuklu ve/veya 24 kuyucuklu pleytler içerisinde hazırlandı. Bu amaçla hücreler %70 den fazla konfluent olduğunda tripsinizasyon işlemine tabi tutuldu ve süspanse edildi. Thoma lamı %70’lik alkol ile temizlendi ve lamel ile kapatıldı. Hücre süspanسیونundan yaklaşık olarak 5-10 µl olacak şekilde Thoma lamındaki bölmeler dolduruldu ve invert mikroskopta hücreler sayıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3- 1 Thoma lamı ile hücre sayımı.

Hücre sayımı sonrası aşağıdaki formüle göre hücrelerin diğer testlerde kullanılmak üzere sulandırma oranı hesaplandı ve bu sayıya göre hücre üretme medyumunu ile sulandırılan hücreler pleytlere aktarıldı.

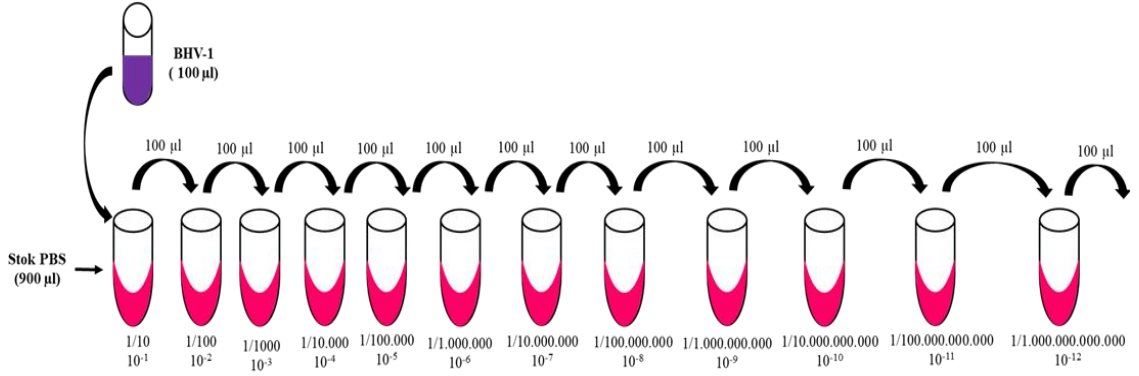
$$\text{Sulandırma Oranı} = \text{Seyreltme Faktörü} \times \text{Hücre Sayısı} \times 10^4 / \text{ml'de İstenilen Hücre Sayısı}$$

Virüslerin Hücre Kültüründe Üretilmesi

Virüsün üretilmesi amacıyla MDBK hücreleri kullanıldı. Hücreler flask yüzeyinde %90'den fazla konfluent olduğunda medyum flask yüzeyinden dökülerek uzaklaştırıldı. Virüs, toplamda flask hacminin %1'i hacminde olacak şekilde DMEM ile sulandırılarak inokule edildi ve 37 °C %5 CO₂'li etüvde 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda inokulum otoklavlanmak üzere aspire edildi. Aspirasyon sonrası flaska serumsuz DMEM eklendi ve 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Her gün mikroskopik kontrolleri yapılarak virüs üremesine bağlı CPE (sitopatolojik efekt) izlendi. Mikroskopik kontrollerde hücrelerin %80 - 90'ında CPE görüldükten sonra -80 °C dondurucuya kaldırıldı.

3.2.3. Mikrotitrasyon Testi ve Plak Titrasyon Testi

Virüslerin enfeksiyöz gücünü kantitatif olarak belirleyebilmek için mikrotitrasyon testi kullanıldı. Bu amaçla, virüs Log₁₀ tabanına göre fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS- Sigma Cat No: P441750TAB) içerisinde sulandırıldı. (Şekil 3.2).



Şekil 3-2 Virüs titresini hesaplamak için virüslerin sulandırılması.

MDBK hücreleri yoğunluğu 300.000 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon olarak hazırlandı. Bu test için 96 kuyucuklu pleytler kullanıldı. Virüs sulandırmaları her bir sulandırma için 4'er tekrarlı çalışılarak pleyt kuyucuklarına 100 µl aktarıldı. Sulandırmalar dışında hücre kontrol ve virüs kontrol için de 4 kuyucuk hazırlandı. Virüs kontrol için saf virüs ½ sulandırılarak eklenirken hücre kontrol için kuyucuklara 100 µl hücre üretme medyumunu aktarıldı. Daha sonra tüm kuyucuklara 100 µl hücre süspansiyonu eklendi. İki gün boyunca 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İki gün sonunda her kuyucuk mikroskopta incelenerek CPE varlığı kaydedildi ve Spearman-Kärber yöntemine ile DKID₅₀ (Doku kültürü enfektif doz 50) ve 100DKID₅₀ (enfekte hücre kültürünün tamamında enfeksiyon oluşturan virüs sulandırma oranı) aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Log}_{10}\text{DKID}_{50} = -(X_0 - (d/2)) + d(r/n)$$

X_0 : İnokulasyon yapılan tüm konakçılarda virüs üremesinin gözleendiği en yüksek sulandırma değerinin log₁₀'unu,

d : Sulandırma oranının log₁₀'unu,

r : X_0 ve daha ileri sulandırma basamaklarında gözlenen pozitiflerin toplamı,

n : Her sulandırma basamağında enfekte edilen konakçı sayısı.

Denemelerde kullanılacak virüsün plak oluşturma ünitesinin hesaplanması amacıyla plak titrasyon testi uygulandı. Bu amaçla bir gün önce MDBK hücreleri 24 kuyucuklu pleytlerde hazırlandı Test günü, virüs \log_{10} tabanına göre sulandırıldı. Daha sonra sulandırmalar bir gün önceden hazırlanan hücrelere adsorbsiyonlu yöntemle inokulasyonu yapıldı. Virüs kontrol ve hücre kontroller içinde kuyucuklar hazırlandı. Bunun için 1 saat boyunca $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ %5 CO_2 'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda üst sıvı aspire edildi ve her gözün üzerine 1 ml kadar yarı katı besiyeri (% 3'lük karboksimetil selüloz +2x DMEM) aktarıldı ve pleyt inkübasyon için etüve kaldırıldı. Her gün mikroskopik kontrolleri yapıldı ve 3 gün boyunca pleyt inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra pleytin her bir gözüne hücrelerin üstünü kaplayacak şekilde %10'luk formol eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin bitimini takiben hücrelerin kalkmasını engellemek için direkt hücrelere temas ettirmeden, pleyt eğilerek akan suda yıkandı ve formolün uzaklaştırılması sağlandı. Formol uzaklaştırıldıktan sonra her göz Kristal viole ile boyandı. İnvirt ışık mikroskopunda plak alanları sayıldı. Plak oluşturma ünitesi (PFU) değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$N=X/(V)\times(D)$$

N:PFU, X: Ortalama plak sayısı, V:İnokulum miktarı, D: Dilüsyon

3.2.5. Virüsün Kanser Hücrelerine İnokülasyonu

Virüsün hücrelerin canlılığına olan etkisinin ölçülmesi, hücrelerde meydana getirdiği patolojik değişikliklerin izlenmesi, virüs enfeksiyonuna bağlı hücre apoptozis ve otofaji yollarının araştırılması amacıyla kanser hücre hatlarına virüs inokulasyonu işlemi gerçekleştirildi. Yapılan testlerin uygulaması için kanser hücreleri 24 ve 96 kuyucuklu pleytlerde hazırlanarak virüs ekimi yapıldı. Bir gün boyunca 37°C %5 CO_2 'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda %80 üzeri konfülent olan hücrelerin üzerindeki medyum aspire edildi. Hücreler üzerine 10 moi, 5 moi, 2 moi, 1 moi ve 0.1 moi olacak şekilde 100 μl hücrelerin üzerine inokule edildi. Tüm denemeler 3'lü ve/veya 4'lü tekrarlar

yapılarak gerçekleştirildi. 1 saat boyunca 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası enfekte hücrelerin üzerindeki sıvı aspire edildi ve üzerine 100 µl DMEM eklenerek aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı.

3.2.6. Hücre Canlılığı Testi

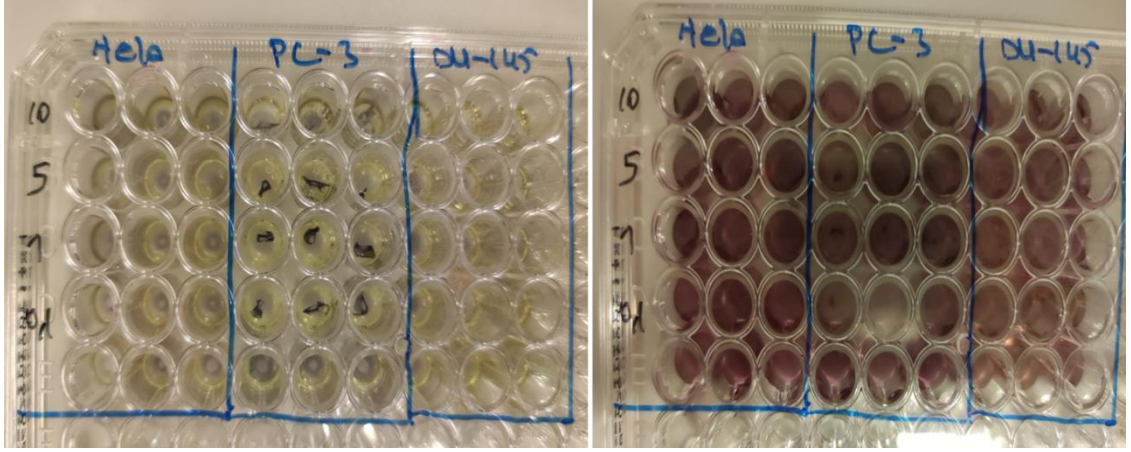
Tripan Blue Boyaması

Hücrelerin canlılık oranlarının saptanması amacı ile tripan blue boyaması yapıldı. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Hücreler PBS ile süspansiyon haline getirildi. Daha önce hazırlanan tripan blue boyası 1:1 oranında hücre süspansiyonu ile bir tüpte karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin canlılığının tespiti ve sayımı amacıyla Thoma lamı kullanıldı. Işık mikroskopunda değerlendirildi. Aşağıdaki formül kullanılarak mevcut canlı hücre oranı belirlendi.

$$\% \text{ canlı hücre} = [1.00 - (\text{mavi boyanan hücre sayısı} / \text{toplam hücre sayısı})] \times 100$$

MTT Yöntemi

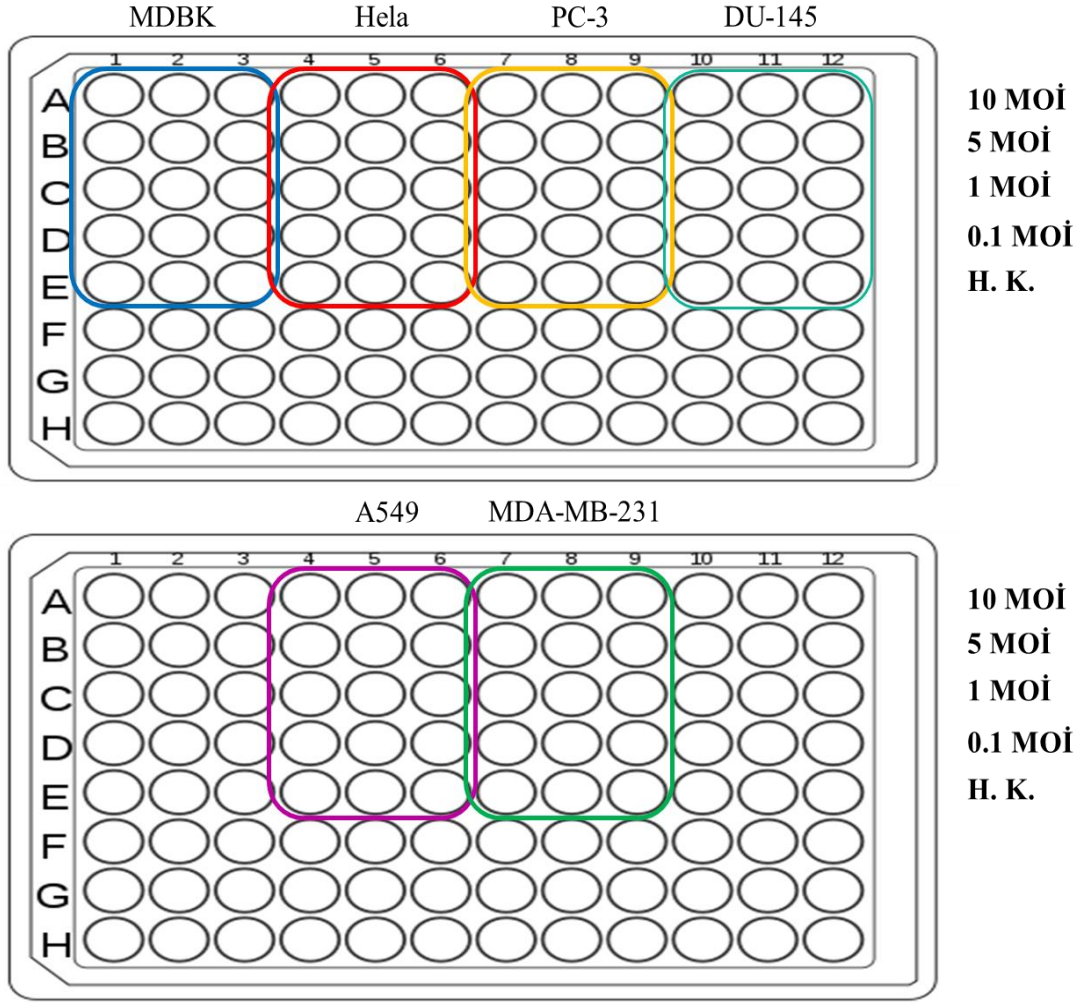
Methylthiazoletetrazolium (MTT) sarı renkli pozitif yüklü bir bileşiktir ve sitozolik kısmı negatif olan ökaryotik hücre membranından kolaylıkla geçebilir. Bu geçiş hücre sitozolünde dehidrogenaz enzimi tarafından indirgenmesine neden olur. MTT çözeltilisinin indirgenmesi hücre sitozolünde formazan oluşmasını tetikler. Formazan suda çözünmediği için kristal şeklinde çökelti oluşturur. Bu çökeltinin çözdürülmesi mor renk oluşumuna neden olur (Şekil 3.3) Çözdürüldükten sonraki renk değişikliğinin ELISA okuyucuda okutularak elde edilen absorbans değerleri kantitatif değerlendirme yapılmasını sağlar. Çalışmamızda farklı oranlarda sulandırılan BHV-1 ile A549, MDA-MB-231, PC3, DU145, Hela hücreleri enfekte edildi. Enfeksiyonun farklı saatlerinde hücre canlılığı ve sitotoksite düzeyleri araştırıldı.



Şekil 3-3 MTT yönteminde MTT solüsyonu ve DMSO uygulamasında hücreler arası renk farklılıklarına bir örnek.

Testte kullanılacak çalışma MTT solüsyonu 5mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 100 mg MTT (Biotium Cat no:10059) 20 ml PBS'e eklendi ve vortekslenerek çözdürüldü. 0.22 µm filtreden geçirildi. Hazırlanan solüsyon ependorf tüplere 1 ml olacak şekilde porsiyonlandı. Tüm MTT solüsyonu bulunan ependorflar folyo ile sarıldı ve solüsyonun ışık görmemesi sağlandı ve -20'de muhafaza edildi.

Test için 96 kuyucuklu mikroyuvarlaklarda hazırlanan hücreler farklı oranlarda hazırlanan BHV-1 ile enfekte edildi. Enfeksiyonun takibinde MTT uygulaması zamana ve doza bağlı olarak değerlendirme yapılacak şekilde gerçekleştirildi. İnkübasyonu takip eden 4., 8., 12., 16., 24., 30., 36., 40., 48., 72. saatlerde MTT uygulama denemeleri uygulandı (Şekil 3.4). Bu amaçla hücre medyumları aspire edildikten sonra MTT solüsyonu hücrelerin üzerine 10 µl eklendi ve 4 saat boyunca 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda oluşan formazon bileşiklerini çözdürülmesi amacıyla 100 µl DMSO eklenip 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Değerlendirmelerin yapılması amacıyla ELISA okuyucuda 540 ve 570 nm'de pleytler okutulmuş absorban değerleri kaydedildi.



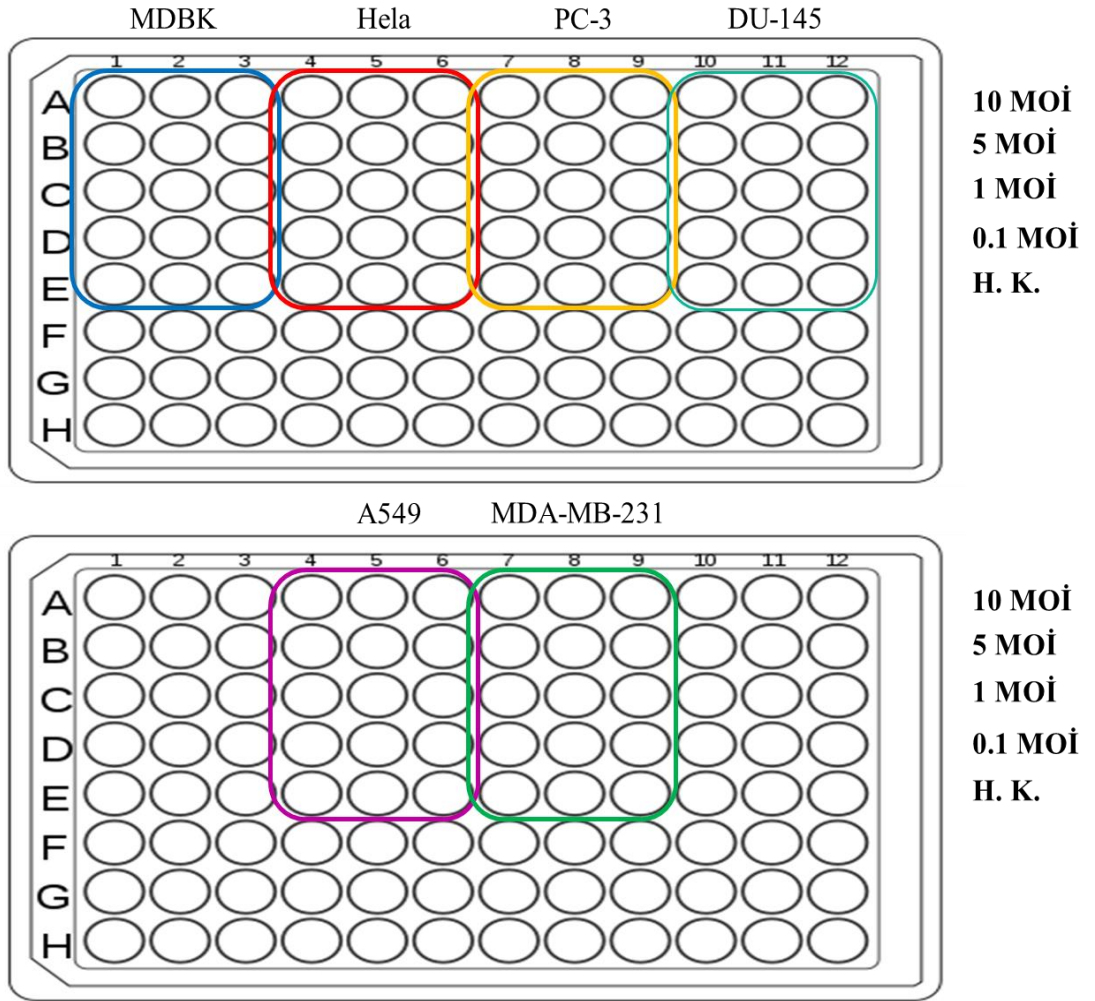
Şekil 3-4 MTT uygulamasının 96 gözlü pleyttteki deney düzeneği. Her hücre için pleytte 3 göz kullanıldı.

Akridin Turuncusu/ Etidyum Bromür Boyaması

Akridin turuncusu (Biosciences Lot no: AB014C1) /Etidyum bromür (Bioshop Lot no: 0A63905) (AO/EtBr) boyaması, hücrelerde erken ve geç apoptozu belirlemek amacıyla kullanıldı. Testte kullanılacak çalışma AO/EtBr solüsyonu 100 µg/ml olarak hazırlandı. Santrifüj tüpüne 10 ml PBS eklendi. Üzerine 500 µg AO ve 500 µg EtBr eklendi. Vortekslendi ve 0.22 µm filtreden geçirildi.

Uygulamalarda 96 kuyucuklu pleytlerde 3×10^4 oranında hazırlanan hücreler kullanıldı. Bir gün önce hazırlanan hücreler farklı oranlarda sulandırılan virüs ile enfekte edildi. Enfeksiyonun inkübasyon sürecinde zaman ve doza bağlı değerlendirmek amacıyla inkübasyon süresinin farklı saatlerinde (4., 8., 12., 16., 24.,

30., 36., 40., 48., 72.) AO/EtBr boyaması yapıldı (Şekil 3.5). Test edilecek hücreler üzerindeki medyum aspire edildikten sonra PBS ile hücre yüzeyleri bir kez yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 20 µl AO/EtBr boya solüsyonu eklendi ve ışıktan korumak için pleyt folyoya sarıldı. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda boya eklenen gözler PBS ile 2 kez yıkandı. Testin değerlendirilmesi floresan mikroskopunda görüntülenerek yapıldı. Görüntüleme sırasında erken apoptotik, geç apoptotik, nekrotik hücreler görüntülendi ve alandaki apoptotik hücreler sayılarak yüzdelik hesap yapıldı.



Şekil 3-5 AO/EtBr boyamasının 96 gözlü pleytteki deney düzeneği. Her hücre için pleytte 3 göz kullanıldı. 4. ve 48. saatler arasında uygulama yapıldı ve her uygulama 3 kere tekrarlandı.

3.2.8. ELISA Testleri

Virüs ile enfekte edilmiş kanser hücrelerindeki BCL-2, kaspaz-8, kaspaz-9, ATG7 ve p62 seviyelerini belirlemek için ticari ELISA kitleri (BT LAB (Bioassay Technology Laboratory), BCL-2-Cat No:1832Hu; Kaspaz-8-Cat No: E7864Hu; Kaspaz-9-Cat No: E0968Hu; ATG7-Cat No: E6379Hu; p62-Cat No: E7448Hu) kullanıldı. ELISA testleri ticari kitin kendi protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. ELISA testlerinde kullanılacak örneklerin hazırlanması amacıyla hücreler virus enfeksiyonu gerçekleştirildi. Hücreler 96 gözlü pleytlerde 3×10^4 oranında hazırlandı. Ertesi gün farklı oranlarda sulandırılan virüs (0.1 moi, 1 moi, 2 moi, 5 moi, 10 moi) ile hücreler enfekte edildi. Enfeksiyonun apoptotik ve otofajik protein seviyelerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla inkübasyon süresinde doza ve zamana bağlı olarak hücre lizatları $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. ELISA testlerinin uygulaması öncesinde hücre lizatları 4000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi ve üst sıvı testte kullanılmak üzere hazırlandı.

BCL-2 Standart Hazırlama

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Test kiti içerisinde bulunan 400U/ml oranındaki standart stok solüsyonu standart seyreltici ile solüsyonu ile 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 oranında sulandırıldı. Yapılan dilüsyonlar sonucunda stok solüsyonu (400U/ml) 200U/ml, 100U/ml, 50U/ml ve 25U/ml içerecek şekilde seyreltilerek hazırlandı.

Kaspaz-9 Standart Hazırlama

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Test kiti içerisinde bulunan 24ng/ml oranındaki standart stok solüsyonu standart seyreltici ile 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 oranında sulandırıldı. Yapılan dilüsyonlar sonucunda stok solüsyonu (24ng/ml); 12ng/ml, 6ng/ml, 3ng/ml ve 1.5ng/ml içerecek şekilde seyreltilerek hazırlandı.

Kaspaz-8 Standart Hazırlama

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Test kiti içerisinde bulunan 2400ng/L oranındaki standart stok solüsyonu standart seyreltici ile 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 oranında sulandırıldı. Yapılan dilüsyonlar sonucunda stok solüsyonu (2400ng/L); 1200ng/L, 600ng/L, 300ng/L ve 150ng/L içerecek şekilde hazırlandı.

p62 Standart Hazırlama

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Test kiti içerisinde bulunan 20ng/ml oranındaki standart stok solüsyonu standart seyreltici ile 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 oranında sulandırıldı. Yapılan dilüsyonlar sonucunda stok solüsyonu (20ng/ml); 10ng/ml, 5ng/ml, 2.5ng/ml ve 1.25ng/ml içerecek şekilde hazırlandı.

ATG-7 Standart Hazırlama

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Test kiti içerisinde bulunan 1200ng/L oranındaki standart stok solüsyonu standart seyreltici ile 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 oranında sulandırıldı. Yapılan dilüsyonlar sonucunda stok solüsyonu (1200ng/L); 600ng/L, 300ng/L, 150ng/L ve 75ng/L içerecek şekilde hazırlandı.

Tüm ELISA testleri oda sıcaklığında ve antijenle kaplanmış 96 gözlü pleytlerde gerçekleştirildi (Şekil 3.6).

1. Tüm reaktifler oda ısısına getirildi.
2. Standartlar için ayrılan kuyucuklara 50 µl standartlar eklendi.

(NOT: Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyuya biyotinlenmiş antikor eklenmedi.)

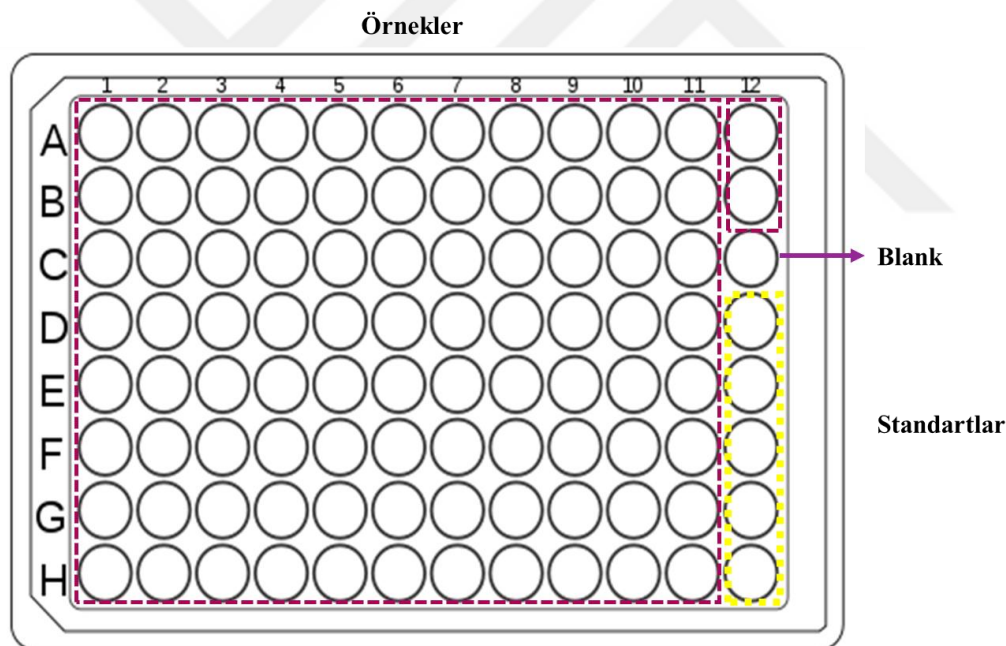
3. Örnekler için ayrılmış kuyucuklara 40 µl örnekler eklendi. Üzerine 10 µl anti-cleaved CASP8 (kaspaz-8 için), anti-ATG7 (ATG7 için), anti-CASP9;MCH6;ICE-LAP6 (kaspaz-9 için), anti-SQSTM1 (p62 için), anti-BCL2 (BCL2 için) antikorları eklendi. Ardından 50 µl streptavidin-HRP blank için ayrılan kuyucuk hariç hem

örnek kuyucuklarına hem de standart kuyucuklarına eklendi. Pleytlerin üzeri kapatıldı ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

4. Pleytin üstündeki kapatici çıkarıldı ve yıkama solüsyonu ile her kuyucuk 5 kez yıkandı. Her yıkama için 30 saniye 1 dakika arasında bekletildi ve yıkama solüsyonu döküldü

5. Her kuyucuğa 50 µl substrat-A solüsyonu eklendi ve ardından her kuyucuğa 50 µl substrat -B solüsyonu eklendi. Karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca yeni bir kapatici ile kaplanmış pleyt inkübe edildi.

6. İnkübasyon sonrası tüm kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve oda ısısında 10 dk beklendi (Şekil 3.6). Değerlendirme için her pleyt ELISA okuyucu ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.



Şekil 3- 6 ELISA testlerinin uygulama düzeneği.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

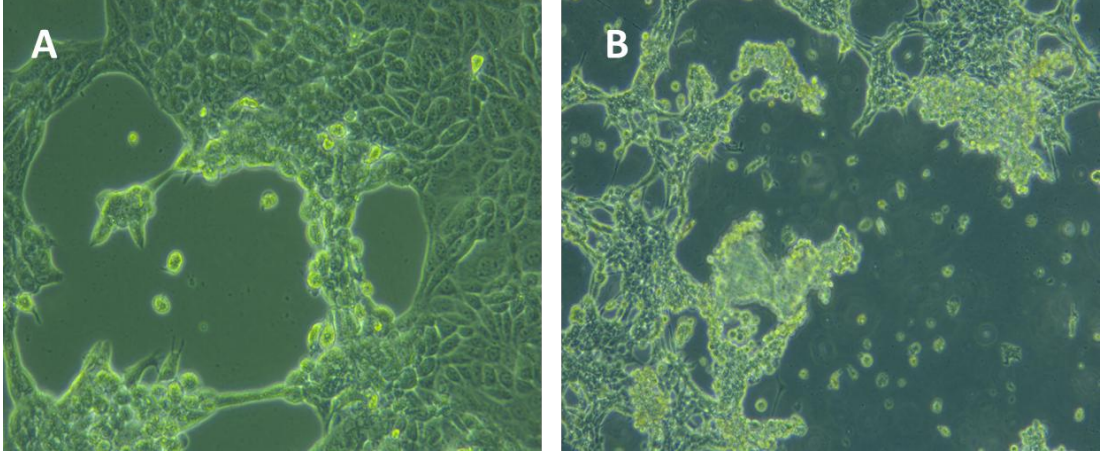
Yapılan analizlerin sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi için SPSS (versiyon 20) programı kullanıldı. *In vitro* virüs enfeksiyon denemelerinin

değerlendirilmesinde her bir uygulama bir grubu oluşturacak şekilde, tüm tekrarlarla birlikte grupların ortalaması alınarak değerlendirilme yapıldı. BHV-1'in farklı kanser hücrelerinin canlılığı, apoptotik ve otofajik yolak proteinleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla deney gruplarının ortalamalarının arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Bu amaçla tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Deneysel gruplar ve kontrol grubu arasındaki farklılıkların anlamlı olup olmadığı Student't testi yapılarak analiz edildi. Farklılıklar $p<0,01$ ve $p<0,05$ de istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

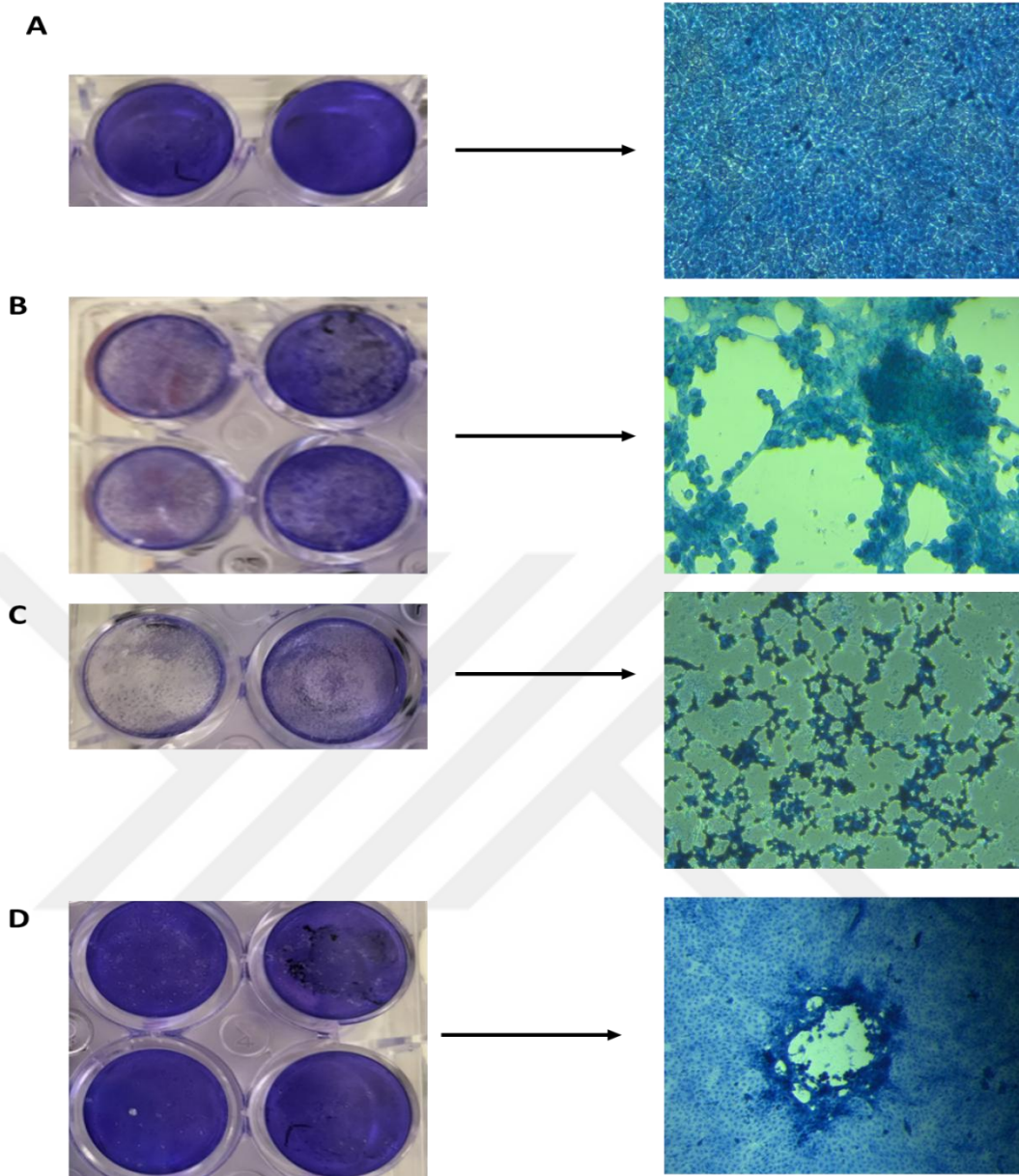
4. BULGULAR

4.1. Kanser Hücrelerinde Virüs Üremesi

Virüs üremesinin belirlenmesinde MDBK hücreleri kontrol olarak kullanıldı. İn vitro denemelerde BHV-1; 0,1- 1- 2- 5- 10 moi sulandırmaları kullanıldı. Hücrelerin farklı dozlarda virüs enfeksiyonlarında zamana bağlı olarak virüsün üremesi gözlemlendi. Hücrelerde balonlaşma, yuvarlaklaşma, çekirdekte intranükleer inklüzyon cisimcikleri, hücrelerde lizis virüsün üremesine bağlı CPE olarak değerlendirildi. Virüs MDBK hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücrelerde oluşturduğu CPE nedeniyle total hücre canlılığı ve sayısında azalma meydana geldi (Şekil 4.1) Virüs enfeksiyonuna bağlı olarak 48. saatten sonra hücre kaybı MDBK hücrelerinde en yüksek seviyelerde belirlendi. Virüsün titresinin hesaplanmasında da MDBK hücreleri kullanıldı. Titrasyon için mikrotitrasyon ve plak testlerinin (Şekil 4.2) her ikisi de uygulandı. Uygulanacak invitro denemelerinde moi hesaplamaları için her iki testin sonucuda teyit edilerek gerçekleştirildi.



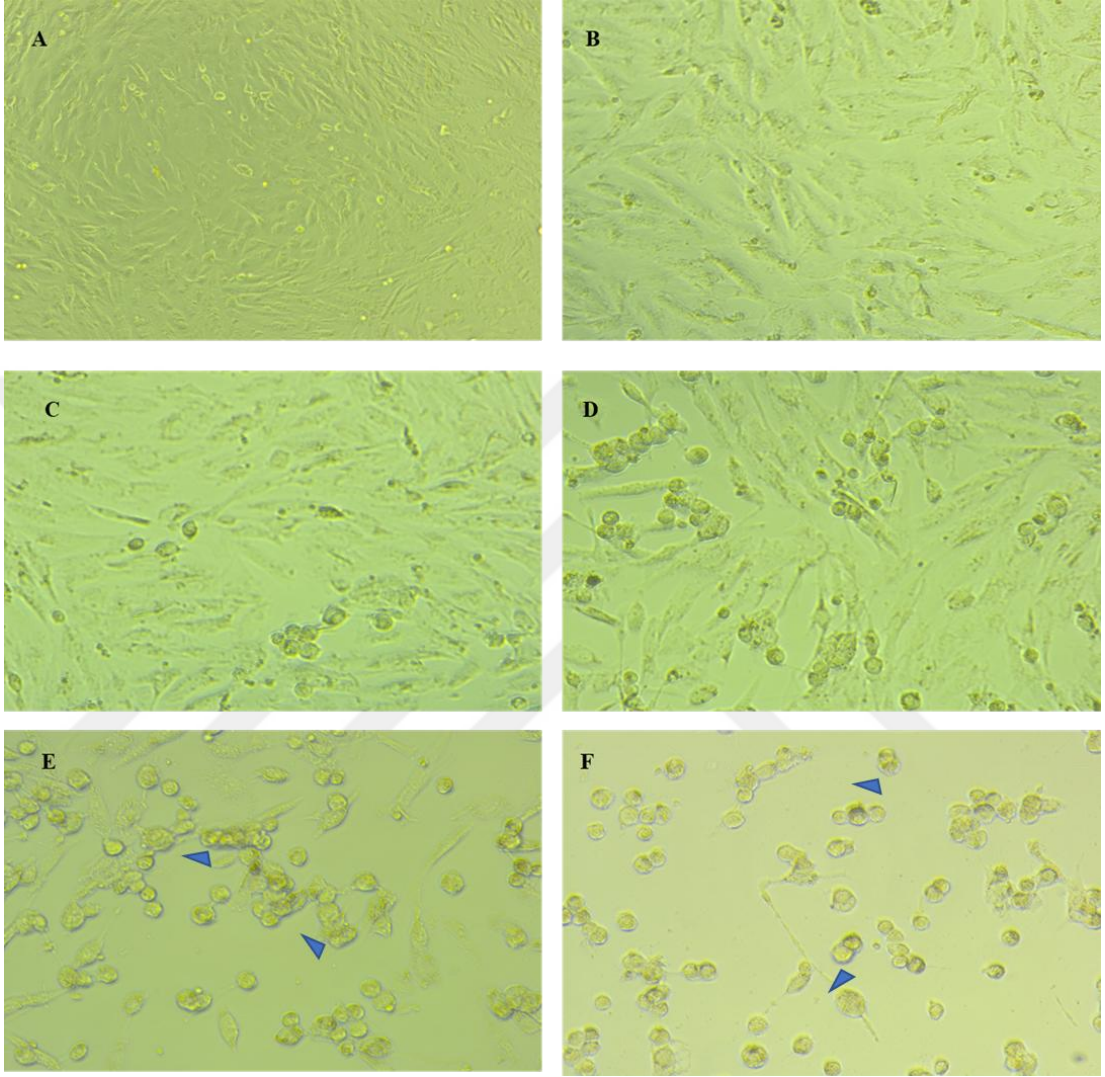
Şekil 4-1 BHV-1 cooper (referans) suşunun MDBK hücresinde üremesi. A) Cooper suşunun 24. saatteki üremesi. B) Cooper suşunun 48. saatteki üremesi (A-10X; B-4X görüntüleme).



Şekil 4-2 96 gözlü pleytlerde uygulanan plak testi sonuçları. A) Plak test sonucuna göre, hücre kontrolün pleyt görüntüsü ve invert mikroskop görüntüsü. B) Plak test sonucuna göre, sayılamayacak kadar çok plak oluşumunu gösteren pleyt görüntüsü ve invert mikroskop görüntüsü. C) Plak test sonucuna göre, virüs kontrolde oluşan plak oluşumunu gösteren pleyt görüntüsü ve invert mikroskop görüntüsü. D) Plak test sonucuna göre, sayılabilecek kadar az sayıda plak oluşumunun pleyt görüntüsü ve invert mikroskop görüntüsü.

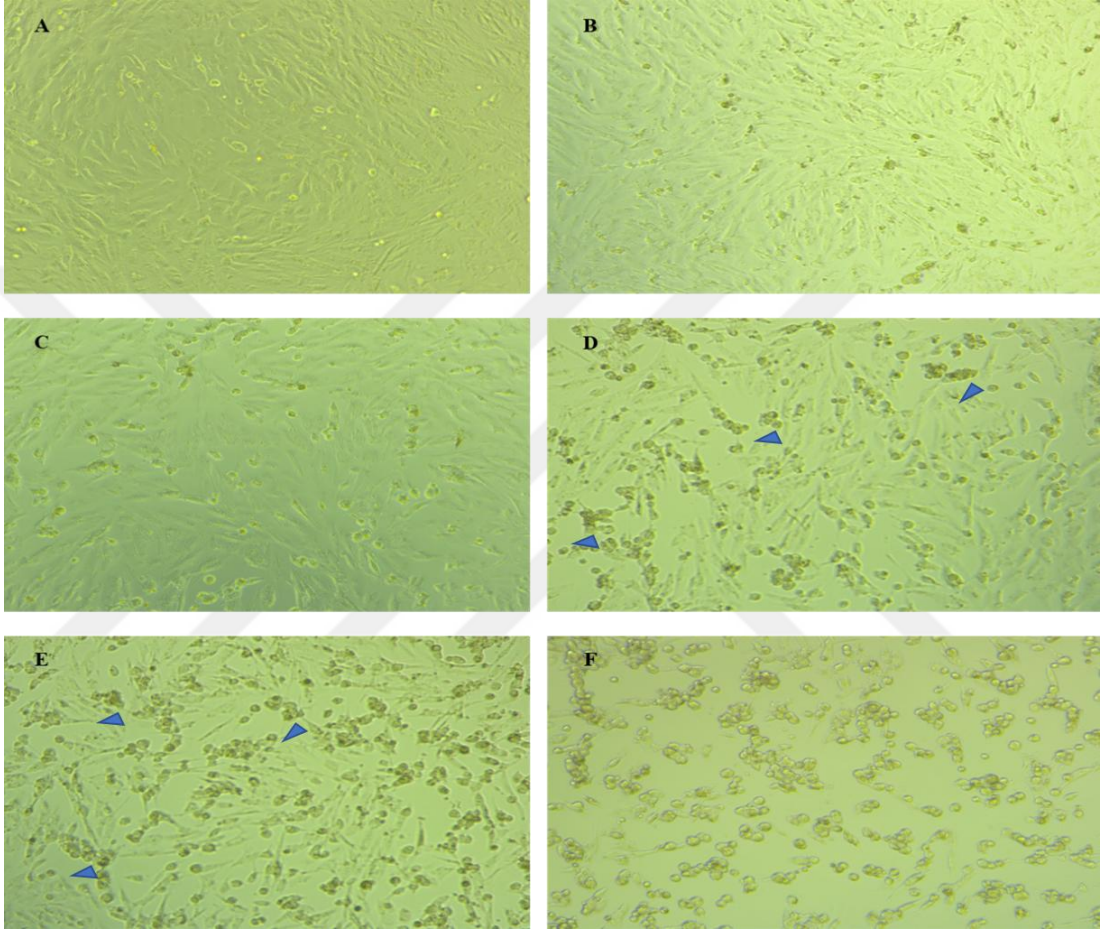
Farklı dozlarda (0,1- 1- 2- 5 -10 moi) hazırlanan BHV-1 ile enfekte edilen A549 hücre hattı mikroskopta günlük takibe alındı. İlk 24 saatlik inkübasyon sonucu

0.1 ve 1 moi virüs ile enfekte hücrelerin hücre kontrole benzer olduğu, 2- 5- 10 moi virüs ile enfekte edilen hücrelerde ise virüs üremesine bağlı CPE oluştuğu ve hücre ayrılmaları ilk 24 saatte başladığı kaydedildi (Şekil 4.3).



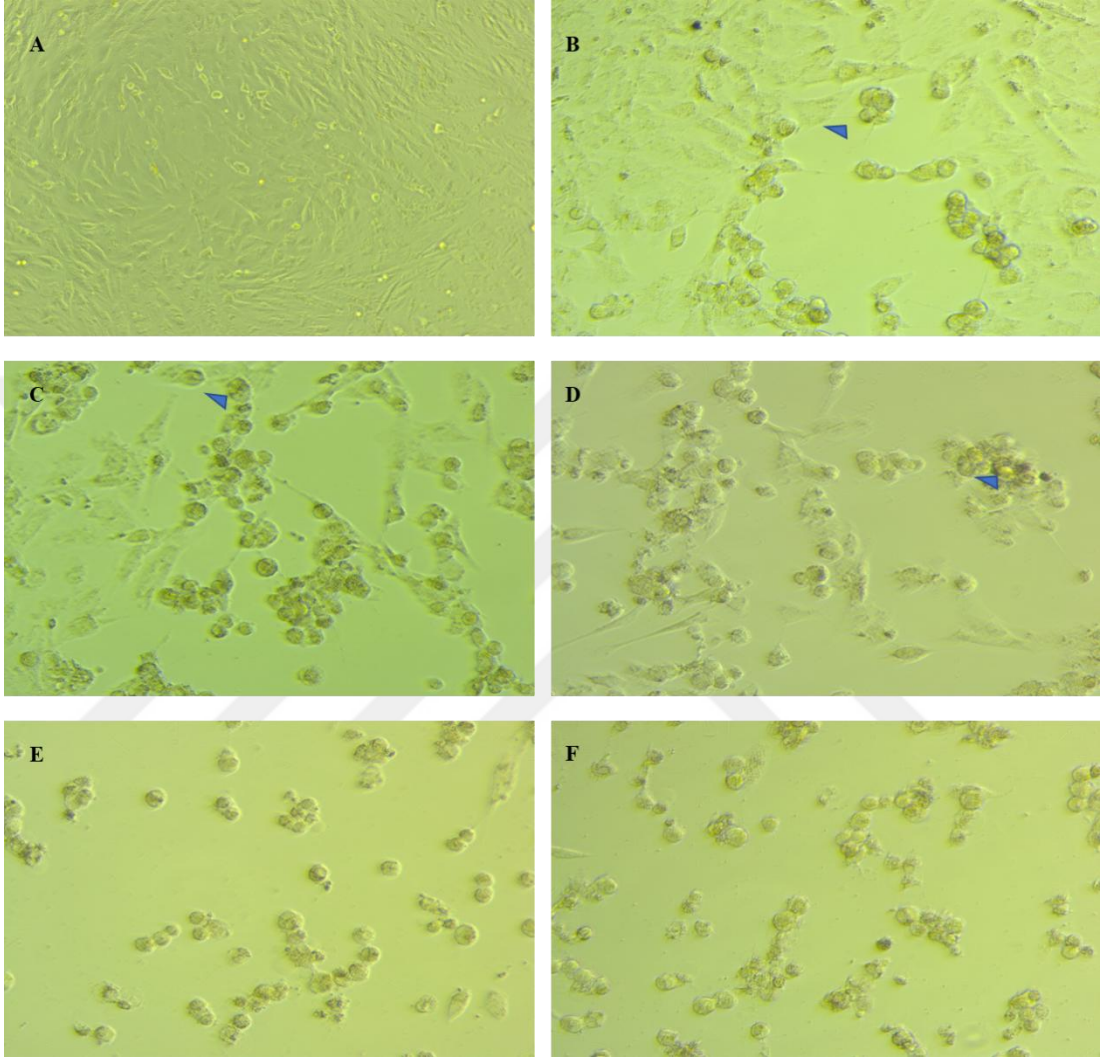
Şekil 4-3 A549 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonda 24. saat mikroskop görüntüleri A) Hücre kontrol B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyongörüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

A549 hücrelerinin BHV-1 ile enfeksiyonunda 30. saatinden sonra yapılan değerlendirmede 10 moi virüs ile enfekte hücrelerde lizis oranı %80 üzeri olduğu belirlendi. 5 moi, 2 moi ve 1 moi BHV-1 ile enfekte hücrelerde yuvarlaklaşma, şekil bozuklukları ve çekirdek parçalanmaları başladığı virüs yoğunluğuna göre arttığı gözlemlendi. (Şekil 4.4).



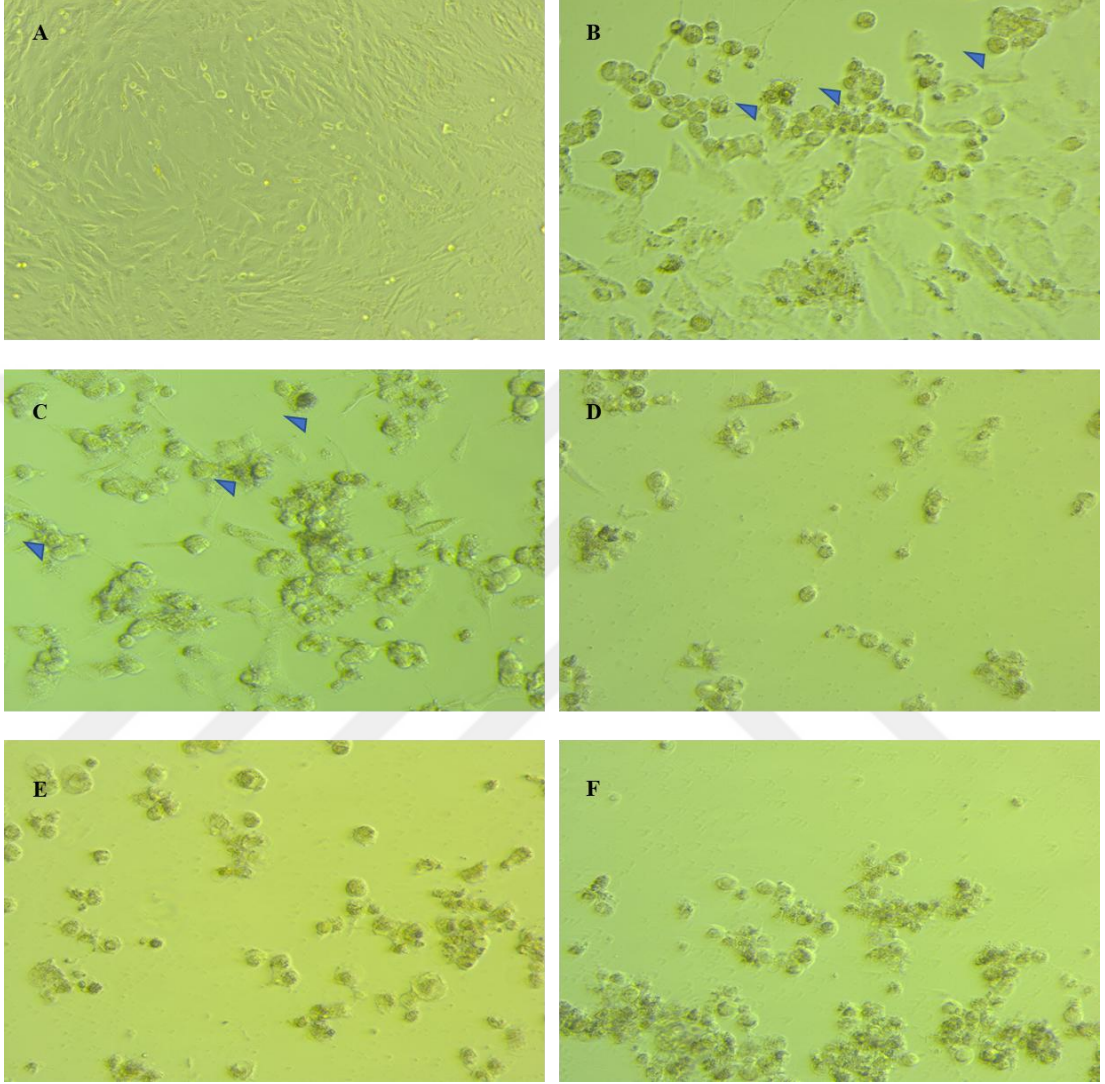
Şekil 4-4 A549 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 30.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

0.1 moi BHV-1 ile enfekte A549 hücrelerinde 48 saat sonrası virüs üretmesine bağlı CPE tespit edildi. Bununla birlikte virüs enfeksiyonunda 48. saat sonrasında, 5 ve 10 moi virüs ile enfekte A549 hücrelerinde lizis tüm alanda görüldü (Şekil 4.5).



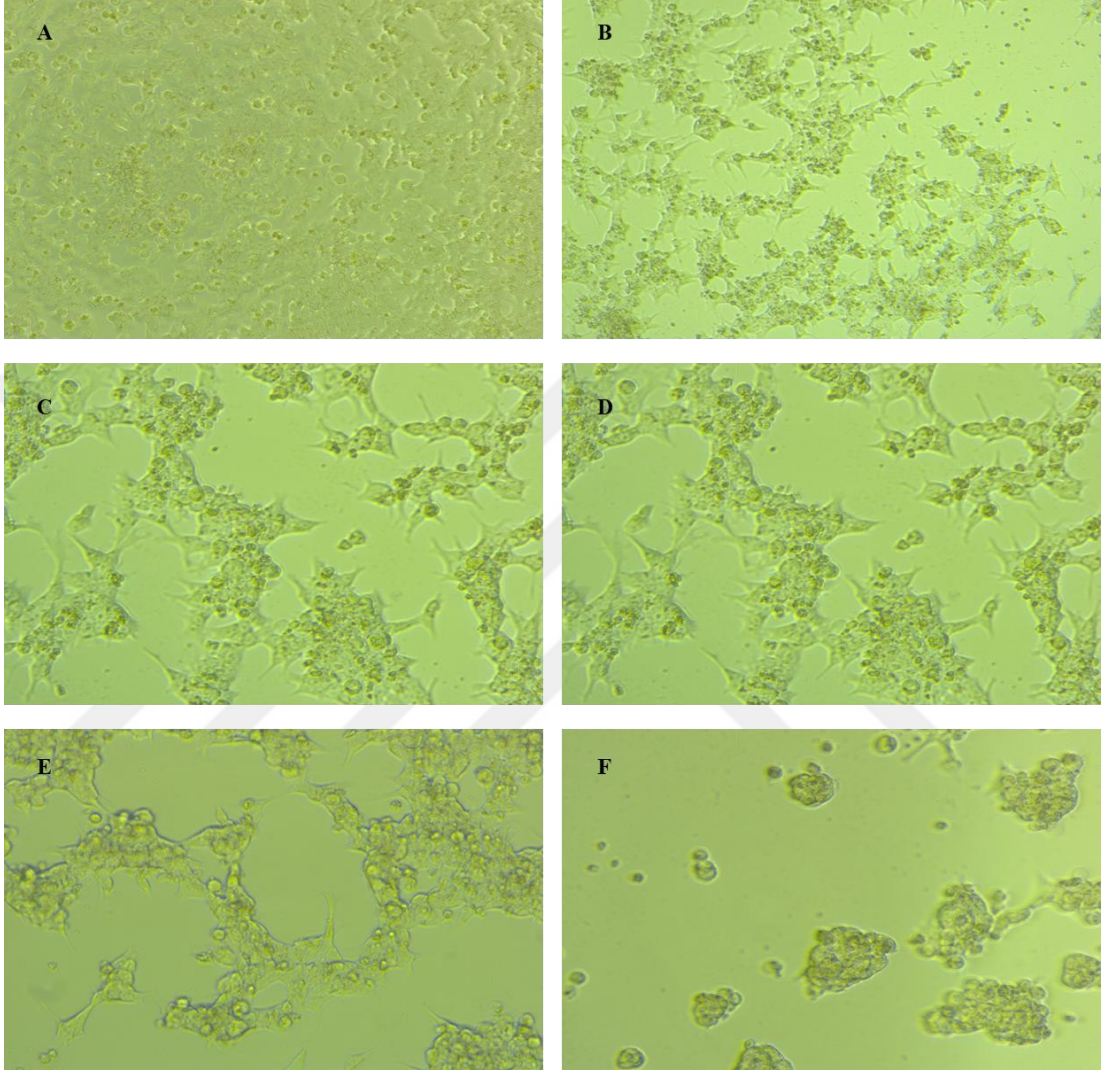
Şekil 4-5 A549 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 enfeksiyonunda 48.saat sonrası mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üretmesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

A549 hücre hattının BHV-1 ile enfeksiyonunda 72 saatlik inkübasyonunda 2, 5 ve 10 moi ile enfekte gruplarda hücre canlılığı görülmedi. 1 ve 0.1 moi'de ise farklı saatlerde uygulanan diğer gruplar gibi hücrelerde CPE görüldü (Şekil 4.6).



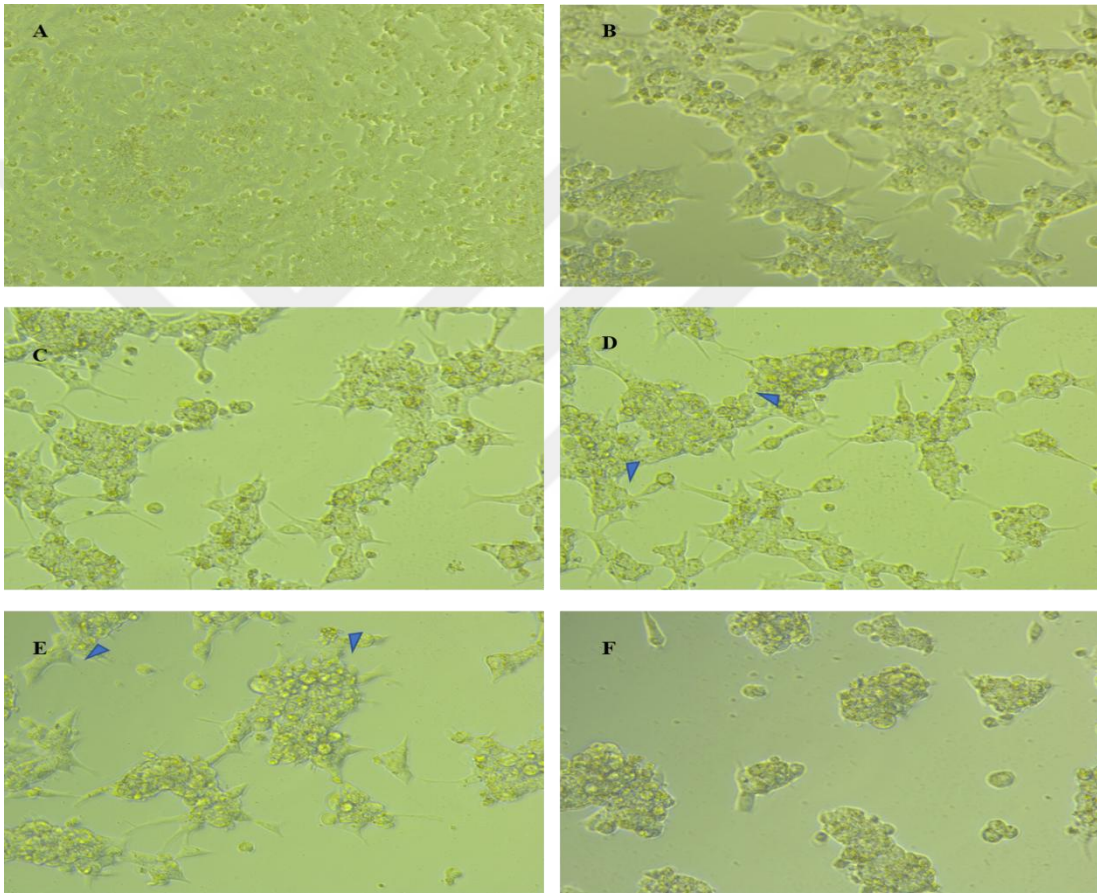
Şekil 4-6 A549 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 72.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol B) 0.1 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

DU145 hücre hattının BHV-1 ile enfeksiyonunda hücrelerde CPE oluşması 24 saat itibariyle tespit edildi. Virüsün üreme hızı ve hücre morfolojisine etkisi MDBK hücrelerindeki değişikliklere çok benzer olarak gözlemlendi (Şekil 4.7).

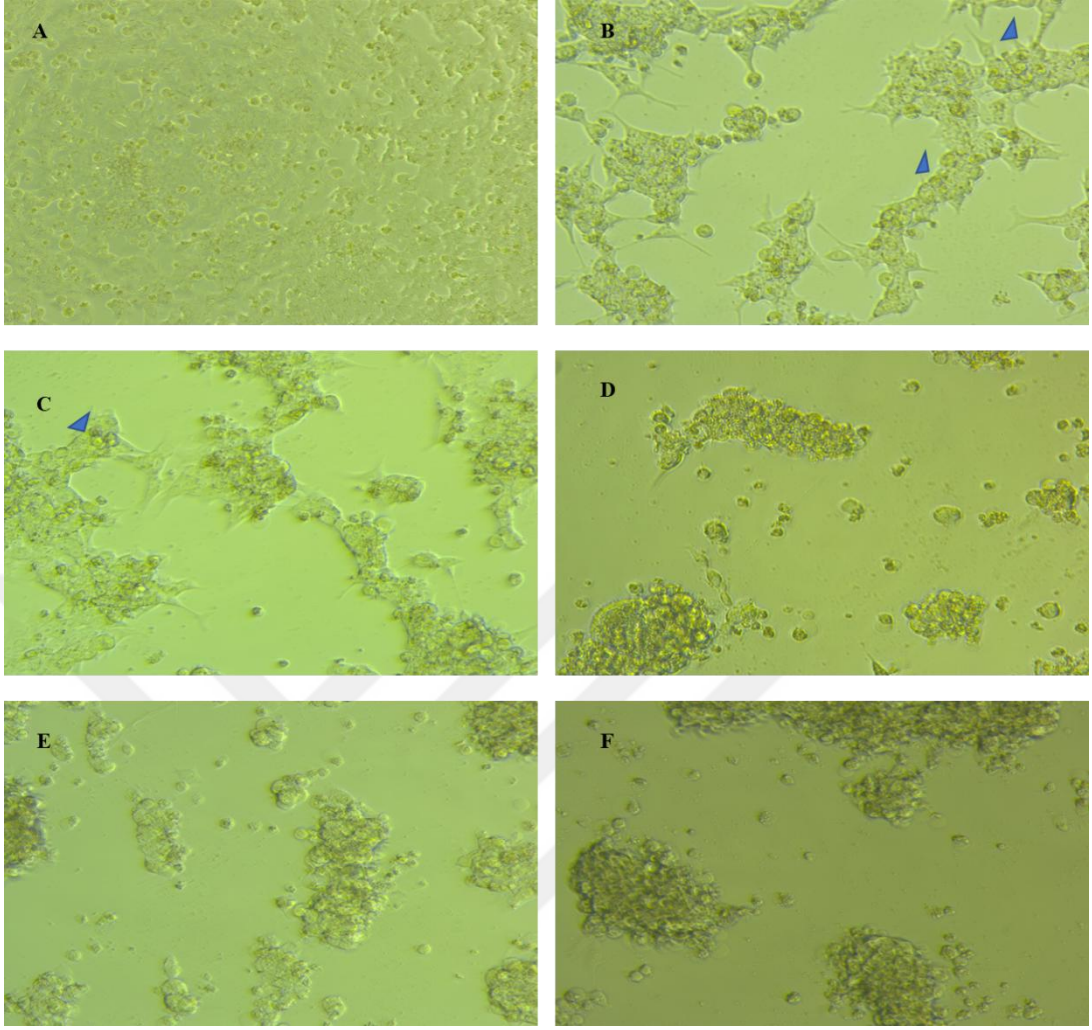


Şekil 4-7 DU145 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 0 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

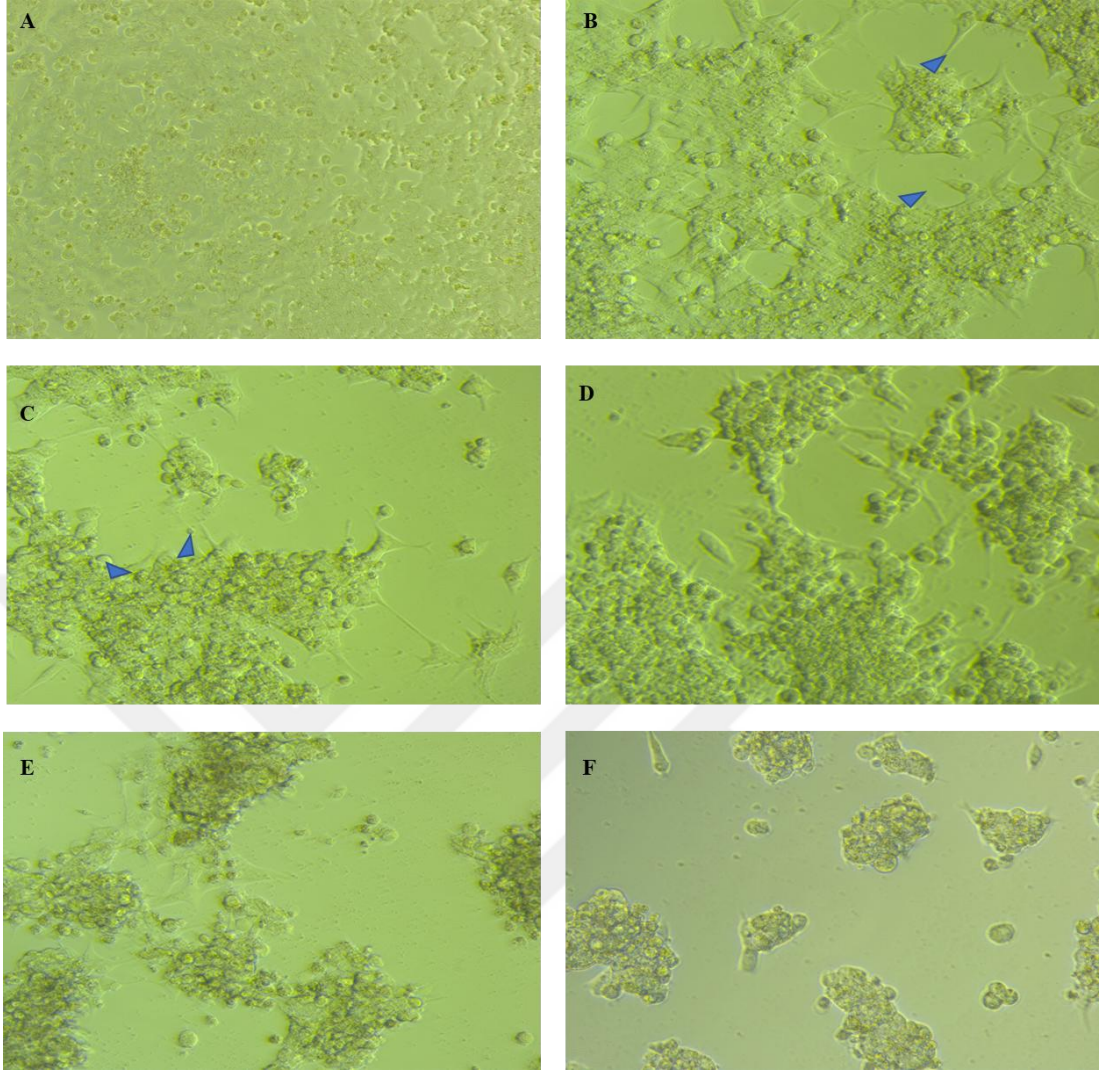
DU145 hücrelerinde, 0,1 ve 1 moi oranındaki virüsün yaptığı etki ilk 24 ve 30.saatlerde yer yer balonlaşma ve yuvarlaşma şeklinde CPE görülürken, 48.saatten sonra hücrelerde lizisin yoğun olduğu tespit edildi. Diğer virüs sulandırmalarında bağlı hücresel değişiklikler ilk 24 saatte gelişmeye başlarken 48. saatten sonra tüm hücrelerin lize olduğu görüldü. Enfeksiyonun 72. saati itibariyle tüm gruplarda hücre lizisi artışına bağlı CPE ler yaygın olarak görüldü (Şekil 4.8). (Şekil 4.9) (Şekil 4.10).



Şekil 4-8 DU145 hücre hattının farklı dozlarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 30.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok çekirdeğinde virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

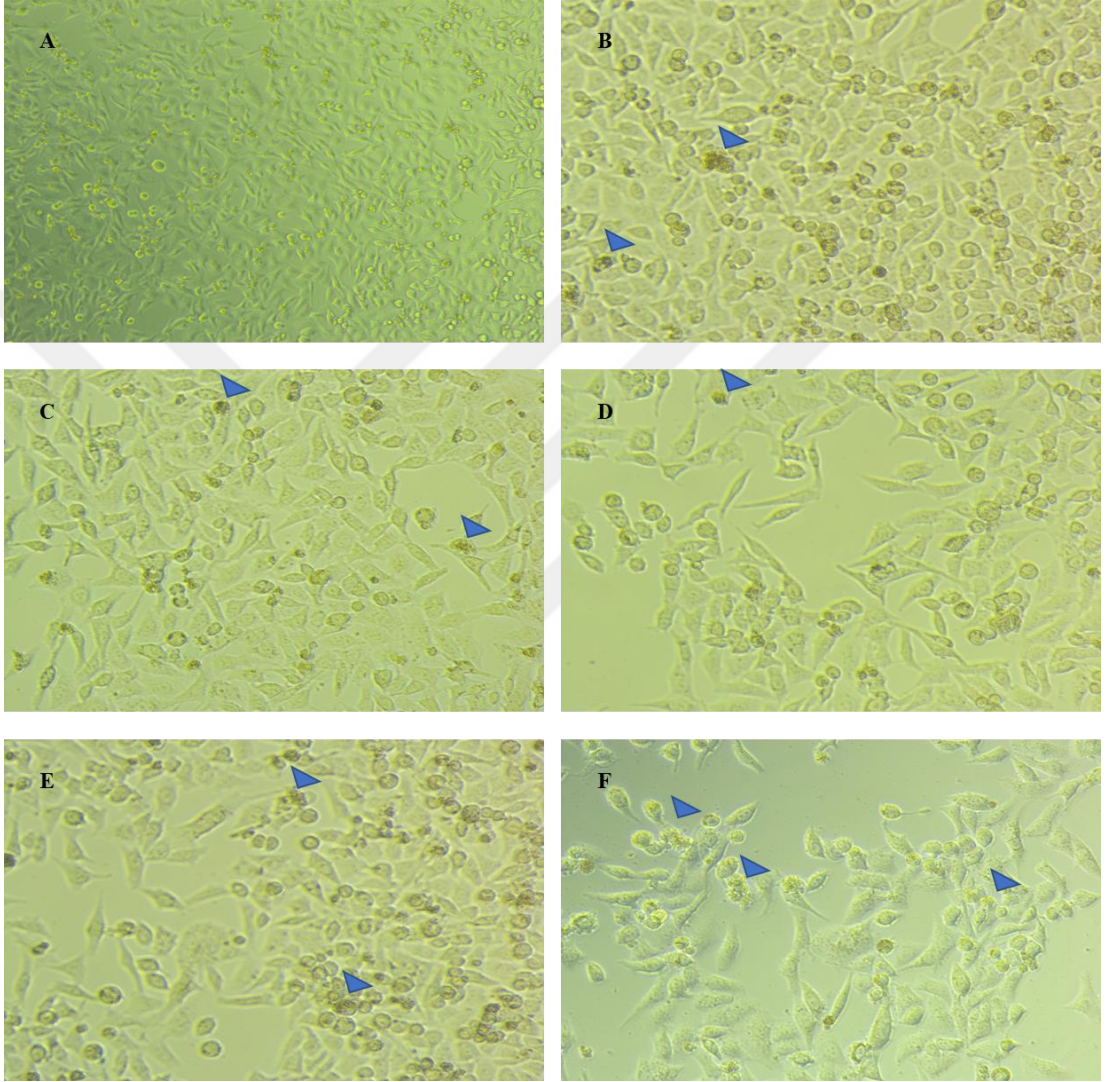


Şekil 4-9 DU145 hücre hattının farklı sulandırmalardaki BHV-1 ile enfeksiyonunda 48.saatten sonraki mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, D, E, F- 10X görüntüleme).

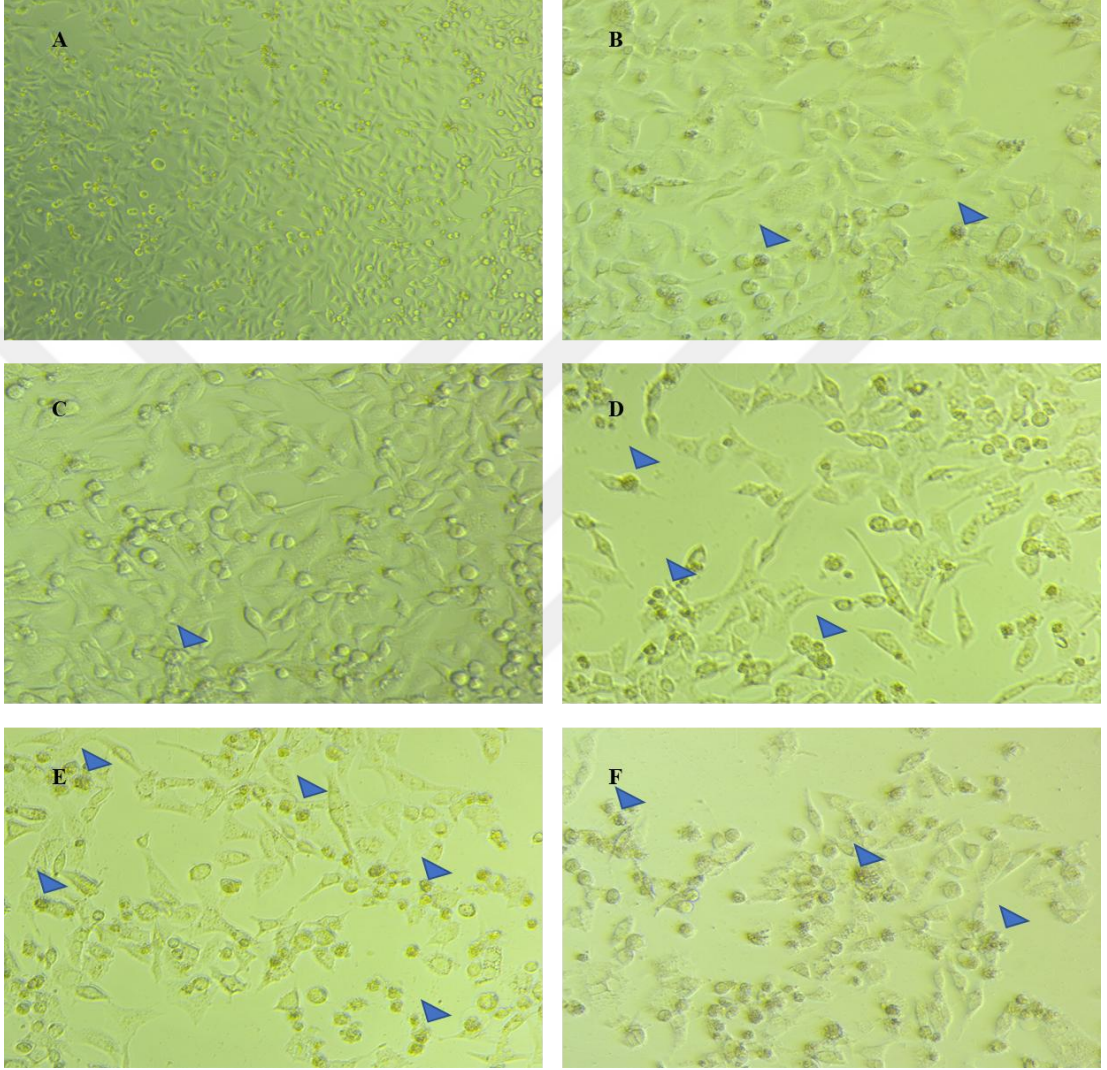


Şekil 4-10 DU145 hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 72.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

Hela hücrelerini farklı sulandırmalardaki BHV-1 ile enfeksiyonun 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda 0,1, 1 ,2 ,5 ve 10 moi ile enfekte edilen gruplarda hücrelerde balonlaşma ve yuvarlaklaşma görüldü (Şekil 4.11) (Şekil 4.12).

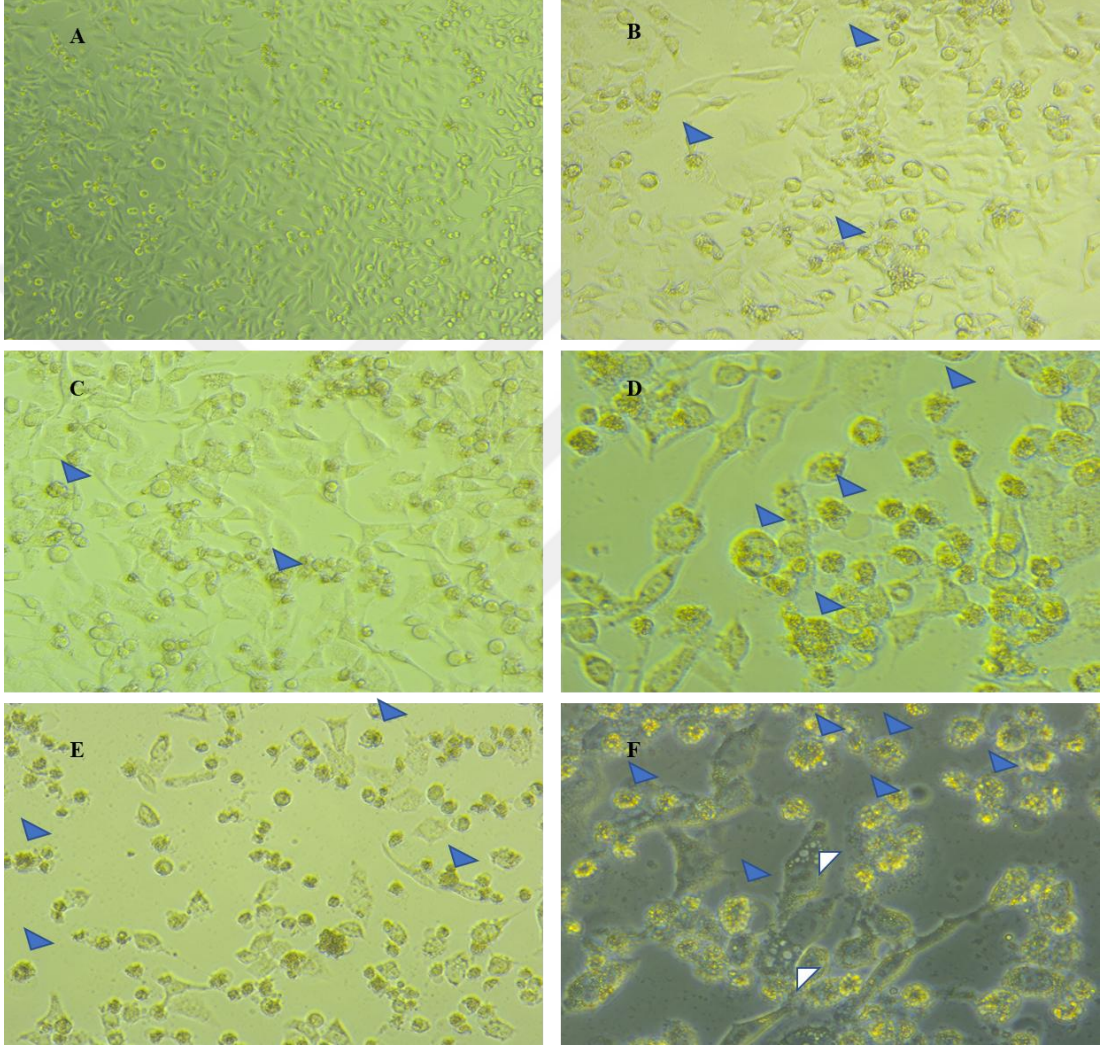


Şekil 4-11 Hela hücre hattının farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 24.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).



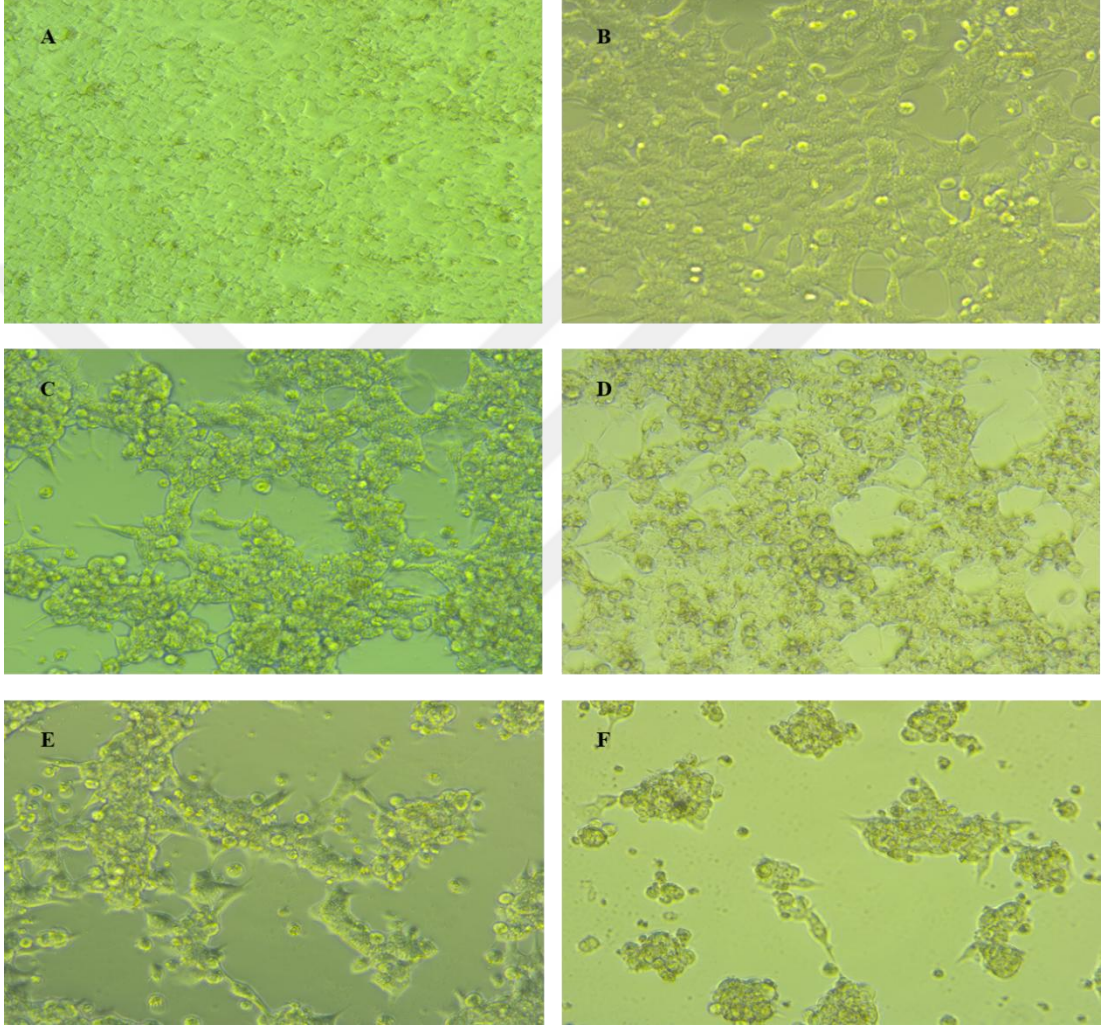
Şekil 4-12 Hela hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 48.saatten sonraki mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

Hela hücrelerinin BHV-1'in farklı sulandırmaları ile enfeksiyonunda inkübasyon süresinin 72. saatinde hücre canlılığı büyük oranda azaldığı görüldü. Aynı zamanda 0.1, 1, 2, 5 ve 10 moi ile enfekte edilen hela hücrelerde vakuoller gözlemlendi. Bununla birlikte 10 moi'de vakuol benzeri yapılar görünmeye başladı (Şekil 4.13).



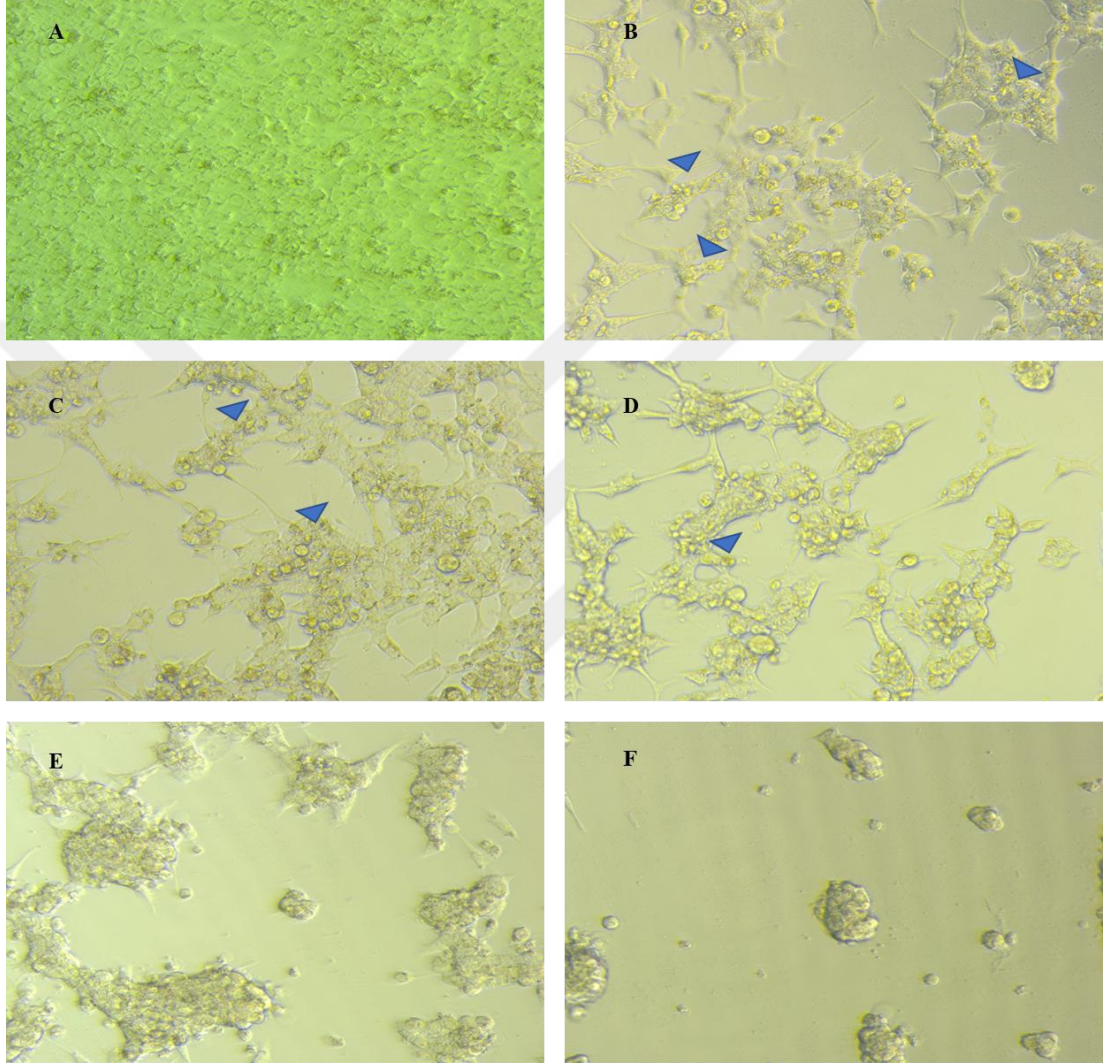
Şekil 4-13 Hela hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 72.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moiBHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri,beyaz ok ise, vakuol benzeri yapıları göstermektedir (A-4X; B, C, E-10X; D, F-20X görüntüleme).

PC3 hücrelerinin BHV-1 ile enfekte edilmesi sonrası ilk 24 saatte hücrelerde virüs üremesine bağlı CPE gözlemlendi. DU145 hücreleri gibi diğer gruplara göre hücre canlılığı hızlı bir şekilde azaldı. 24 saatlik inkübasyon sonrası 10 moi ile enfekte gruplarda hücre canlılığı neredeyse yoktu. 24 saatlik inkübasyonda 0.1 moi ile enfekte gruplar hücre kontrole yakın iken, 1, 2, 5 moi de CPE görüldü (Şekil 4.14).



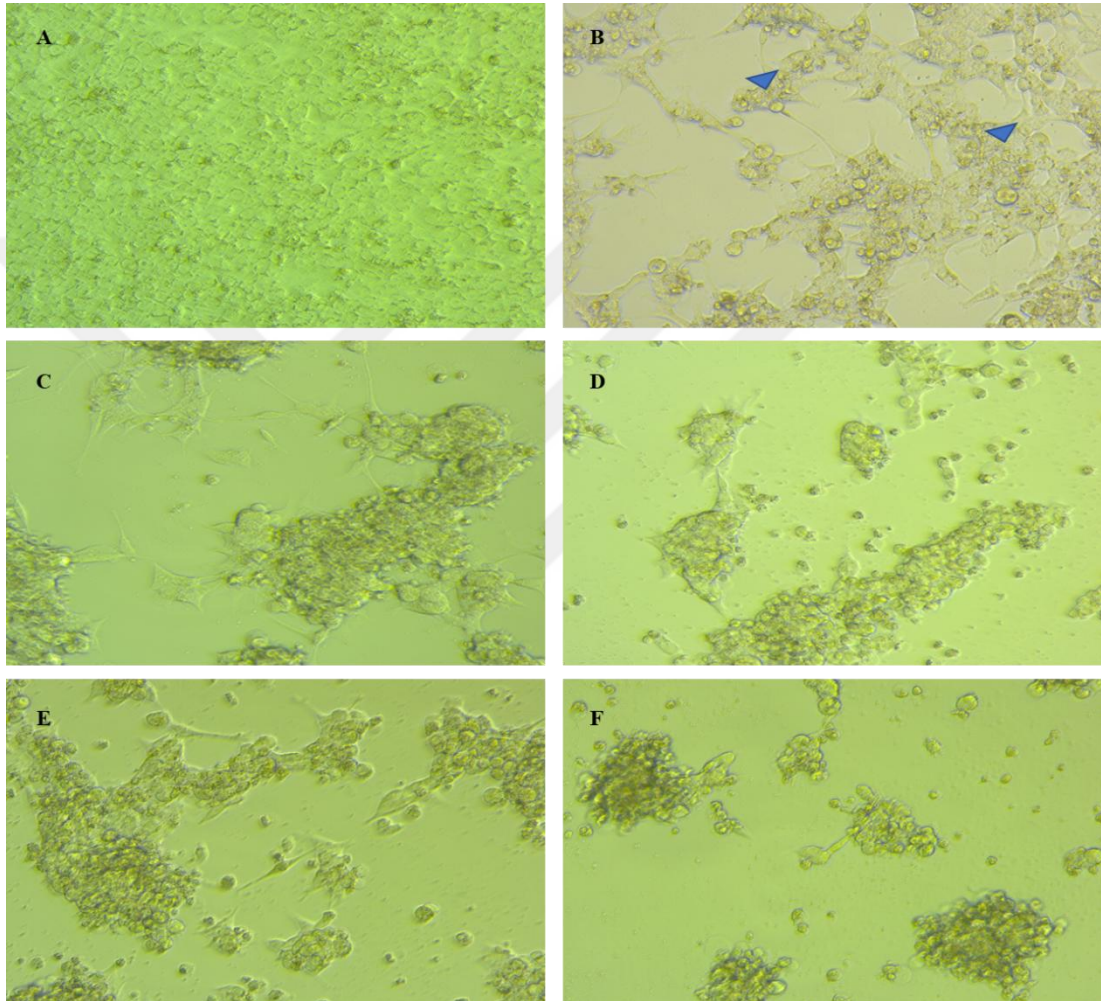
Şekil 4-14 PC3 hücre hattının farklı sulandırılmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 24.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü (A-4X; B, C, D, E, F-10X görüntüleme).

PC3 hücrelerindeki enfeksiyonda 30. saat sonrasında 5 ve 10 moi virus enfekte hücrelerde canlılık oranı %10'un altına düştü. Bununla birlikte 0.1, 1 ve 2 moi ile enfekte gruplarda hücrelerde virüs üremesine bağlı değişiklikler, lizis gözlemlendi (Şekil 4.15).

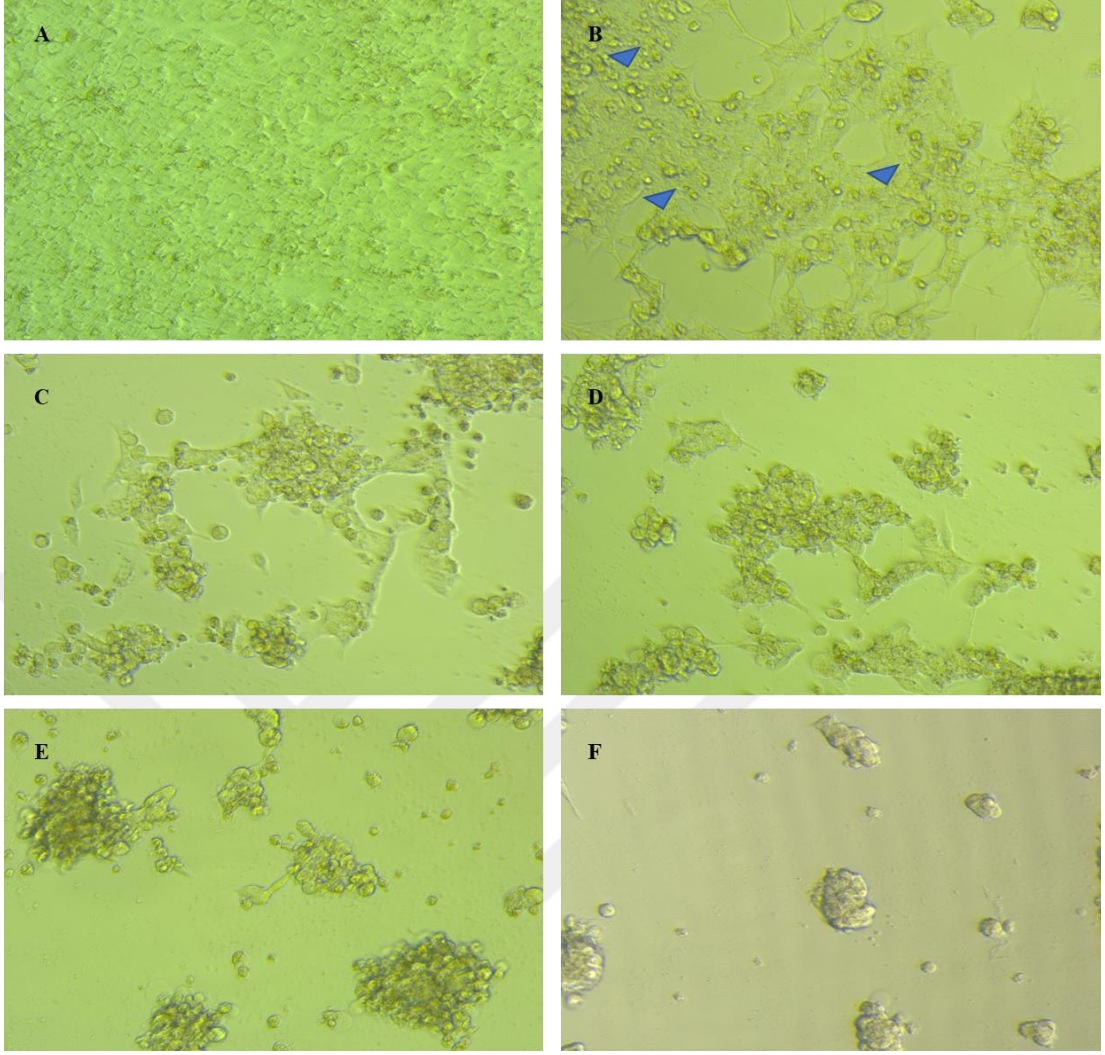


Şekil 4-15 PC3 hücrelerinde farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 30.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, D, E, F-10X görüntüleme).

Enfekte PC3 hücrelerinin 50 ve 72 saatlik inkübasyonu sonrasında, 0.1 moi ile enfekte edilen gruptaki hücrelerde de lizisler görüldü. Diğer 1, 2, 5 ve 10 moi ile enfekte gruplarda BHV-1 enfeksiyonuna bağlı olarak ölümü %90 -100 oranlarında gerçekleşti (Şekil4.16) (Şekil 4.17).

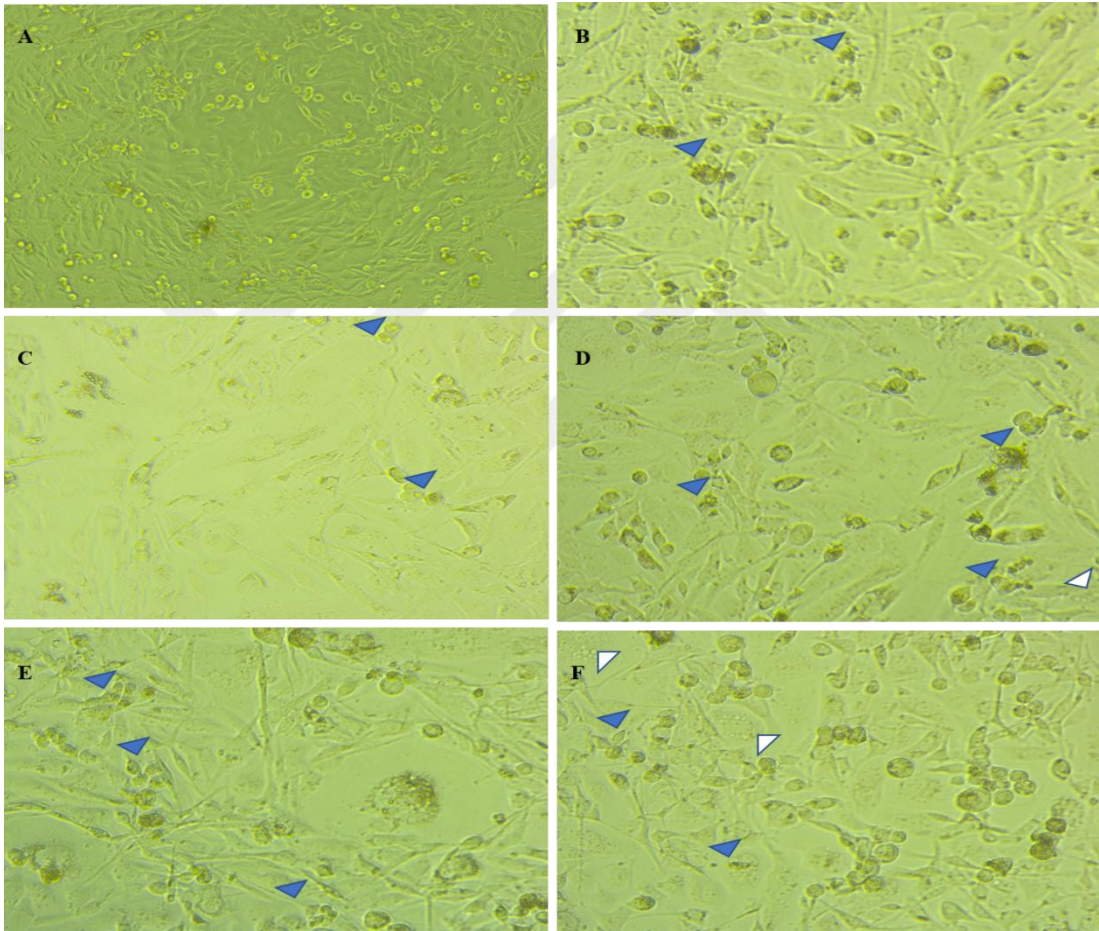


Şekil 4-16 PC3 hücrelerinin farklı sulandırılmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 48.saatten sonraki mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, D, E, F-10X görüntüleme).

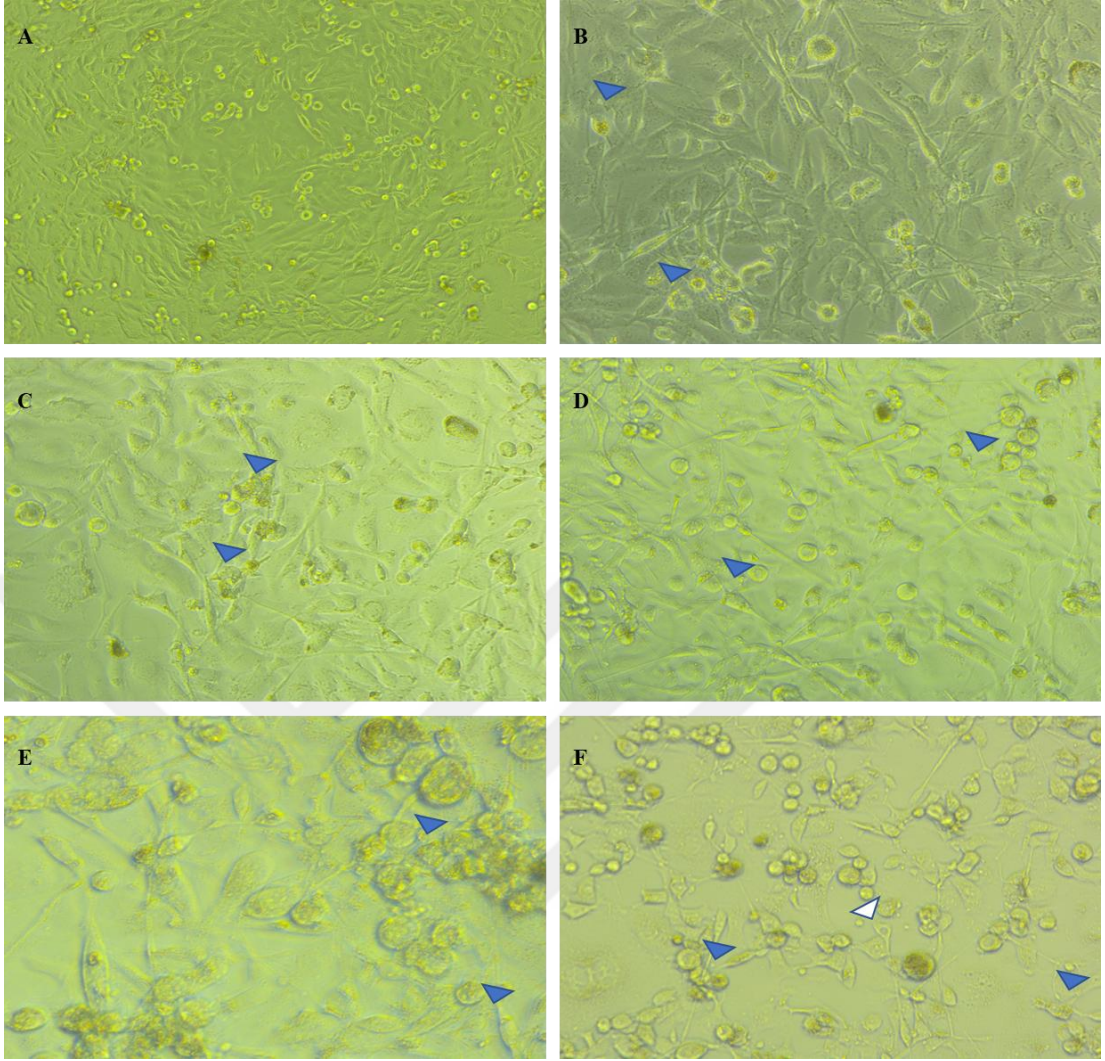


Şekil 4-17 PC3 hücrelerinde farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 72.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, D, E, F-10X görüntüleme).

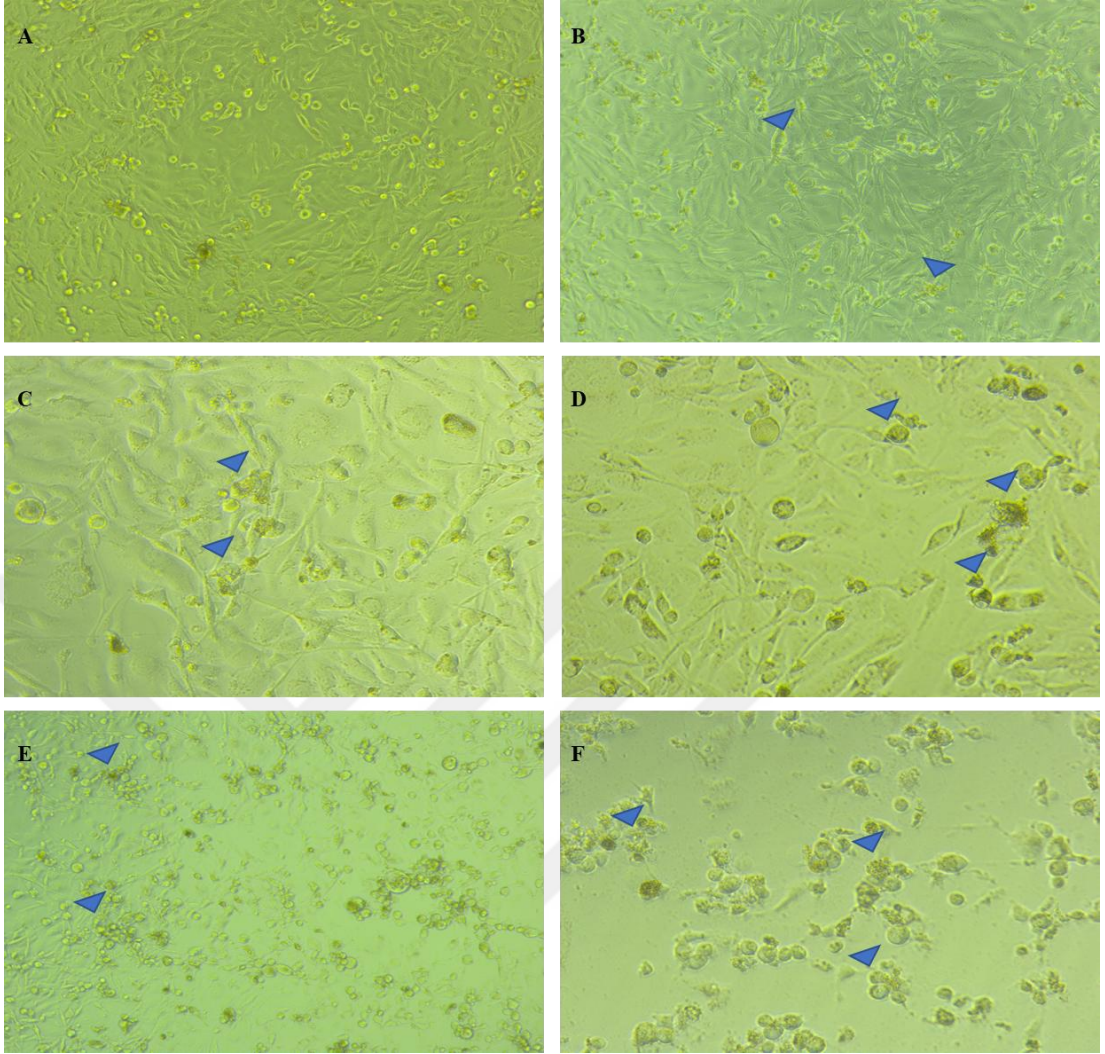
BHV-1'in farklı sulandırmalarda MDA-MB-231 hücrelerinin enfeksiyonunda 16 ve 24 saatlik inkübasyonu sonrasında incelenen gruplardan 0.1, 1, 2, 5 ve 10 moi ile enfekte hücrelerde farklılıklar gözlemlendi. Bununla birlikte 2 ve 10 moi ile enfekte gruplarda Hela hücrelerinde vakuoller görüldü (Şekil 4.18). Enfeksiyonun 48. ve 72. saatlerde zamana bağlı tüm gruplarda hücrelerdeki patolojik değişiklikler artışı gözlemlendi (Şekil 4.18) (Şekil 4.19) (Şekil 4.20) (Şekil 4.21).



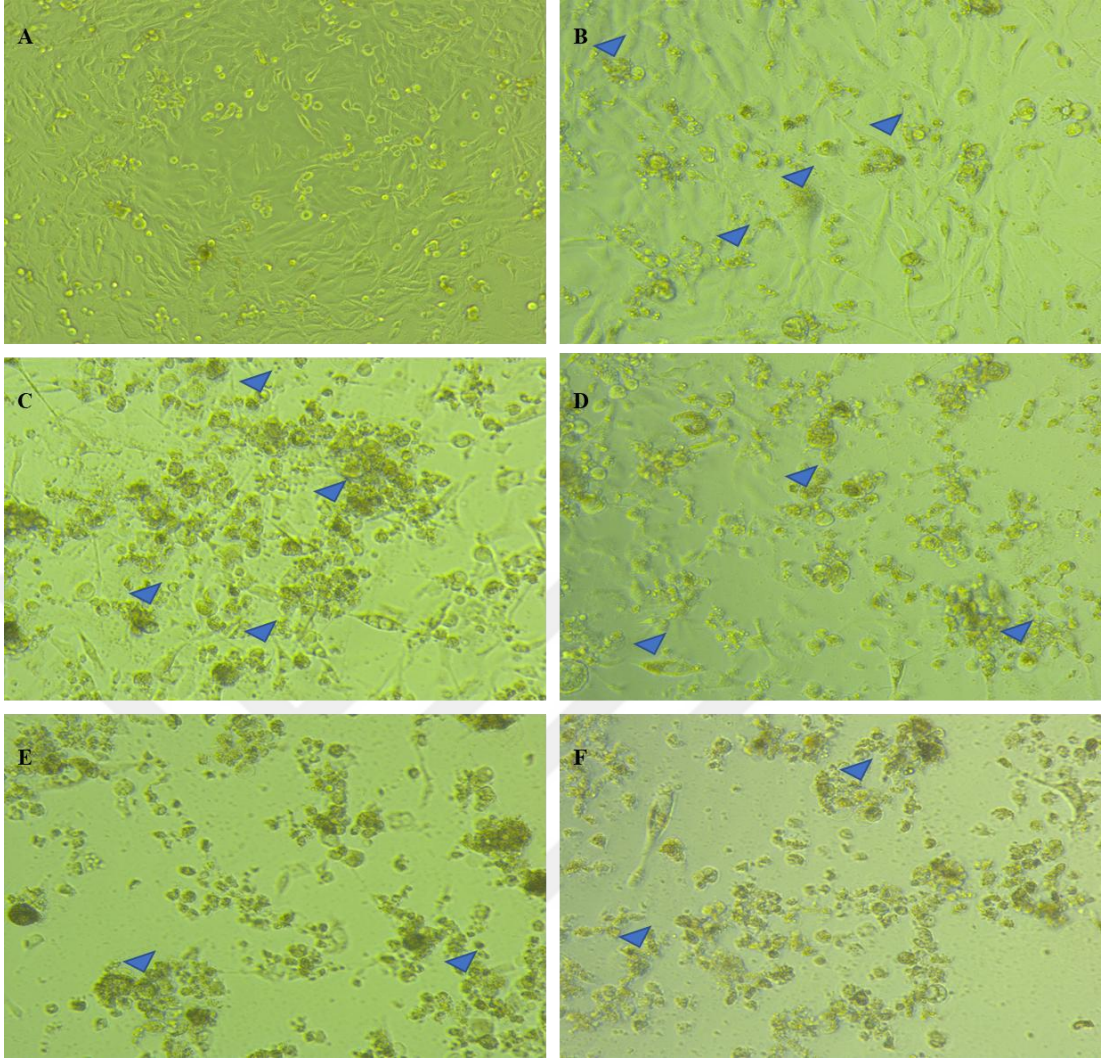
Şekil 4-18 MDA-MB-231 hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 16.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol , B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri,beyaz ok ise, vakoul benzeri yapıları göstermektedir (A-4X; B, C, D, E, F-10X görüntüleme).



Şekil 4-19 MDA-MB-231 hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 24. saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyongörüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri, beyaz ok ise, vakoul benzeri yapıları göstermektedir (A-4X; B, C, D, F-10X; E-20X görüntüleme).



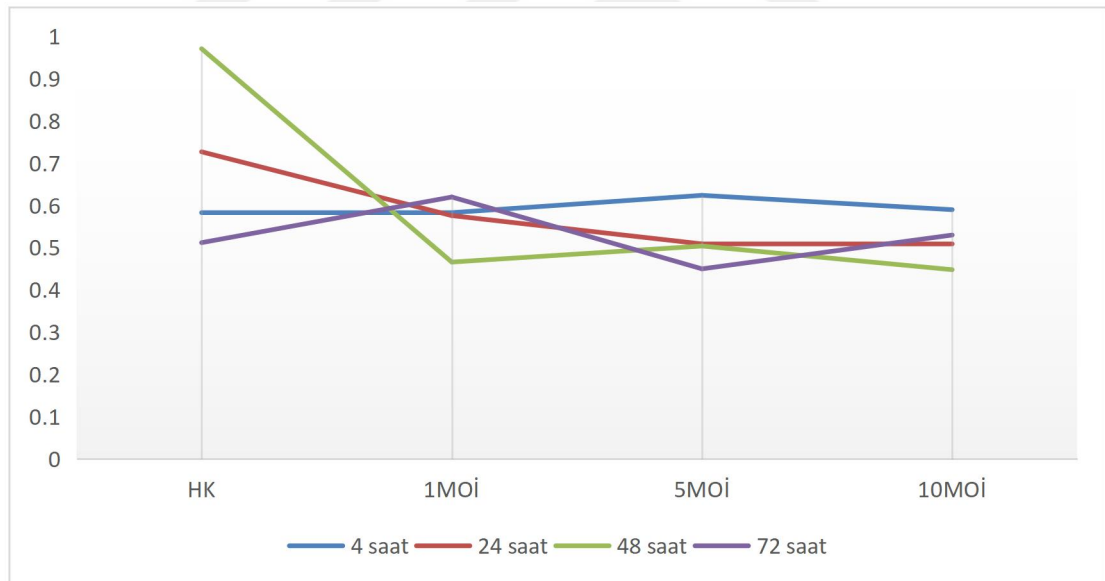
Şekil 4-20 MDA-MB-231 hücrelerinin farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 48. saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, D, F-10X; E-20X görüntüleme).



Şekil 4-21 MDA-MB-231 hücrelerinde farklı sulandırmalarda BHV-1 ile enfeksiyonunda 72.saat mikroskop görüntüleri. A) Hücre kontrol, B) 0.1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, C) 1 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, D) 2 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, E) 5 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü, F) 10 moi BHV-1 ile enfeksiyon görüntüsü. Mavi ok virüs üremesine bağlı değişiklik meydana gelen hücreleri göstermektedir (A-4X; B, C, D, F-10X; E-20X görüntüleme).

4.2. MTT Testinin Sonuçları

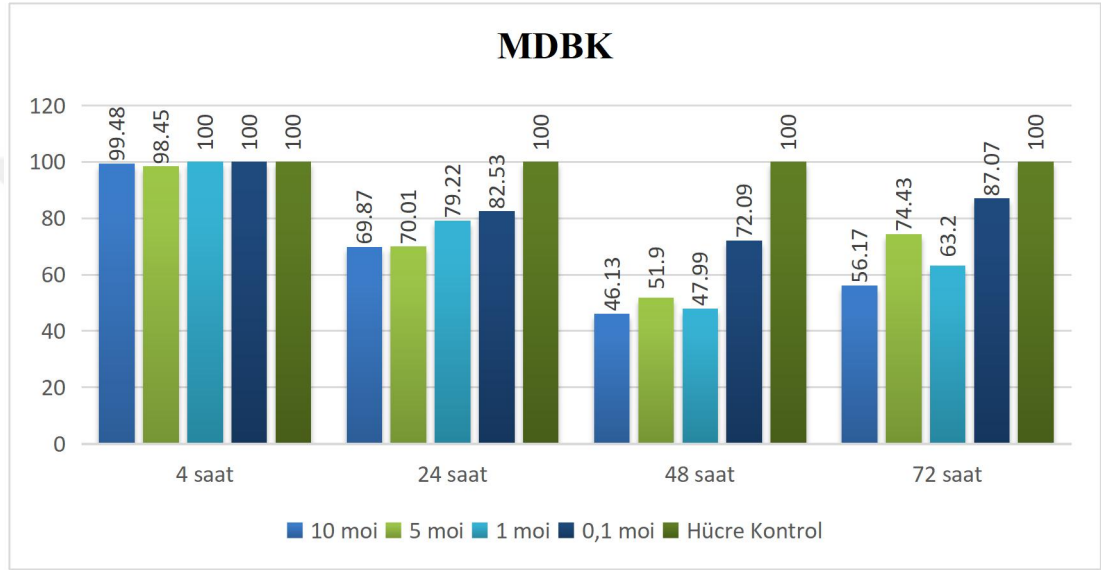
BHV-1'in farklı dozlarının akciğer kanser hücre hattı A549, meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231, prostat kanseri hücre hatları DU145 ve PC3, serviks kanseri hücre hattı hela üzerine sitotoksik etkisi belirlemek amacı ile hücreler 0.1 moi, 1 moi, 5 moi ve 10 moi dozunda BHV-1 ile enfekte edildi ve 4, 16, 24 ve 48 saat inkübe edildi. MTT testi ile sitotoksikite ve yüzde canlılık oranları belirlendi. Değerlendirmede doza ve zamana bağlı olarak değişim hücre kontrole kıyaslanarak yapıldı. Testin standardizasyonu MDBK hücreleri kullanılarak uygulandı. MDBK hücrelerinde, hücre kontrole göre 4., 24., 48. ve 72. saatlerdeki analizlere göre zaman ve doza bağlı hücre canlılığı önemli ölçüde düştüğü belirlendi. Özellikle 48. saatte 0,1 moi (%72,09), 1 moi (%47,9), 5 moi (%51,9) ve 10 moi (%46,13) virüs enfeksiyonuna bağlı hücre canlılığında belirgin düşüş not edildi (Şekil 4. 22).



Şekil 4-22 BHV-1 ile enfekte MDBK hücrelerinde zamana ve virüs dozuna bağlı olarak hücre canlılığının MTT testiyle belirlenmesi. HK: Hücre kontrol.

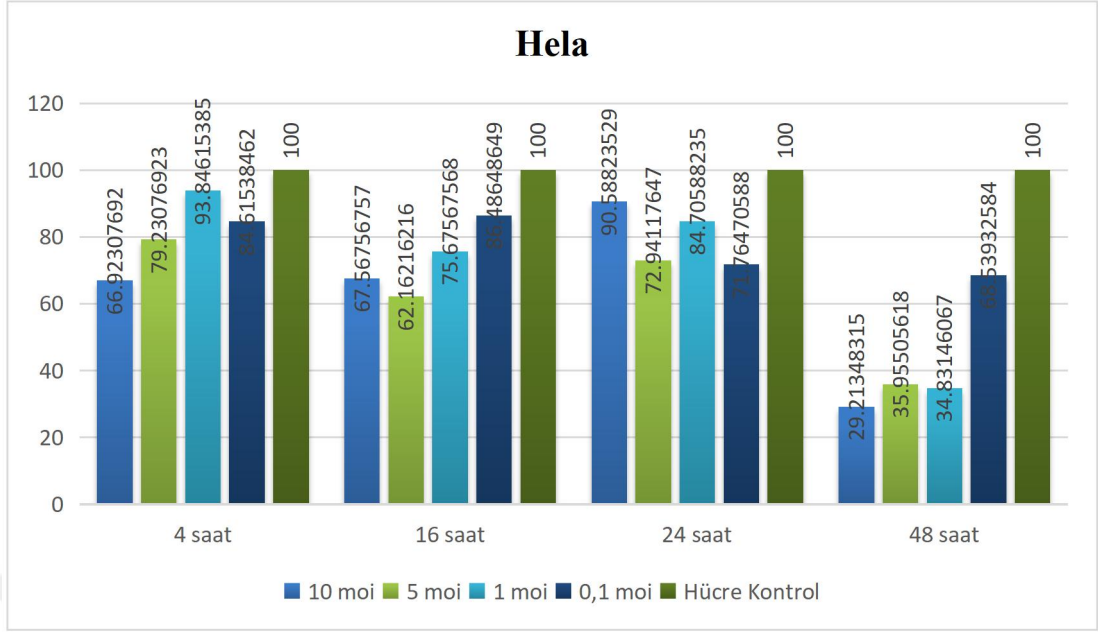
Bununla birlikte BHV-1'in MDBK hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi 24. saatte sitotoksik etkinin başladığı hatta 5 ve 10 moi'lik dozda sitotoksik

etkinin %30'lara kadar yükseldiği görülürken, hücre canlılığı %70'lere kadar azaldığı görüldü. 72. saatte ise, 10 moi'lik dozda en yüksek oranda sitotoksik etki görüldü. 48. saatte görülen sitotoksik etki %50'nin üzerine çıkarken, hücre canlılığı %50'nin altına düştü. Virüs üremesine bağlı hücre kayıplarının yüksek olmasından dolayı ileri saatlerde testin değerlendirilmesinden kaçınıldı. Özellikle ilk 48 saatlik inkübasyon süreci MTT testleriyle incelendi ve diğer hücelere de uygulandı (Şekil 4. 23).



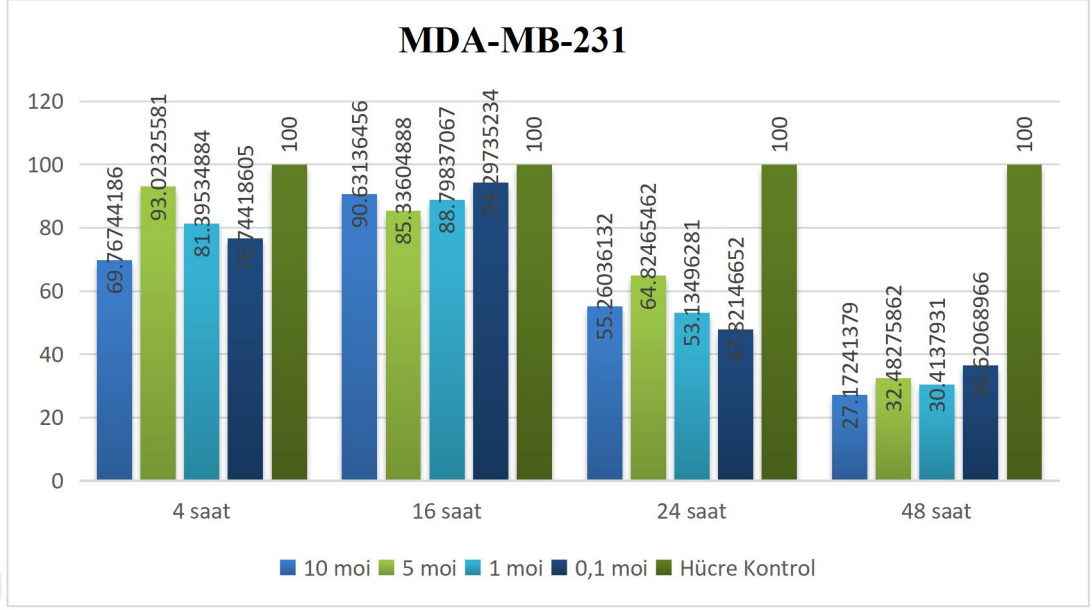
Şekil 4-23 MDBK hücre hattının BHV-1'in farklı sulandırmalarla enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisiteyi gösteren grafik.

Hela hücrelerinde yapılan MTT testi sonucunda; 4. saatte 0.1, 1, 5 ve 10 moi'lik sulandırılan virüs enfekte hücrelerde canlılık değerleri kontrole göre düşük seyretti. Inkübasyon sürelerinden özellikle 48. saatte sitotoksik etki düzeyi tüm sulandırmalarda çok yükseldi, hücre canlılığı azaldı. 10 moi virüs enfekte hücrelerdeki kuyucuklarda sitotoksik etki %70'lere çıktığı görüldü. Özellikle 10, 5 ve 1 moi virüs ile enfekte hücrelerde sitotoksisite daha yüksek seyretti. Virüs üremesinin hücrelerde sitotoksisite doza ve zamana bağlı doğru orantılı olarak arttığı kaydedildi (Şekil 4. 24).



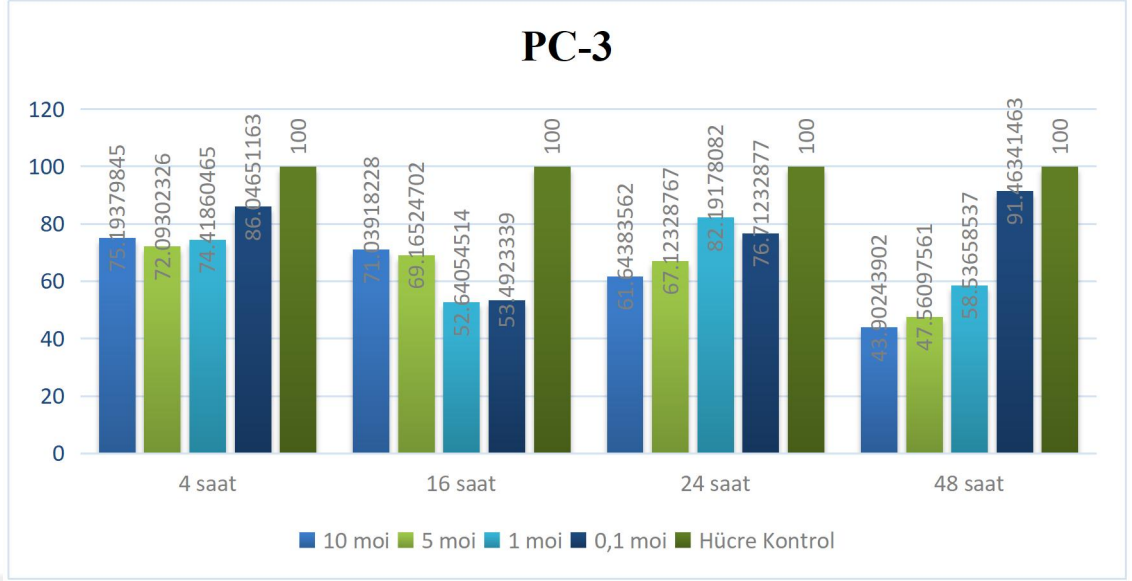
Şekil 4- 24 Hela hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisiteyi gösteren grafik.

MDA-MB-231 hücresinde, BHV-1 sitotoksik etkisi MDBK hücresine kıyasla daha etken başladığı görüldü. 4. saatte 10 moi virüs ile enfekte kuyucuklarda sitotoksisite %30'lara çıkarken hücre canlılığı %70'lere düştüğü belirlendi. Tüm virüs sulandırılmalarında ki sitotoksik etki hücre kontrolüne göre en belirgin 24.saatte başladığı kaydedildi. 24. ve 48. saatte hücre canlılığı önemli ölçüde düştü. Özellikle 48. saatte 10 moi ile enfeksiyonda sitotoksik etki %70'lere kadar çıkarken hücre canlılığı %27'lara kadar düştüğü görüldü. Virüs üremesine hücrelerde sitotoksiste doza ve zamana bağlı doğru orantılı arttığı kaydedildi (Şekil 4.25).



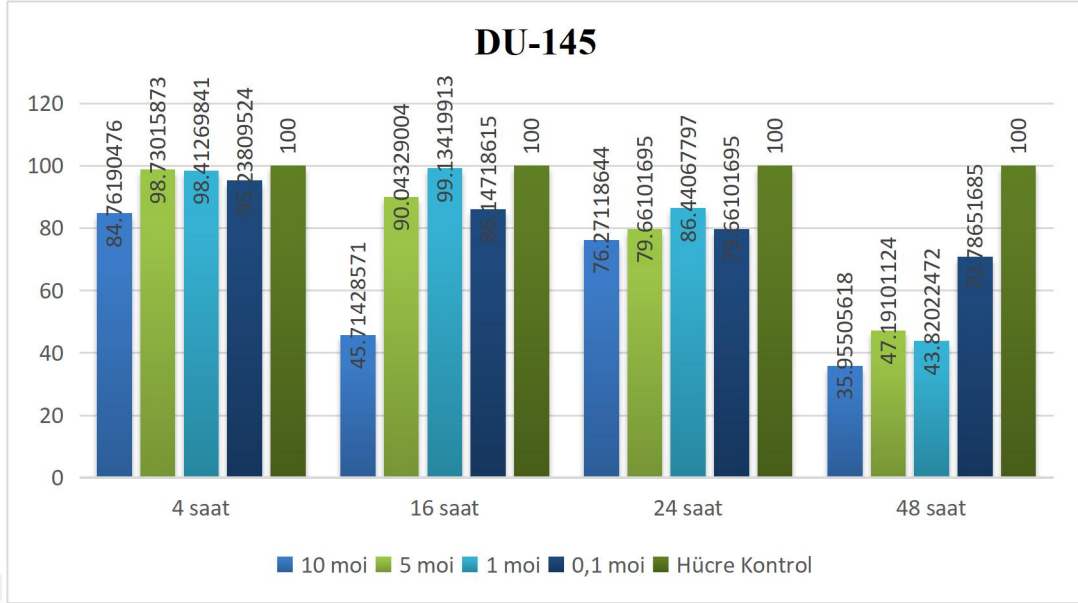
Şekil 4-25 MDA-MB-231 hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdellik sitotoksisteyi gösteren grafik.

PC3 hücrelerinde virüs enfeksiyonuna bağlı sitotoksite tüm virüs sulandırmaları için 4. saatten itibaren tespit edildi. İlk 16 saatte 10 moi virüs ile enfekte hücrelerdeki sitotoksisite diğer sulandırmalara göre daha düşük kaydedildi. Virüs 10 moi ve 5 moi'lik sulandırmadaki sitotoksik etki 24. saat itibariyle zamana bağlı belirgin artış belirlendi. Özellikle 48. saatte 10, 5 ,1 ve 0,1 moi sulandırmalarda sırayla hücre canlılığı %43,9, 47,56, 58,53 ve 91,46 olarak tespit edildi. Virüs üremesine bağlı hücre lizisleri ve kayıpları bu hücrelerde belirgin olarak gözlemlenmekle birlikte doza ve zamana bağlı doğru orantılı olarak arttığı kaydedildi (Şekil 4. 26).



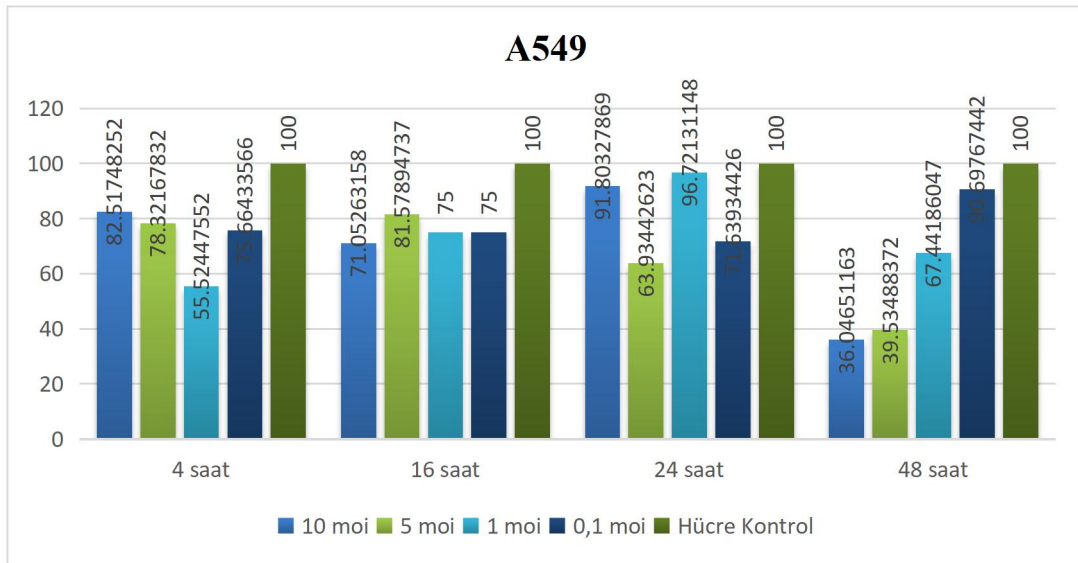
Şekil 4- 26 PC3 hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisteyi gösteren grafik.

DU145 hücreleri virüs üremesinin erken inkübasyon saatlerinde tespit edilen bir hücre olarak kaydedildi. Hücrelerde virüs enfeksiyonuna bağlı sitotoksite tüm virüs sulandırmaları için 4.saatten itibaren tespit edilmekle birlikte 16. saatte 10 moi virüs ile enfekte hücrelerdeki sitotoksiste diğer sulandırmalara göre daha belirgin artış (%54,3) kaydedildi. Özellikle 48. saatte 10, 5, 1 ve 0,1 moi sulandırmalarda sırayla hücre canlılığı %35,9, %47,19, %43,82 ve %70,78 olarak tespit edildi. Virüs üremesine bağlı hücre lizisleri 0,1 moi sulandırmada da kaydedilmekle birlikte diğer sulandırmalarda daha belirgin gözlemlendi. Virüs üremesine bağlı hücre kayıpları ve lizisleri yüksek olduğu DU145 hücrelerinde sitotoksiste doza ve zamana bağlı doğru orantılı olarak arttığı kaydedildi (Şekil 4. 27).



Şekil 4-27 DU145 hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisteyi gösteren grafik.

A549 hücrelerinde BHV-1 enfeksiyonuna bağlı sitotoksik etki 4 saatlik inkübasyon ile başladığı, özellikle 1 moi virüs sulandırmasındaki etki diğer sulandırmalara kıyasla daha yüksek % 45'lerde kaydedildi. İlk 24 saatte sitotoksik etki virüs sulandırmalarında değişkenlik gösterirken, 48. saatte yapılan analizde doza bağlı hücre sitotoksistesinin arttığı, hücre canlılığının azaldığı kaydedildi. 48. saatte 10, 5, 1 ve 0,1 moi sulandırmalarda sırayla hücre canlılığı %36,09, %39,53, %67,43 ve %90,69 olarak tespit edildi. (Şekil 4. 28).



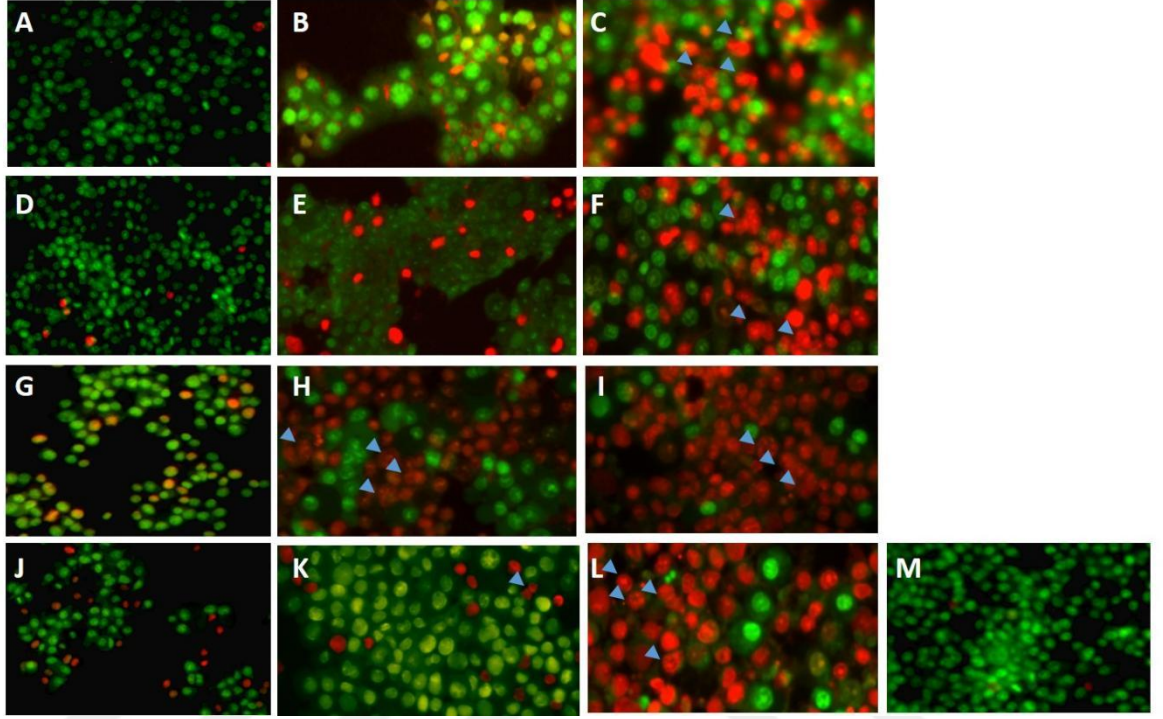
Şekil 4-28 A549 hücre hattının BHV-1'in farklı dozları ile enfekte edildiğinde oluşan yüzdelik sitotoksisteyi gösteren grafik.

4.3. Akridin Turuncusu/Etidyum Bromür Boyaması İle Apoptotik Hücrelerin Saptanması

Akridin turuncusu apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılırken, etidyum bromür boyası nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılır. Yapılan boyama sonucunda, çekirdek zarı bozulmamış canlı hücreler yeşil renkte, hücre sınırları bozulmamış, çekirdek zarı bozulmamış fakat DNA hasarı başlayan erken apoptotik hücreler sarı renkte, çekirdek bütünlüğü parçalanmaya başlamış geç apoptotik hücreleri turuncudan kırmızıya, çekirdeği bozunmamış fakat hücre zarı bütünlüğü bozulmaya başlamış nekrotik hücreleri ise kırmızıya boyamaktadır. Virüs enfeksiyon denemeleri sonrası inkübasyon sürelerine göre virüs sulandırılmalarında boyama yapılarak değerlendirme floresan mikroskop altında incelenmiştir.

BHV-1 enfekte DU145 hücrelerinde yapılan AO/EtBr boyamalarında, ilk 24 saatte erken ve geç apoptotik hücreler tespit edildi. Virüs sulandırılmalarında 0,1 moi ile enfekte hücrelerde apoptotik hücreler 24 saatten sonra tespit edildi. İnkübasyon süresinde virüs üremesine bağlı hücre dökülmesiyle birlikte, 72. saatte yapılan analizde 0,1 ve 1 moi sulandırılmalarında %50'den fazla sahada apoptotik hücre tespit

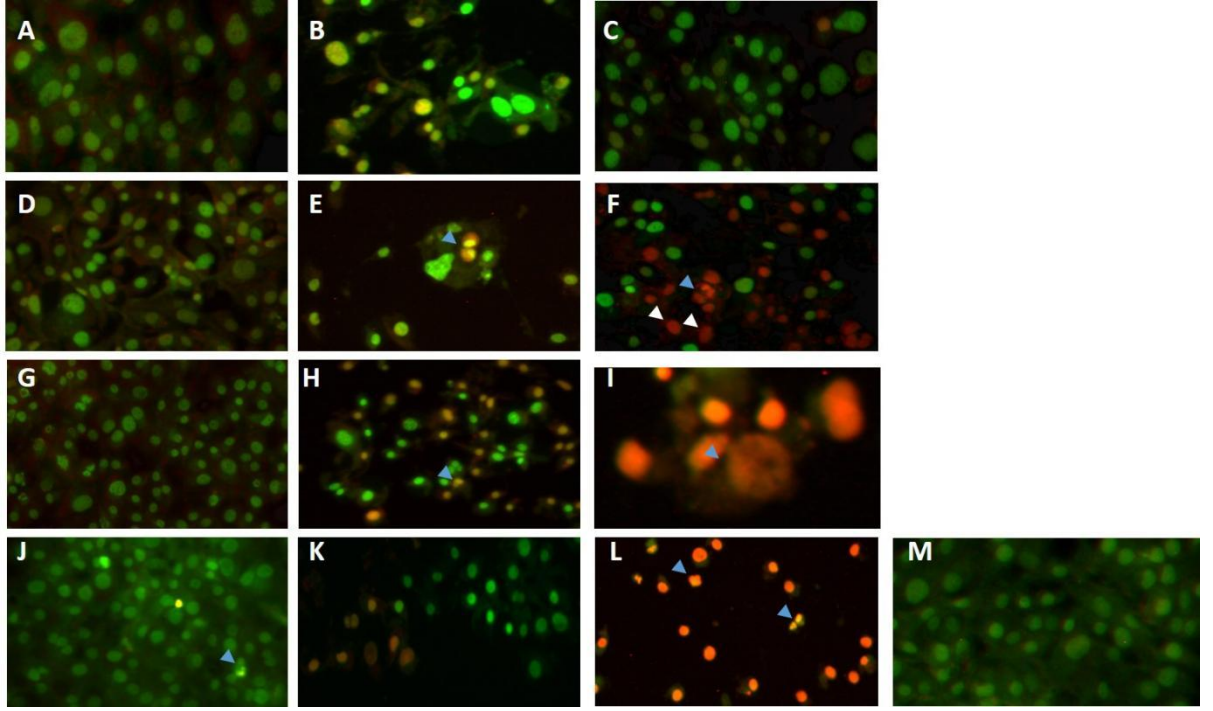
edilirken 5 ve 10 moi'lik sulandırmalarda %90'dan fazla hücre alanı apoptotik ve nekrotik hücre ile tanımlandı (Şekil 4.29).



Şekil 4- 29 BHV-1 ile enfekte DU-145 hücrelerinde AO/EtBr boyamasının görüntüsü. A) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; B) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; C) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; D) 1 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; E) 1 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; F) 1 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; G) 5 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; H) 5 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; I) 5 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; J) 10 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; K) 10 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; L) 10 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; M) Hücre kontrol. Mavi ok apoptotik hücreleri göstermektedir.

BHV-1 ile enfekte MDA-MB-231 hücrelerinde yapılan AO/EtBr boyamalarında, ilk 24 saatte 10 moi'lik sulandırma ile enfekte hücrelerde erken apoptotik hücreler tespit edildi. Virüs diğer sulandırmalarıyla enfekte hücrelerde apoptotik hücreler 48 saatte tespit edildi. İnkübasyon süresinde virüs üremesine bağlı hücre dökülmesiyle birlikte, 72. saatte yapılan analizde 0,1 moide apoptotik

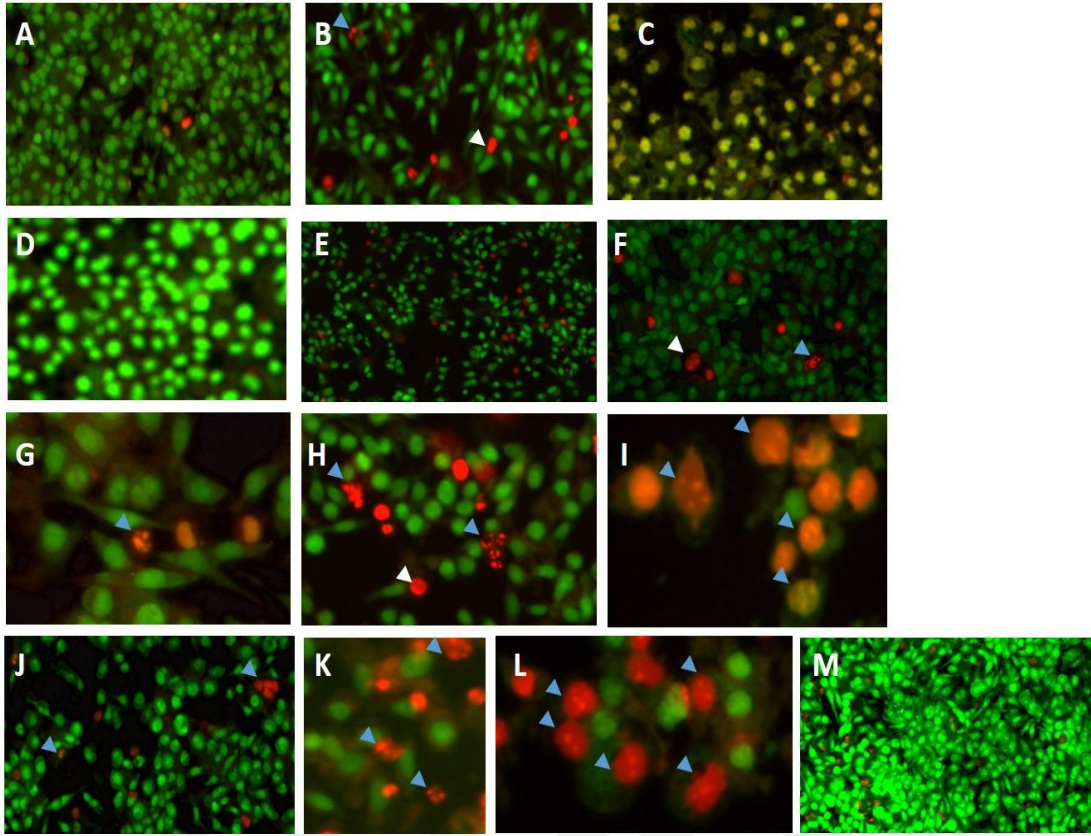
hücre oranı %50'nin altında iken, 1 moi sulandırmalarında %50'den fazla, 5 ve 10 moi'lik sulandırmalarda %90'dan fazla hücre alanı apoptotik ve nekrotik hücre ile tanımlandı (Şekil 4.30).



Şekil 4-30 BHV-1 ile enfekte MDA-MB-231 hücrelerinde virüs titresi ve zamana bağlı AO/EtBr boyamasının görüntüsü. A) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; B) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; C) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; D) 1 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; E) 1 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; F) 1 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; G) 5 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; H) 5 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; I) 5 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; J) 10 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; K) 10 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; L) 10 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; M) Hücre kontrol. Mavi ok apoptotik hücreleri, beyaz ok nekrotik hücreleri göstermektedir.

BHV-1 ile enfekte Hela hücrelerinde yapılan AO/EtBr boyamalarında, ilk 24 saatte 5 moi ve 10 moi'lik sulandırmalar ile enfekte hücrelerde apoptotik hücreler tespit edildi. Diğer sulandırmalardaki enfekte hücrelerde apoptotik ve nekrotik hücreler 48 saatte tespit edildi. Bu 48. saatteki analizde, 5 moi ve 10 moi sulandırma ile enfekte hücrelerde apoptotik hücre oranı %50'nin üzerinde belirlendi. İnkübasyon süresinde 72. saatte yapılan analizde 0,1 moi ve 1 moi ile enfekte hücrelerde apoptotik hücre oranı %50'nin üzerinde, 5 moi ve 10 moi'lik sulandırmalarda %90'dan fazla hücre alanı apoptotik ve nekrotik hücre ile tanımlandı (Şekil 4.31).

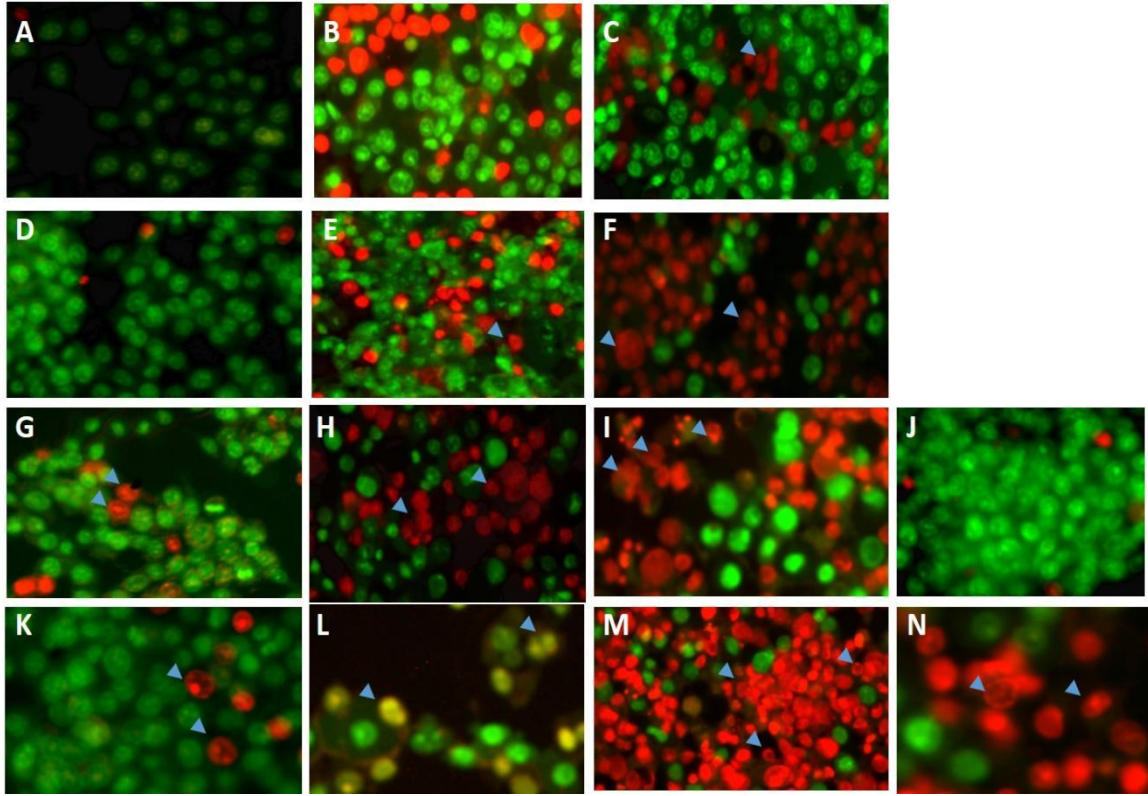




Şekil 4-31 BHV-1 ile enfekte HeLa hücrelerinde virüs titresi ve zamana bağlı AO/EtBr boyamasının görüntüsü. A) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; B) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; C) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; D) 1 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; E) 1 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; F) 1 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; G) 5 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; H) 5 moi virüs enfeksiyonunda 36. saat; I) 5 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; J) 10 moi virüs enfeksiyonunda 16. saat; K) 10 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; L) 10 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; M) Hücre kontrol. Mavi ok apoptotik hücreleri, beyaz ok nekrotik hücreleri göstermektedir.

BHV-1 ile enfekte PC3 hücrelerinde yapılan AO/EtBr boyamalarında, 16. saatte yapılan boyamada 10 moi ile enfekte hücrelerde apoptotik hücreler belirlendi. İlk 24 saatte 1 moi, 5 moi ve 10 moi'lik virüs sulandırmaları ile enfekte hücrelerde apoptotik hücreler tespit edildi. Diğer sulandırma 0,1 moi virüs ile enfekte hücrelerde apoptotik ve nekrotik hücreler 48 saatte tespit edildi. Bu 48. saatteki analizde, tüm enfekte hücre alanlarında apoptotik hücre oranı %50'nin üzerinde belirlendi. İnkübasyon süresinde 72. saatte yapılan analizde 0,1 moi ve 1 moi ile enfekte

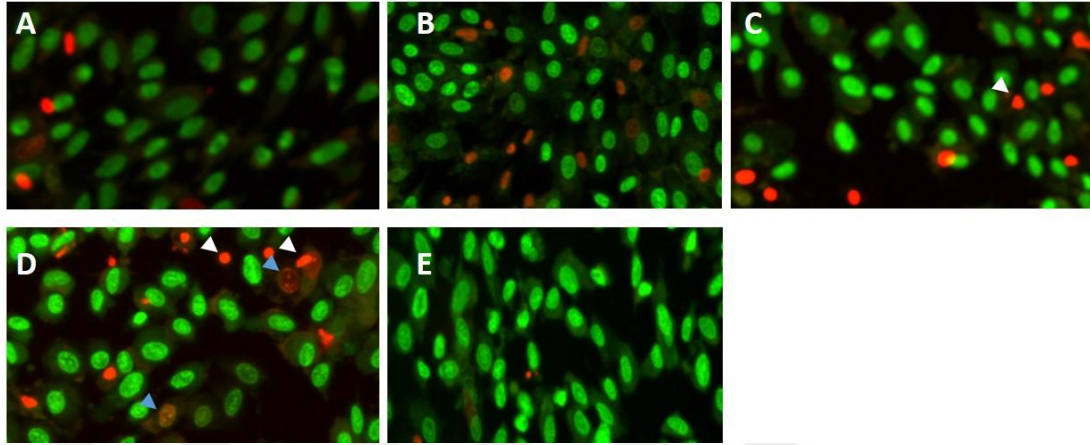
hücrelerde apoptotik hücre oranı %50'nin üzerinde, 5 moi ve 10 moi'lik sulandırmalarda %90'dan fazla hücre alanı apoptotik ve nekrotik hücre ile tanımlandı (Şekil 4. 32).



Şekil 4-32 BHV-1 ile enfekte PC-3 hücrelerinde virüs titresi ve zamana bağlı AO/EtBr boyamasının görüntüsü. A) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; B) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; C) 0,1 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; D) 1 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; E) 1 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; F) 1 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; G) 5 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; H) 5 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; I) 5 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat; J) Hücre kontrol; K) 10 moi virüs enfeksiyonunda 16. saat; L) 10 moi virüs enfeksiyonunda 24. saat; M) 10 moi virüs enfeksiyonunda 48. saat; N) 10 moi virüs enfeksiyonunda 72. saat. Mavi ok apoptotik hücreleri göstermektedir.

BHV-1 ile enfekte A549 hücrelerinde yapılan AO/EtBr boyamalarında, 16. saatte yapılan boyamada 10 moi ile enfekte hücrelerde apoptotik hücreler belirlendi. İlk 48 saatte tüm virüs sulandırmaları ile enfekte hücrelerde apoptotik hücreler tespit edildi. İnkübasyon süresinde 72. saatte yapılan analizde 0,1 moi ve 1 moi ile enfekte

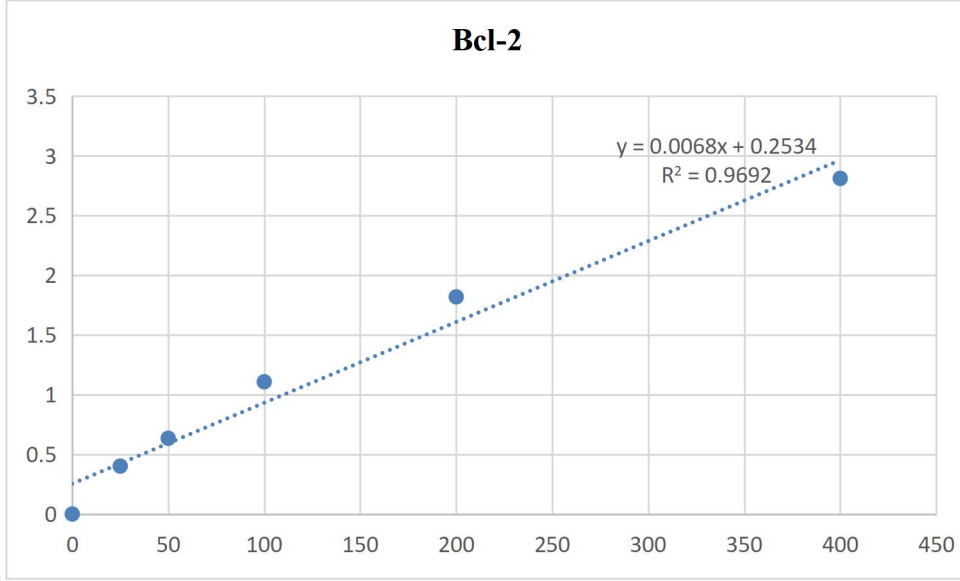
hücrelerde apoptotik hücre oranı %50'nin üzerinde, 5 moi ve 10 moi'lik sulandırmalarda %90'dan fazla hücre alanı apoptotik ve nekrotik hücre ile tanımlandı (Şekil 4. 33).



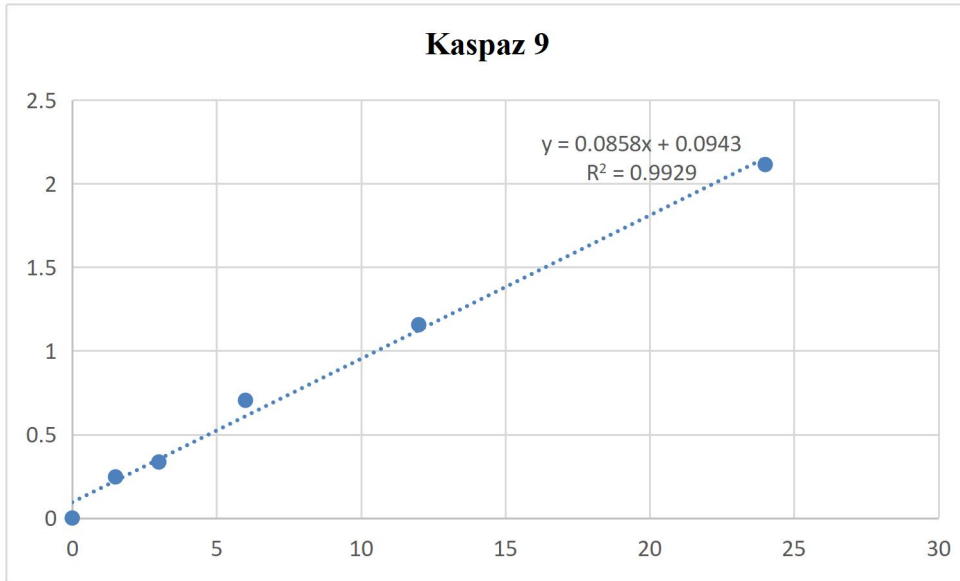
Şekil 4-33 BHV-1 ile enfekte A549 hücrelerinde AO/EtBr boyamasının görüntüsü. X10. A:0,1 moi virüs enfekte hücre 16 saat inkübasyon. B:1 moi virüs enfekte hücre 16 saat inkübasyon. C: 5 moi virüs enfekte hücre 16 saat inkübasyon. D: 10 moi virüs enfekte hücre 16 saat inkübasyon.E: Hücre kontrol görüntüsü. Mavi oklar apoptotik hücreleri, beyaz oklar nekrotik hücreleri göstermektedir.

4.4. ELISA Test Sonuçları

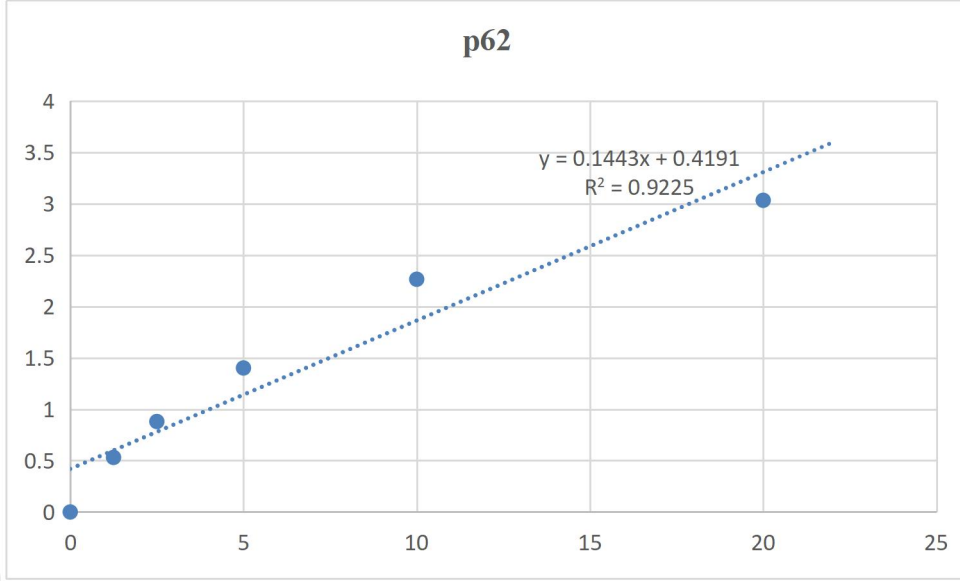
Virüsün 0,1 moi, 1 moi, 2 moi, 5 moi ve 10 moi'lik sulandırmalarıyla hazırlanan her hücre için enfeksiyon modelleri 8., 16., 24., 48. ve 72. saatteki inkübasyonlarında durdurularak ATG7, p62, kaspaz-8, kaspaz-9 ve Bcl-2 seviyeleri yönünden test edildi. ELISA testleri her bir markır için kitin kendi protokolüne uygun şekilde uygulandı. Değerlendirme amacıyla tüm pleytler ELISA okuyucusunda 450 nm okutularak OD değerleri not edildi. Her test için standart curve çizildi (Şekil 4.34) (Şekil 4.35) (Şekil 4.36) (Şekil 4.37) (Şekil 4.38). Standart curve kullanılarak her bir enfeksiyon denemesi ve hücre kontrolleri için test edilen protein seviyeleri belirlendi.



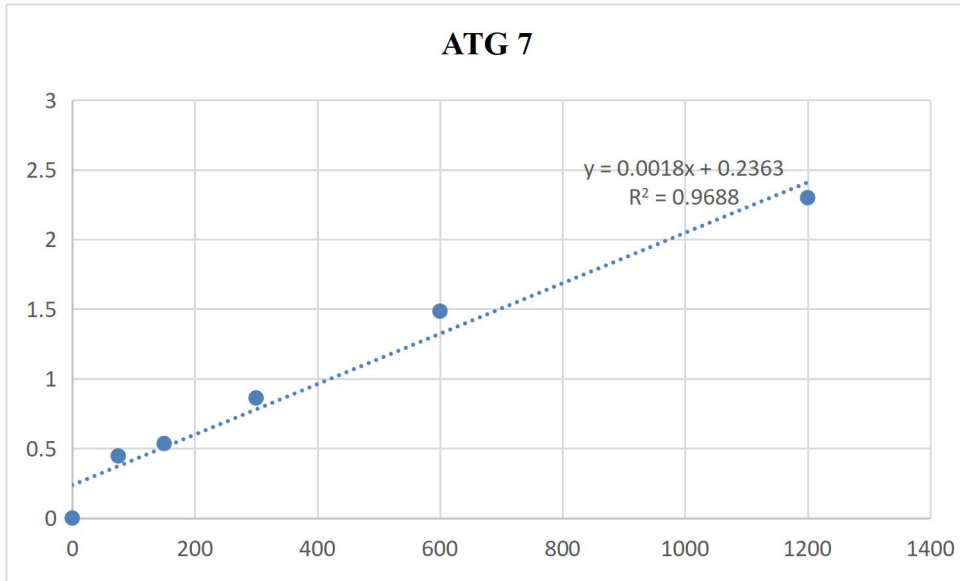
Şekil 4-34 BCL-2 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.



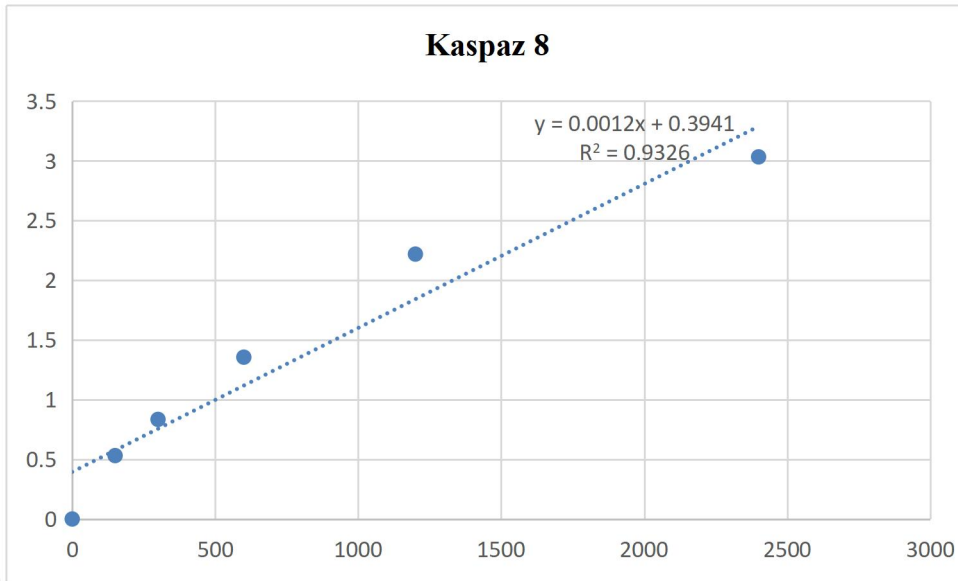
Şekil 4-35 Kaspaz-9 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.



Şekil 4-36 p62 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.



Şekil 4-37 ATG7 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.



Şekil 4- 38 Kaspaz-8 ELISA testi değerlendirilmesinde çizilen standart curve eğrileri.

ELISA testlerinin sonuçları değerlendirildiğinde; p62 seviyeleri hücre kontrol seviyeleri ilk 16. ve 24. inkübasyon sürelerinin hücelere göre değişmekle birlikte azaldığı 48. saat sonrası arttığı ve 72. saatte hücelere göre değişerek artışı devam ettiği belirlendi. Bu protein miktarındaki artış ve azalış bazı hücrelerde virüs sulandırılmalarında da benzer olmakla birlikte bazı hücreler için değişkenlik gösterdi. A549 hücresinde 0,1 moi, 1 moi ve 2 moi virüs sulandırılmalarında p62 seviyelerinin kontrole göre daha yüksek olduğu tespit edildi. DU145 hücrelerinde 10 moi virüs sulandırması ile enfekte hücrelerde 16. Saatteki p62 seviyesinde ani düşüş olduğu ve 24. saatte iki katlı bir artış ile yükseldiği tespit edildi. Aynı hücre hattında 0,1 moi ve 2 moi virüs ile enfekte hücrelerde hücre kontrole göre p62 seviyeleri daha yüksek seyretti. Hela hücrelerinde yapılan testlerde özellikle 10 moi virüs ile enfekte tüm hücrelerde p62 seviyelerinin yüksek olduğu belirlendi. PC3 hücrelerinde virüs enfekte hücrelerde 48 saat ve sonrasında artış tespit edildi. Virüs enfekte MDA-MB-231 hücrelerinde p62 seviyeleri değişen oranlarda 2 moi, 5 moi ve 10 moi virüs sulandırılmalarında kontrole kıyasla belirgin artış tespit edildi.

ATG7 protein seviyelerinin tespitine yönelik yapılan ELISA testleri sonuçlarında; hücelere göre değişkenlik tespit edildi. Hücre kontrollere göre yapılan kıyaslamalarda değişen miktarlarda olsa da MDA-MB-231 hücresi hariç diğer

hücrelerde zamana bağlı ATG-7 seviyeleri artışlar hatta bu artışlar iki katlı miktarlarda tespit edildi. Virüs enfekte hücrelerde ise A549 hücrelerinde 0,1 moi ve 5 moi ile enfekte hücrelerde zamana bağlı iki katlı protein seviyesinde kontrolün aksine artış belirlendi. DU145 hücrelerinde 1 moi enfeksiyon olan hücrelerde zamana bağlı 10 moi enfeksiyonda 16. saatte iki katlı ATG-7 seviyelerinde artış tespit edildi. Hela hücrelerinde ise 5 moi sulandırma olan hücrelerde iki katlı artış zamana bağlı belirlendi. PC3 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ATG-7 seviyelerinde zaman ve virüs miktarına bağlı olarak belirgin bir değişiklik saptanmadı.

Bcl-2 protein seviyelerinin tespitine yönelik yapılan ELISA testleri sonuçlarında; hücrelere ve virüs sulandırmalarına göre değişkenlik tespit edildi. Hücre kontrollere göre yapılan kıyaslamalarda değişen miktarlarda olsa da MDA-MB-231 hücresi hariç diğer hücrelerde zamana bağlı Bcl-2 seviyelerinde düşüşler gözlemlendi. Virüs enfekte hücrelerde ise A549 hücrelerinde 2 moi ile enfekte hücrelerde protein seviyesinde zamana bağlı iki katlı azalma belirlendi. DU145 hücrelerinde 10 moi enfeksiyon olan hücrelerde zamana bağlı iki katlı azalma tespit edildi. Hela, PC3 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ise 1 moi ve 2 moi virüs sulandırmaları ile enfekte olan hücrelerde Bcl-2 seviyelerinde azalma belirlendi.

Kaspaz-8 protein seviyelerinin tespitine yönelik yapılan ELISA testleri sonuçlarında; hücre kontrollere göre yapılan kıyaslamalarda değişen düşük miktarlarda artış tespit edildi. Virüs enfekte hücrelerde ise A549 hücrelerinde 0,1 moi, 1 moi ve 2 moi ile enfekte hücrelerinde kaspaz-8 seviyeleri hücre kontrole göre daha yüksek ve zamana bağlı protein seviyesinde artış belirlendi. DU145 hücrelerinde tüm virüs sulandırmalarıyla enfekte hücrelerde kaspaz-8 seviyeleri zamana bağlı artış tespit edildi. Hela hücrelerinde ise 10 moi sulandırma olan hücrelerde iki katlı artış zamana bağlı belirlendi. PC3 ve MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-8 seviyelerinde zaman ve virüs miktarına bağlı olarak belirgin bir artış saptandı.

Kaspaz-9 protein seviyelerinin tespitine yönelik yapılan ELISA testleri sonuçlarında; hücre kontrolleri zamana bağlı benzer miktarlarda tespit edildi. Virüs enfekte hücrelerde ise A549 hücrelerinde 0,1 moi, 1 moi ve 2 moi ile enfekte hücrelerinde kaspaz-9 seviyeleri hücre kontrole göre daha yüksek ve zamana bağlı

protein seviyesinde artış belirlendi. DU145, HeLa ve PC3 hücrelerinde tüm virüs sulandırılmalarıyla enfekte hücrelerde kaspaz-9 seviyeleri zamana bağlı artış tespit edildi. MDA-MB-231 hücrelerinde kaspaz-9 seviyelerinde zaman ve virüs miktarına bağlı olarak belirgin bir değişiklik saptanmadı.

5. TARTIŞMA

Günümüzde birden fazla farklı kanser tedavisi stratejisi bulunmaktadır. Ancak hala hastaların hayat kalitelerini artıracak ve kanserli hücrelerin tamamen ortadan kaldırılabileceği ya da kanserli hücreler ortadan kaldırılırken, sağlıklı hücrelerin hiçbir zarar görmeyeceği tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavileri ve hala çalışmaların devam ettiği immünoterapiler günümüzdeki güncel kanser terapilerindedir. Bu tedavi yöntemlerinden en umut verici olanı immünoterapidir. İmmünoterapiyi bu kadar güçlü kılan ise, immün sistemin patojen ya da yabancı olarak gördüğü her hücreyi, molekülü, proteini tanımlayıp yok etmek için mükemmel bir donanıma sahip olmasıdır ve bununla birlikte kanser hücrelerinin yüzeyinden eksprese edilen antijenlerinin tanınması için yönlendirildiğinde çok güçlü bir antikanser etki ortaya çıkarabilmesidir (Sung ve diğ. 2021). İmmünoterapik stratejiler içinde yer alan ve tek başına güçlü bir kanser tedavi yöntemi olabilecek bir başka tedavi tipi ise viroterapi yöntemidir. Viroterapi, immünoterapiye göre nispeten yeni bir alandır. Bu tedavi stratejisinde virüsler terapötik olarak kullanılır. Onkolitik viroterapi, kanser hücrelerini direkt ya da indirekt yollardan öldürebilme yetisine sahip kendini konak hücrede kopyalayabilen virüslerin kullanım stratejisine dayanmaktadır. Onkolitik viroterapide kullanılacak virüslerin, immün sistem için patojenik olmamaları, sadece kanser hücrelerini hedef alabilmeleri, kanser hücrelerini öldürebilme yeteneği ve tümörlerin ortadan kaldırılabilmesi için tümör öldürücü faktörleri eksprese edebilecek şekilde genetik mühendisliği ile değiştirilebilme yeteneğine sahip olmaları gerekmektedir (Russell ve diğ. 2012; Kaufman ve diğ. 2015; Maroun ve diğ. 2017). Onkolitik virüsler, tümör hücrelerini öldürme verimliliğinin yüksekliği, spesifik olarak kanserli hücreleri seçebilme yetenekleri, yan etkilerinin olmayışı ya da en aza indirgenebilmesi ve düşük maliyetli olmaları onkolitik virüsleri diğer kanser tedavi stratejilerine göre avantajlı hale getirir (Coffin 2016; Andtbacka ve diğ.

2015). İlk viroterapi uygulamaları deney hayvanlarında HSV-1 genomundaki timidin kinaz geni susturularak gliomalı farelerde aktarılmıştır. Bu uygulama sonucunda farelerde glioma gelişimini durdurduğu ve hasta farelerin hayat sürelerinin uzadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda son derece güvenilir bir tedavi yöntemi olduğunu da ortaya koymuşlardır. Bu çalışma sonucu sunulan raporlar ile birlikte onkolitik viroterapi çalışmaları hızla devam etmiştir. İlk çalışmayı takiben 1996 yılında genetiği ile oynanmış başka bir virüs olan adenovirüs oniks-015 ile klinik denemeler yapılmıştır (Heise ve diğ. 1997). Bu çalışmalar sonrasında da 2004 yılına gelindiğinde ilk onkolitik virüs Letonya'da melenom tedavisi için onaylanmıştır. 2015 yılında FDA tarafından talimogene leharparepvec (T-VEC) klinik tedavilerinde kullanılmak üzere onaylandı (Coffin 2016; Andtbacka ve diğ. 2015). Onkolitik virüsler içerisinde aday gösterilen virüslerden bir de *Bovine herpesvirüs-1* (BHV-1)'dir. *Bovine herpesvirüs-1* (BHV-1), sağlıklı insan hücrelerinde sitotoksik etkiye sebep olmayan ancak bazı kanser hücrelerinde enfeksiyona neden olabilen bir virüstür (Cuddington ve Mossman 2014).

Bu tez çalışmasında BHV-1 ile enfekte farklı doku kökenli beş farklı kanser hücre hattının (A549, HeLa, DU145, PC3, MDA-MB-231) enfeksiyonu sonucu hücre canlılığı, sitotoksitesi, apoptozis ve otofajik yolların varlığı araştırıldı. Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler farklı titrelerde virüs ile enfekte kanser hücre hatlarında virüs üremesine bağlı zaman bağlı hücrelerde yuvarlaklaşma, lizis, vakuol varlığı gibi CPE meydana geldi. Virüsün permisiv hücresi MDBK ya benzer şekilde kanser hücrelerinde CPE yoğunluğu ve hücre lizisleri zamana bağlı olarak artışlar görüldü. Özellikle prostat kanser hücre hatları olan PC3 ve DU145 hücreleri virüs üremesi MDBK ya benzer şekilde diğer hücelere kıyasla daha erken inkübasyon saatlerinde virüs üremesi tespit edildi. Bu sonuçlar BHV-1'in kanser hücrelerine bir onkolitik virüs olarak hedeflenebileceğini gösterdi.

Rodrigues ve diğ. (2010)'da yaptıkları bir çalışmada, BHV-1'in histolojik kökenli kanser hücre hatlarında ve normal hücrelerde çoğalma, sitopatik etkilere neden olma ve hücre canlılığı üzerine etkilerini belirlemiştir. BHV-1'in kanser hücrelerde sitopatik etkileri artırdığını, hücre canlılığını azalttığını bununla birlikte BHV-1 enfeksiyonunun normal hücre hatlarında ise önemli derecede kısıtlandığını

göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmada virüs enfeksiyonuna bağlı canlılık oranları ve hücre sitotoksitesi virüsün titresi ve inkübasyon zamanına doğru orantılı olarak arttığı belirlendi. PC3, DU145 ve A549 hücrelerinde virüs enfeksiyonuna bağlı sitotoksite 4. saat itibariyle tespit edildi. Hücreler arasında canlılık oranlarının farklılık göstermesi virüsün reseptör olarak tutunacağı hücre yüzey molekül sayısının hücrelere göre farklı olabileceği ve enfeksiyon miktarının buna bağlı değişken olabileceği olarak düşünüldü. Genel olarak tüm hücrelerde virüs enfeksiyonunun 48. saati itibariyle sitotoksitite %50'nin üzerinde tespit edildi. Yapılan çalışmalarda kanser hücre hatlarında BHV-1'e bağlı hücre ölümleri ve DNA hasarları rapor edilmiştir. Qiu ve diğ. (2021)'de yaptıkları çalışmada, BHV-1 enfeksiyonunun akciğer kanseri hücre hattı A549 'da enfeksiyona neden olduğu ve DNA hasarını indüklediğini gösterilmişlerdir. Bir başka araştırmada, BHV-1 ve azasitidin kombinasyonu meme kanseri hücrelerine uygulandığında tümör hücrelerinde klirensi ve immün hücre infiltrasyonu ile sekonder lezyonların insidansını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Cuddington ve diğ. 2015). Cuddington ve diğ. (2013)'de yaptıkları çalışmada, BHV-1'in reseptöre bağlanmadan hem lümen hem de bazal meme kanseri hücre hatlarını enfekte etme ve öldürebilme yeteneği gösterilmiştir. Fakat bu çalışmanın sonucuna göre meme kanseri hücre hatlarında BHV-1 kaynaklı hücre ölümlerinde hücre hatlarında BHV-1 enfeksiyonu oluşmadan gerçekleşmiştir.

Bu çalışmada, insan akciğer kanseri hücre hattı (A549), insan prostat kanseri hücre hatları (PC-3 ve DU145), insan servix kanseri hücre hattı (Hela) ve insan meme kanseri hücre hattı (MDA-MB-231) BHV-1 ile enfekte edildi. Kullanılan hücrelerin hepsinde BHV-1 üremesine bağlı CPE tespit edildi. Hücreler arasında bazı farklılıklar gözlemlendi. BHV-1'in PC-3 ve DU145 prostat kanseri hücre hatlarının BHV-1'in konakçısı MDBK hücreleri gibi ilk 24 saat hücrelerde ürettiği ve hücrelerde yüksek enfeksiyona neden olduğu görüldü. Bu hücrelerdeki 10 moi virüs enfeksiyonuna bağlı yoğun hücre kayıpları ve lizisi ilk 24 saat içinde görüldü. BHV-1'in A549 akciğer kanseri hücre hattında, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ve hela servix kanseri hücre hattında enfeksiyonunda ilk 24 saat ile 48 saat arasında hücrelerde belirgin CPE tespit edildi. Bununla birlikte özellikle hela servix kanseri hücre hattında hücrede enfeksiyona neden olmadan hücre ölümüne neden olduğu görüldü. Ayrıca Hela ve MDA-MB-231 hücrelerinde virüs üremesine bağlı

vakuol oluşumu gözlemlendi. Tüm hücrelerde virüs dozu artışına bağlı CPE miktarında arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulundu. Cuddington ve diğ. (2013)'de yaptıkları çalışmada, BHV-1'in meme kanseri hücre hattında hücre canlılığını ne kadar azaltacağı bildirdi. Hücrelerde BHV-1 replikasyonunun enfeksiyonun 2. gününde gösterildi. MDA-MB-436 hücre hattında BHV-1'in moi dozları arttıkça virüs replikasyonunun arttığı gösterildi. Virüs replikasyonu artışının her zaman hücre canlılığını etkilemediği gösterildi. Ancak BT-549, Hs-578T ve HCC1954 hücre hatlarında virüs replikasyon seviyesi düşük seyretmesine rağmen hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir. Xu ve diğ. (2012)'de yaptıkları çalışmada BHV-1 enfeksiyonuna bağlı MDBK hücrelerinde hücre canlılığına etkisini göstermek amacı ile MTT analizi kullanılmış ve düşük dozlarda (0.0032 moi) hücre canlılığına etkisi olmadığı, bununla birlikte 50 moi gibi yüksek bir dozun 48. saatinde ise, hücrelerin yalnızca %20'sinde canlılık gözlemlendiğini bildirdi. Yine bu çalışmada 2 moi'lik dozun canlılık üzerine etkilerinin 24. saatten itibaren başladığını göstermiştir. BHV-1'in kendi konak hücresi MDBK hücrelerinde enfeksiyonunun 4. saatinde 5 ve 10 moi hariç hücre canlılığı azalmadı. MDBK hücresinde 24. saatten itibaren hücre canlılığı azalmaya başladı. Sitotoksite ise 4. saatten itibaren başladığı tespit edildi. Doza ve zamana bağlı hem sitotoksiste hemde hücre ölümleri arttı.

Kanser hücrelerinde hücre canlılık oranları MDBK'ya en yakın değerlerde PC3 ve DU145 hücrelerinin sonuçları değerlendirildi. Sitotoksiste oranları tüm hücrelerde ilk 12 saatte başladığı tespit edildi. Kanser hücre hatlarında özellikle 48. saatte hücre ölümlerinin artması ve canlılık oranlarının doza oranla da azaldığı gözlemlendi. Sonuç olarak Hela hücrelerinde her saat için farklı yapılacak ileriki çalışmalarda seçilecek virüs oranları inkübasyon süresine göre değişebileceği unutulmamalıdır. Hücre içi mekanizmaları etkisinin zamana bağlı olarak incelenmesi hedeflendiğinde düşük virüs titrelerinde (0,1-2 moi) enfeksiyonun ilk 48 saat içerisinde değerlendirilmesi daha uygun olacaktır. Sitotoksiste çalışmaları virüsün hücrelerde agresif üremesine bağlı olarak erken geliştiği hücre içi erken viral proteinlerin oluşumuna bağlı olarak gelişebileceğini düşündürmektedir.

BHV-1'in doğal enfeksiyonunda sığırlarda solunum yolu ve genital mukoza hücrelerinde aktif olarak çoğalmaktadır. Araştırmamızda doğal enfeksiyonda virüsün tercih ettiği sistemlere yönelik kanser hücre hatları tercih edildi. Kullanılan kanser hücrelerinde enfeksiyona neden olabileceği ve sitotoksik etkisi olabileceği düşünüldü ve bu doğrultuda deneyler tasarlandı. Hücre sitotoksitesini değerlendirmek amacıyla yaptığımız MTT test ve AO/EtBr boyamaları sonuçlarına göre BHV-1'in bu hücreler üzerinde 48. saatten sonra etkisi daha yüksekti.

Bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerde apoptoza sebep olurlar. Bu ilişki çift yönlü olarak meydana gelir. İlki virüslerin enfekte ettikleri konakta meydana gelen immün sistem yanıtları apoptoza neden olabilmektedir. Diğeri ise, virüs çoğalabilmek için hücrenin apoptoza gitmesini sağlayabilir (Clarke ve Tyler 2009). Kanser hücreleri ise kendi devamlılıklarını sağlamak ve çoğalma dinamiklerinde hücre apoptoz mekanizmaları baskılamaktadır. Onkolitik virüsler enfekte ettikleri kanser hücrelerini apoptoza sürükleyebilir. Bu onkolitik virüslerin ürettikleri proteinler hem antiapoptotik hem de proapoptotik olarak görev alabilir. Yapılan çalışmalara göre onkolitik virüsler kanser hücrelerini apoptoza zorlamaktadır (Roulston ve diğ. 1999).

Hanon ve diğ. (1998)' de yaptıkları çalışmada, BHV-1'in B lenfositleri, T lenfositleri ve monositleri bireysel olarak apoptoza uğramaları için indükleyebileceğini raporlamıştır. Devireddy ve Jones (1999)'da yaptıkları çalışmada BHV-1'in MDBK hücrelerinde içsel apoptotik yolağın p53 bağımlı yolunu aktive ettiği gösterilmiştir. Xu ve diğ. (2012)'de yaptıkları bir çalışmada, BHV-1 ile enfekte edilen MDBK hücrelerinde apoptozun zamana bağlı bir şekilde görüldüğünü göstermiştir. Aynı zamanda bu çalışmada hücrelerdeki apoptoz oranı virüs titresine bağımlı bir şekilde artış gösterdiği de raporlanmıştır ve BHV-1'in kaspaz-8 bağımlı apoptotik yolağı aktive ettiği gösterilmiştir. Yine BHV-1'in enfeksiyonunun mitokondriden sitokrom C'nin salınımını sağladığı da tespit edilmiştir. Bu çalışmada BHV-1 ile enfekte olmuş hücreler, AO/EtBr boyamasından sonra kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma ile tipik apoptotik özellikler gösterdiği de kanıtlanmıştır.

Cuddington ve Mossman (2014)'de BHV-1'in çeşitli insan kanser hücre hatlarını enfekte etme ve öldürme yeteneği olduğunu göstermişlerdir. Cuddington ve diğ. (2013)'te yaptıkları çalışmada, GFP ile işaretli BHV-1'in MCF7 hücrelerinde enfeksiyonu sağlandıktan sonra deri altından NSG farelere enjekte edilmiştir ve deneye 66 gün devam edilmiştir. Bu farelerdeki tümör boyutu *in vivo* tümör oluşturma kapasitesini azalttığı raporlanmıştır. Bu azalmanın hücre canlılığının azalmasıyla doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Rodrigues ve diğ. (2010)'da yaptıkları çalışmada, kanser hücrelerinin hücresel canlılığı kısmen azalttığı, MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücrelerinde BHV-1'in programlı hücre ölümünü indüklediği rapor edilmiştir. Bu çalışmada, BHV-1'in çeşitli kanser hücrelerinde sitotoksik etkisi ve apoptotik etkisi olduğu gösterildi. BHV-1'in çoklu kanser türleri için tropizme sahip bir OV olarak potansiyele sahip olduğu ve virüs replikasyonundan bağımsız olarak sitotoksiteyi indükleyebildiği gösterilmiştir. BHV-1'in kanser hücrelerini hücre ölümüne sürüklerken hangi markırları kullandığını tespit etmeden önce AO/EtBr boyaması ile apoptotik hücreler tespit edildi. Bu boyama sonuçlarına göre tüm kanser hücrelerinde hem erken apoptotik hem de geç apoptotik hücreler ile birlikte nekrotik hücrelerde tespit edildi. BHV-1 ile enfekte edilmiş hücrelerde hilal şeklinde ve DNA'sı parçalanmış, granüler erken apoptotik hücreler tespit edildi. Bununla birlikte yine aynı deney gruplarında, çekirdeği parçalanmış geç apoptotik hücreler tespit edildi. Bu apoptotik hücrelerin oranları hücre hatlarında ve virüs miktarına bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte inkübasyon sürelerinde zamana göre arttığı belirlendi. Virüs üremesine bağlı apoptotik hücre sahalarında, nekrotik hücrelerde tespit edildi. Virüs üremesine bağlı olarak apoptozisin tetiklenebileceği düşünüldü.

Araştırmalarda hücre sınırlamaları veya yolak araştırmaları yönünden sınırlamalar görülmektedir. Bu çalışmada virüs enfeksiyonuna bağlı olarak, beş farklı hücre hattının eş zamanlı hücre canlılığı yanı sıra apoptotik ve otofajik yolakları da araştırılmıştır. BHV-1 kanser hücrelerini apoptozise zorlarken kullandığı markırları tespit edebilmek amacıyla BCL-2, kaspaz-8 ve kaspaz-9 markırları ELISA ile test edildi. Apoptotik yolaklarda antiapoptotik protein olarak görev yapan Bcl-2 seviyesi BHV-1 ile enfekte hücrelerde araştırılmıştır. Her hücre hattının değerleri kendi içerisinde değerlendirildiğinde özellikle düşük virüs sulandırılmalarında (0,1

moi, 1 moi, 2moi) zamana bağlı Bcl-2 seviyelerinde azalma tespit edildi. Bu hücrelerde apoptozisin virüs üremesine bağlı gerçekleşebileceğini düşündürdü. Apoptotik proteinlerden kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinleri *invitro* sistemlerde sıklıkla markır olarak kullanılmaktadır. Hücre içi kaspaz proteinleri apoptozisin gelişim yollarının görevli önemli proteinlerdir. Bu araştırmada virüs enfekte hücrelerdeki kaspaz-8 seviyeleri hücre kontrole göre daha yüksek tespit edildi. Bu artış zamana bağlı olarak virüs enfekte hücrelerde arttığı tüm hücre hatlarında da doğrulandı. Bu sonuçlar AO/EtBr boyama sonuçlarıyla uyumlu bulundu. Kaspaz-9 seviyeleri MDA-MB-231 hücreleri hariç virüs enfekte hücrelerde hücre kontrole kıyasla daha yüksek bulundu. Özellikle MDA-MB-231 hücrelerinde bu proteinde değişkenlik hücre kontrole kıyasla anlamlı bulunmadı. Diğer hücrelerde kaspaz-9 değişkenliği zamana göre artışla doğru orantılıydı. Apoptotik markır olarak bu araştırmada kullanılan proteinlerden kaspaz proteinleri özellikle kaspaz-8 sonuçları diğer testlerle uyumu yönünden daha anlamlı sonuçlar elde edildi. İleride yapılacak çalışmalarda kaspaz proteinlerin virüs üremesine bağlı apoptotik değişikliklerin izlenmesinde kullanılabileceği önerildi.

Otofaji, hücre bileşenlerinin bozunmasını takiben bu bozunmuş materyallerin otolizozomlar aracılığı ile sindirilmesini kapsayan bir süreçtir. Bu materyallerin sindirilebilmesi için lizozomlar ile kaynaşan otofagozomların oluşmasını sağlayan hücresel membran sistemi aracılığı ile olur. Bu membran sistemi lizozomlarla kaynaşır ve bozunmuş materyaller sindirilir (Klionsky ve Zughair 2016). Viral enfeksiyonlarında otofajinin gelişmesi veya tetiklenmesi değişkenlik göstermektedir. Bazı virüsler otofajiyi tetiklerken bazı virüsler oluşan otofagozomlar içerisinde enfeksiyözitelerini devam ettirebilirler. Onkolitik virüslerin otofajik yollar üzerine etkisi ile ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Fiorito ve diğ. (2020)'de yaptıkları çalışmada, Neuro-2A hücrelerinde BHV-1'in enfeksiyonu LC3-II'nin, ATG5'in ve Beclin-1'in artışına neden olduğu görülmüştür. Bu araştırmada BHV-1'in kanser hücrelerinde enfeksiyonunda, otofajik markırları tespit edebilmek amacıyla ATG7 ve p62 markırları ELISA ile test edildi. Bu test sonucunda, ATG7 protein seviyelerinde değişkenlik hücre hatlarının çeşitlerine göre gözlemlendi. PC3 ve MDA-MB-231 hücrelerinde bu protein seviyelerindeki farklılıklar anlamlı görülmedi. HeLa, DU145 ve A549 hücrelerinde farklı sulandırma ile

enfeksiyonlarında ATG7 seviyelerinde önemli artışlar tespit edildi. Bu protein seviyesindeki değişkenliği özellikle farklı hücrelerde değişmesi dikkat çekicidir. Bu durum farklı hücrelerde virüs enfeksiyonunu hücre içi mekanizmalarına ve yolaklarına etkisinin değişebileceğini önermektedir. Diğer araştırılan otofaji markırı p62 protein seviyeleri virüs enfeksiyonuna bağlı A549, DU145 ve PC3 hücrelerinde özellikle düşük dozlarla enfeksiyonda artış anlamlı bulundu. Hücrelerde virüs üremesine bağlı olarak görülen CPE görüntüsüne doğru orantılı olarak p62 seviyelerinde artış en erken 16. saatte tespit edildi. Bu sonuçlar farklı sulandırmada virüs enfeksiyonunun hücrelerde otofajiyi tetikleyebileceğini önermektedir. Otofajik yolların aktif gelişimi özellikle virüs dozlarının her hücrenin iç mekanizmasında farklılık göstererek tetiklenebileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; beş farklı kanser hücre hattında onkolitik virüs adaylarından biri olan *Bovine herpesvirus-1*'in onkolitik etkilerini, hücrelerdeki apoptotik ve otofajik ölüm yollarına olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda A549, MDA-MB-231, HeLa PC3, DU145 hücre hatlarının BHV-1 ile enfeksiyonu araştırıldı. Hücre canlılığına, apoptotik ve otofajik yollara olan etkisi değerlendirildi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre:

- A549, MDA-MB-231, HeLa, PC3, DU145 hücreler farklı titrelerde (0.1 moi, 1 moi, 2 moi, 5 moi ve 10 moi) BHV-1 ile enfeksiyonu sonrasında hücrelerde virüs üremesine bağlı CPE tespit edildi. Virüs üremesine bağlı olarak hücre yuvarlaklaşması, balonlaşma, vakuol oluşumu ve lizisler görüldü. Vakuol oluşumu sadece HeLa ve MDA-MD-231 hücrelerinde saptandı.

-Virüs üreme hızının hücrelerde çeşitlilik gösterdiği, en kısa sürede PC3 ve DU145 hücrelerinde CPE gözlemlendiği tespit edildi. Virüs üremesi tüm hücrelerde virüs titresini ve zamana bağlı doğru orantılı saptandı.

-Virüs üremesinin hücre canlılığına olan etkisi incelendiğinde en erken 4.saat itibaren hücrelerde sitotoksite tespit edilebildiği gibi virüs titresini ve zamana bağlı

olarak hücredeki sitotoksosite arttığı özellikle 48. saatte büyük oranlarda hücre kayıplarının olduğu belirlendi.

-Tüm hücrelerde virüs üremesine bağlı olarak erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler olduğu görüldü. Bu hücrelerin tüm dozlarda farklı saatlerde görülebileceği tespit edildi. Özellikle 48 saatten sonra mevcut tüm hücrelerde apoptotik hücre oranları %50 -95 aralığında belirlendi.

-BHV-1'in kanser hücrelerindeki apoptotik yolların üzerine etkisinin araştırılması amacıyla apoptotik markırlardan Bcl-2, kaspaz-9 ve kaspaz-8 seviyeleri incelendi. Bcl-2 seviyeleri hücrelerde değişkenlik gösterirken kaspaz protein seviyeleri AO/EtBr boyamalarıyla uyumlu olarak apoptotik sürecin gelişimi tespit edildi. Kaspaz-8 ve kaspaz-9 proteinlerinin daha ilerideki araştırmalarda da kullanılabileceği önerildi.

-BHV-1 enfeksiyonuna bağlı otofajik yolların incelenmesi amacıyla otofajik markırlardan ATG-7, p62 seviyeleri incelendi. ATG7 seviyeleri A549, DU145 ve HeLa hücrelerinde yüksek bulunurken p62 protein seviyeleri A549, DU145 ve PC3 hücrelerinde farklı virüs sulandırılmalarında anlamlı bulundu. BHV-1'e bağlı enfeksiyonda otofajinin gelişimi virüs titresi ve inkübasyon sürelerine göre değişebileceği önerildi.

-Bu çalışmada, BHV-1'in çalışılan kanser hücre hatlarında hücre canlılığı, hücre sitotoksitesi, apoptozis ve otofajiye etkisi olduğu görüldü. Bununla birlikte kanser hücrelerindeki ölüm mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla daha fazla apoptotik markırların ve otofajik markırların kullanılması ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- ADAIR, R. A., ROULSTONE, V., SCOTT, K. J., MORGAN, R., NUOVO, G. J., FULLER, M., BEIRNE, D., WEST E. J., JENNINGS, V. A., ROSE, A., KYULA J., FRASER, S., DAVE, R. ANTHONY, D. A., MERRICK A., PRESTWICH R., ALDOURI, A., DONNELLY, O., PANDHA, H., COFFEY, M., SELBY, P., VILE, R., TOOGOOD, G., HARRINGTON, K., MELCHER, A. A. 2012. Cell carriage, delivery, and selective replication of an oncolytic virus in tumor in patients. *Sci Transl Med.* 4;138:138ra77.
- AHMAD, R., MENEZES, J., KNAFO, L., AHMAD, A. 2001. Activated human platelets express fas-l and induce apoptosis in fas-positive tumor cells. *J Leukoc Biol.* 69(1):123-128.
- AHN, D. H., BEKAI-SAAB, T. 2017. The continued promise and many disappointments of oncolytic Virotherapy in gastrointestinal malignancies. *Biomedicines.* 5(1):10.
- ALBERGHINA, L., GAGLIO, D., GELFI, C., MORESCO, R. M., MAURI, G., BERTOLAZZI, P., MESSA, C., GILARDI, M. C., CHIARADONNA, F., VANONI, M. 2012. Cancer cell growth and survival as a system-level property sustained by enhanced glycolysis and mitochondrial metabolic remodeling. *Front Physiol.* 12;3:362.
- ALBERTS, P., TILGASE, A., RASA, A., BANDERE, K., VENSKUS, D. 2018. The advent of oncolytic virotherapy in oncology: the Rigvir® story. *Eur J Pharmacol.* 837:117-26.
- AMMIRANTE, M., LUO, J. L., GRIVENNIKOV, S., NEDOSPASOV, S., KARIN, M. 2010. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 464:302-5.

- ANDERSON, B. D., NAKAMURA, T., RUSSELL, S. J., PENG, S. W. 2004. High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus. *Cancer Res.* 64(14):4919-26.
- ANDTBACKA, R. H. I., AMATRUDA, T., NEMUNAITIS, J., ZAGER, J. S., WALKER, J., CHESNEY, J. A., LIU, K., HSU, C. P., PICKETT, C. A., MEHNERT, J. M. 2019. Biodistribution, shedding, and transmissibility of the oncolytic virus talimogene laherparepvec in patients with melanoma. *EBioMedicine* .47:89-97.
- ANDTBACKA, R. H., KAUFMAN, H. L., COLLICHIO, F., AMATRUDA, T., SENZER, N., CHESNEY, J., DELMAN, K. A., SPITLER, L. E., PUZANOV, I., AGARWALA, S. S., MILHEM, M., CRANMER, L., CURTI, B., LEWIS, K., ROSS, M., GUTHRIE, T., LINETTE, G. P., DANIELS, G. A., HARRINGTON, K., MIDDLETON, M. R., MILLER, W. H., ZAGER, J. S., YE, Y., YAO, B., LI, A., DOLEMAN, S., VANDERWALDE, A., GANSERT, J., COFFIN, R. S. 2015. Talimogene laherparepvec improves the sustained response rate in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol.* 33(25):2780-8.
- AU, G. G., BEAGLEY, L. G., HALEY, E. S., BARRY, R. D., SHAFREN, D. R. 2011. Oncolysis of malignant human melanoma tumors by coxsackieviruses A13, A15 and A18. *Virology* 8:22.
- AUBREY, J. B., KELLY, G. L., JANIC, A., HEROLD, M. J., STRASSER, A. 2018. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression. *Cell Death Differ.* 25(1):104-113.
- BADRINATH, N., HEO, J., YOO, S. Y. 2016. Viruses as nanomedicine for cancer. *International J Nanomedicine*.11:4835-47.
- BANCHEREAU, J., STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245-52.
- BARVE, M., BENDER, J., SENZER, N., CUNNINGHAM, C., GRECO, F. A., MCCUNE, D., STEIS, R., KHONG, H., RICHARDS, D., STEPHENSON, J.,

- GANESA, P., NEMUNAITIS, J., ISHIOKA, G., PAPPEN, B., NEMUNAITIS, M., MORSE, M., MILLS, B., MAPLES, P. B., SHERMAN, J., NEMUNAITIS, J. J. 2008. Induction of immune responses and clinical efficacy in a phase II trial of IDM-2101, a 10 epitope cytotoxic T-lymphocyte vaccine in metastatic non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 26(27):4418-25.
- BERCHTOLD, S., LAMPE, J., WEILAND, T., SMIRNOW, I., SCHLEICHER, S., HANDGRETINGER, R., KOPP, H. G., REISER, J., STUBENRAUCH, F., MAYER, N., MALEK, N. P., BITZER, M., LAUER, U. M. 2013. Innate immune defense defines susceptibility of sarcoma cells to measles vaccine virus-based oncolysis. *J Virol.* 87:3484-501.
- BIFFI, G., TUVESON, D. A. 2018. Deciphering cancer fibroblasts. *J Exp Med.* 3;215:2967-2968.
- BISWAS, S., BANDYOPSDHYAY, S., DIMRI, U., PATRA, P. H. 2013. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Vet Q.* 33(2):68-81.
- BLUMING, A. Z., ZIEGLER, J. L. 1971. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet.* 10;2(7715):105-6.
- BOMMAREDDY, P. K., SHETTIGAR, M., KAUFMAN, H. L. 2018. Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 18(8):498-513.
- BRATANICH, A. C., HANSON, N. D., JONES, C. 1992. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits the activity of immediate-early transcription unit 1. *Virology.* 191(2):988-91.
- BRATTON, S. B., WALKER, G., SRINIVASULA, S. M., SUN, X. M., BUTTERWORTH, M., ALNEMRI, E. S., COHEN, G. M. 2001. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J.* (20):998-1009.

- BREITBACH, C. J., ARULANANDAM, R., DE SILVA, N., THORNE, S. H., PATT, R., DANESHMAND, M., MOON, A., ILKOW, C., BURKE, J., HWANG, T. H., HEO, J., CHO, M., CHEN, H., ANGARITA, F. A., ADDISON, C., MCCART, J. A., BELL, J. C., KIRN, D. H. 2013. Oncolytic vaccinia virus disrupts tumor-associated vasculature in humans. *Cancer Res.*73:1265-75.
- BREITBACH, C. J., PATERSON, J. M., LEMAY, C. G., FALLS, T. J., MCGUIRE, A., PARATO, K. A., STOJDL, D. F., DANESHMAND, M., SPETH, K., KIRN, D., MCCART, J. A., ATKINS, H., BELL, J. C. 2007. Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther.* 15:1686-93.
- BRETZ, J. D., RYMASZEWSKI, M., ARSCOTT, P. L., MYC, A., AIN, K. B., THOMPSON, N. W., BAKER, Jr. J. R. 1999. TRAIL death pathway expression and induction in thyroid follicular cells. *The Journal Of Biological Chemistry.* (274):23627-23632..
- BROWN, J. M., ATTARDI, L. D. 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer.* (5):231-237.
- BRUCE, A., ALEXANDER, J., JULIAN, L., MARTIN, R., KEITH, R., PETER, W. 2002. IV. internal organization of the cell chapter 17. the cell cycle and programmed cell death. *Molecular biology of the cell 4th ed.* Bookshelf ID: NBK21056.
- CAIN, K., BRATTON, S. B., COHEN, G. M. 2002. The apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie.* (2-3):203-14.
- CAMPADELLI-FIUME, G., COCCHI, F., MENOTTI, L., LOPEZ, M. 2000. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol.* 10: 305-319.
- CELL SIGNAL.COM/ mitochondrial-control-of-apoptosis. Erişim Tarihi: 01.05.2022.

- CERVANTES-GARCIA, D., ORTIZ-LOPEZ, R., MAYEK-PEREZ, N., ROJAS-MARTINEZ, A. 2008. Oncolytic virotherapy. *Ann. Hepatol.* 7:34-45.
- CHEN, J. 2016. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 6 (3):1-15.
- CHUNG, C. S., HSOAO, J. C., CHANG, Y. S., CHANG, W. 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 72(2):1577-85.
- CLARKE, P., TYLER, K. L. 2009. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nature reviews. Microbiology.* 7(2):144-155.
- CLOUGHESY, T. F., AGHI, M. K., CHEN, C., ELDER, J. B., KESARI, S., KALKANIS, S. N., KAPTAIN, G., LANDOLFI, J. C., MIKKELSEN, T., PORTNOW, J., ROBBINS, J. M., OSTERTAG, D., DAS, A., CHU, A., VOGELBAUM, M. A. 2016. Encouraging survival with Toca 511 and Toca FC compared to external lomustine control. *J Clin Oncol.* 34(15):2030.
- COFFIN, R. 2016. Interview with Robert Coffin, inventor of T-Vec: the first oncolytic immunotherapy approved for the treatment of cancer. *Immunotherapy.* 8(2):103-6.
- CONNOLLY, S. A., WHITBECK, J. J., RUX, A. H., KRUMMENACHER, C., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., COHEN, G.H., EISENBERG, R. J. 2001. Glycoprotein D homologs in herpes simplex virus type 1, pseudorabies virus, and bovine herpes virus type 1 bind directly to human HveC (nectin-1) with different affinities. *Virol.* 280:7-18.
- COPPOLA, D., KHALIL, F., ESCHRICH, S. A., BOULWARE, D., YEATMAN, T., WANG, H. G. 2008. Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer.* 113:2665-70.
- CUDDINGTON, B. P., DYER, A. L., WORKENHE, S. T., MOSSMAN K. L. 2013. Oncolytic bovine herpesvirus type 1 infects and kills breast tumor cells and

breast cancer-initiating cells irrespective of tumor subtype. *Cancer Gene Ther.* 20, 282-289.

CUDDINGTON, B. P., VERSCHOOR, M., ASHKAR, A., MOSSMAN, K. L. 2015. Enhanced efficacy with azacytidine and oncolytic BHV-1 in a tolerized cotton rat model of breast adenocarcinoma. *Mol Ther Oncolytics.* 25;2:15004.

CUDDINGTON, B.P., MOSSMAN, K. L. 2014. Permissiveness of human cancer cells to oncolytic bovine herpesvirus 1 is mediated in part by KRAS activity. *J Virol.* 88(12):6885-95.

CUMBERBATCH, M. G., COX, A., TEARE, D., CATTO, J. W. 2015. Contemporary Occupational Carcinogen Exposure and Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 1;9:1282-90.

DANEN VAN OORCHOT, A. A., FISCHER, D. F., GRIMBERGEN, J. M., KLEIN, B., ZHUANG, S. M., FALKENBURG, J. H. F., BACKENDORF, C., QUAX, P. H., VAN DER EB, A. J., NOTEBORN, M. H. 1997. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells, but not normal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:5843-7.

DANTHI, P., GUGLIELMI, K. M., KIRCHNER, E., MAINOU, B., STEHLE, T., DERMODY, T. S. 2010. From touchdown to transcription: the reovirus cell entry pathway. *Curr Top Microbiol Immunol.* 343:91-119.

DEGENHARDT, K., MATHEW, R., BEAUDOIN, B., BRAY, K., ANDERSON, D., CHEN, G., MUKHERJEE, C., SHI, Y., GELINAS, C., FAN, Y., NELSON, D. A., JIN, S., WHITE, E. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 10:51-64.

DEVIREDDY, L. R., JONES, C. 1998. Alternative splicing of the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1 yields RNAs containing unique open reading frames. *J Virol.* 72(9):7294-301.

- DILILLO, D. J., YANABA, K., TEDDER, T. F. 2010. B cells are required for optimal CD4⁺ and CD8⁺ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol.* 184:4006-16.
- DISPENZIERI, A., TONG, C., LAPLANT, B., LACY, M. Q., LAUMANN, K., DINGLI, D., ZHOU, Y., FEDERSPIEL, M. J., GERTZ, M. A., HAYMAN, S., BUADI, F., O'CONNOR, M., LOWE, V. J., PENG, K. W., RUSSELL, S. J. 2017. Phase I trial of systemic administration of Edmonston strain of measles virus genetically engineered to express the sodium iodide symporter in patients with recurrent or refractory multiple myeloma. *Leukemia.* 31(12):2791-2798.
- DORAI, T., AGGARWAL, B. B., 2004. Role of chemopreventive agent in cancer therapy. *Cancer Letters.* 215(2):129-140.
- DUFFY, M. J. 2013. The war on cancer: are we winning?. *Tumor Biol.* 34(3):1275-1284.
- ELDE, N. C., CHILD, S. J., GEBALLE, A. P., MALIK, H. S. 2009. Protein kinase R reveals an evolutionary model for defeating viral mimicry. *Nature* 457, 485-489.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4):495-516.
- ERRINGTON, F., STEELE, L., PRESTWICK, R., HARRINGTON, K. J., PANDHA, H. S., VIDAL, L., DE BONO, J., SELBY, P., COFFEY, M., VILE, R., MELCHER A. 2008. Reovirus activates human dendritic cells to promote innate antitumor immunity. *J Immunol.* 180;9:6018-6026.
- FELT, S. A., MOERDYK-SCHAUWECKER, M. J., GRDZELISHVILI, V. Z. 2015. Induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by vesicular stomatitis virus. *Virology.* 474:163-173.
- FEND, L., YAMAZAKI, T., REMY, C., FAHRNER, C., GANTZER, M., NOURTIER, V., PREVILLE, X., QUEMENEUR, E., KEPP, O., ADAM, J., MARABELLE, A., PITT, J. M., KROEMER, G., ZITVOGEL, L. 2017.

Immune Checkpoint Blockade, Immunogenic Chemotherapy or IFN- α Blockade Boost the Local and Abscopal Effects of Oncolytic Virotherapy. *Cancer Res.* 1;77(15):4146-4157.

FERRER, I., PUIG, B., KRUPINSK, J., CARMONA, M., BLANCO, R. 2001. Fas and fas ligand expression in alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 102(2):121-31.

FIORITO, F., NOCERA, F. P., CANTIELLO, A., LOVANE, V., LAMBIASE, S., PICCOLO, M., FERRARO, M. G., SANTAMARIA, R., DE MARTINO, L. 2020. Bovine herpesvirus-1 infection in mouse neuroblastoma (Neuro-2A) cells. *Vet Microbiol.* 247:108762.

FRIDLENDER, Z. G., SUN, J., KIM, S., KAPOOR V., CHENG, G., LING, L., WORTHEN, G. S., ALBELDA, S. M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell.* 16:183-94.

FRIDMAN, W. H., PAGES, F., SAUTES-FRIDMAN, C., GALON, J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 12:298-306.

FU, X., TAO, L., ZHANG, X. 2007. An oncolytic virus derived from type 2 herpes simplex virus has potent therapeutic effect against metastatic ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* 14(5):480-7.

FUKUHARA, H., INO, Y., TODO, T. 2016. Oncolytic virus therapy: A new era in cancer therapy at dawn. *Cancer Science.* 107(10):1373-9.

FULDA, S. and DEBATIN, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* (25):4798–4811.

FURUKAWA, Y., TAKASU, A., YURA, Y. 2017. Role of autophagy in oncolytic herpes simplex virus type 1-induced cell death in squamous cell carcinoma cells. *Cancer Gene Ther.* 24(9):393-400.

- GADDY, D. F., LYLES, D. S. 2007. Oncolytic vesicular stomatitis virus induces apoptosis via signaling through PKR, Fas, and Daxx. *J. Virol.* 81:2792-2804.
- GALANIS, E., HARTMANN, L. C., CLIBY, W. A., LONG, H. A., PEETHAMBARAM, P. P., BARRETTE, B. A., KAUR, J. S., HALUSKA, P. J., ADERCA, I., ZOLLMAN, P. J., SLOAN, J. A., KEENEY, G., ATHERTON, P., J., PODRATZ, K. C., DOWDY, S. C., STANHOPE, C. R., WILSON, T. O., FEDERSPIEL, M. J., PENG, K. W., RUSSELL, S. J. 2010. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer Res.* 70(3):875-82.
- GASCARD, P., TLSTY, T. D. 2016. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* 30:1002-19.
- GEEVARGHESE, S. K., GELLER, D. A., DE HAAN, H. A., HORER, M., KNOLL, A. E., MESCHEDER, A., NEMUNAITIS, J., REID, T. R., SZE, D. Y., TANABE, K. K., TAWFIK, H. 2010. Phase I/II study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with refractory colorectal cancer metastatic to the liver. *Hum Gene Ther.* 21(9):1119-28.
- GERAGHTY, R. J., KRUMMENACHER, C., COHEN, G. H., EISENBERG, R. J., SPEAR, P. G. 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science.* 280: 1618-1620.
- GIORGIO, M., MIGLIACCIO, E., ORSINI, F., PAOLUCCI, D., MORONI, M., CONTURSI, C., PELLICCIA, G., LUZI, L., MINUCCI, S., MARCACCIO, M., PINTON, P., RIZZUTO, R., BERNARDI, P., PAOLUCCI, F., PELICCI P. G. 2005. Electron transfer between cytochrome c and p66shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell.* 122(2):221-33.
- GLASNER, A., LEVI, A., ENK, J., ISAACSON, B., VIUKOV, S., ORLANSKI, S., SCOPE, A., NEUMAN, T., ENK, C. D., HANNA, J. H., SEXL, V., JONJIC, S., SELIGER, B., ZITVOGEL, L., MANDELBOIM, O. 2018. NKp46 Receptor-

- Mediated Interferon- γ Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. *Immunity*. 48:107-119.e4.
- GLICK, D., BARTH, S., MACLEOD, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 221(1):3-12.
- GONG, J., SACHDEY, E., MITA, A. C., MITA, M. M. 2016. Clinical development of reovirus for cancer therapy: an oncolytic virus with immune-mediated antitumor activity. *The World J Method*. 6(1):25-42.
- GORADEL, N. H., BAKER, A. T., ARASHKIA, A., EBRAHIMI, N., GHORGHANLU, S., NEGAHDARI, B. 2021. Oncolytic virotherapy: Challenges and solutions. *Curr Probl Cancer*. 45(1):100639.
- GRANOT, Z., JABLONSKA, J. 2015. Distinct Functions of Neutrophil in Cancer and Its Regulation. *Mediators Inflamm*. 2015:701067.
- GREEN, D. R., LLAMBI, F. 2015. Cell death signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 12(3): a006080.
- GROSS, A., MCDONNELL, J. M., KORSMEYER, S. J. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis *Genes & Dev*. (13):1899-1911.
- GROTE, D., CATTANEO, R., FIELDING, A. K. 2003. Neutrophils contribute to the measles virus-induced antitumor effect: enhancement by granulocyte macrophage colony-stimulating factor expression. *Cancer Res*. 63(19):6463-8.
- GUILLERME, J. B., BOISGERAULT, N., ROULOIS, D., MENAGER, J., COMBREDET, C., TANGY, F., FONTENEAU, J. F., GREGOIRE, M. 2013. Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 19(5):1147-58.
- HAMMON, W. M., YOHN, D. S., CASTO, B. C., ATCHISON, R. W. 1963. Oncolytic Potentials of Nonhuman Viruses for Human Cancer. I. Effects of

Twenty-Four Viruses on Human Cancer Cell Lines. *J Natl Cancer Inst.* 31: 329-345.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*144:646-74.

HANON, E., MEYER, G., VANDERPLASSCHEN, A., DESSY-DOIZE, C., THIRY, E., PASTORET, P. P. 1998. Attachment but not penetration of *Bovine herpesvirus 1* is necessary to induce apoptosis in target cell. *Journal of Virology.* 72:7638-7641.

HARRINGTON, K., FREEMAN, D. J., KELLY, B., HARPER, J., SORIA, J. C. 2019. Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 18(9):689-706.

HAUPT, S., BERGER, M., GOLDBERG, Z., HAUPT, Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *Journal of Cell Science.* (116):4077-4085.

HE, L., ZHANG, J., ZHAO, J., MA, N., KIM, S. W., QIAO, S., MA X. 2018. Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress. *Adv. Nutr.* 9:493-504.

HEISE C., SAMPSON-JOHANNES, A., WILLIAMS, A., MCMORMICK, F., VON HOFF, D. D., KIRN, D. H. 1997. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med.* 3(6):639-45.

HEO, J., REID, T., RUO, L., BREITBACH, C. J., ROSE, S., BLOOMSTON, M., CHO, M., LIM, H. Y., CHUNG, H. C., KIM, C. W., BURKE, J., LENCIONI, R., HICKMAN T., MOON, A., LEE, Y. S., KIM, M. K., DANESHMAND, M., DUBOIS, K., LONGPRE, L., NGO, M., ROONEY, C., BELL, J. C., RHEE, B. G., PATT, R., HWANG, T. H., KIRN, D. H. 2013. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med.* 19(3):329-36.

- HILEY, C. T., YUAN, M., LEMOINE, N. R., WANG, Y. 2010. Lister strain vaccinia virus is a potential therapeutic vector targeting hypoxic tumors. *Gene Ther.* 17(2):281-7.
- HOFMANN, J., PLETZ, W. R., LIEBERT, U. G. 1999. The in vitro cytopathic effect of the Rubella virus is caused by apoptosis. *J Gene Virol.* 80:1657-64.
- HOLMGAARD, R. B., BRACHFELD, A., GASMI, B., JONES, D. R., MATTAR, M., DOMAN, T., MURPHY, M., SCHAEER, D., WOLCHOCK, J. D., MERGHOUB, T. 2016. Timing of CSF-1/CSF-1R signaling blockade is critical to improving responses to CTLA-4 based immunotherapy. *Oncoimmunology.* 5:e1151595.
- HOSTNIK, P., ČERNE, D., MRKUN, J., STARIČ, J., TOPLAK, I. 2021. Review of Infections With Bovine Herpesvirus 1 in Slovenia. *Front Vet Sci.* 1;8:676549.
- HUNTER, E. 2001. Virus assembly. Chapter 8. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields' virology.* 4th ed. Volume 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. S: 171-197.
- HUSHUR, O., TAKASHIMA, Y., MATSUMOTO, Y., OTSUKA, H. 2004. Restriction of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) growth in non-permissive cells beyond the expression of immediate early genes. *J. Vet. Med. Sci.* 66:453-455.
- INMAN, M., ZHOU, J., WEBB, H., JONES, C. 2004. Identification of a novel transcript containing a small open reading frame that is expressed during latency, and is antisense to the latency related gene of bovine herpes virus 1 (BHV-1). *J Virol.* 78:5438-47.
- ITAKURA, E., KISHI, C., INOUE, K., MIZUSHIMA, N. 2008. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell.* 19:5360-5372.
- JAHANGIR, M., BADOLATO, C., AHANGARI, R. 2020. Immunotherapy. *Epidemiology of Endocrine Tumors.* 489-504.

- JAN, R., CHAUDHRY, G. 2019. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Adv Pharma Bull.* 9(2):205-218.
- JHA, S., KITSIS, R. N. 2011. Chapter 6 - Myocardial basis for heart failure: role of cell death. *Heart Failure: A Companion To Braunwald's Heart Disease (Second Edition)*:85-102.
- JIANG, G. M., TAN, Y., WANG, H., PENG, L., CHEN, H. T., MENG, X. J., LI, L. L., LIU, Y., LI, W. F., SHAN, H. 2019. The relationship between autophagy and the immune system and its applications for tumor immunotherapy. *Mol Cancer.* 24;18(1):17.
- YU, W., FANG, H. 2007. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets.* 7(2):141-148.
- JIN, Z., MCDONALD, E. R., DICKER, D. T., EL-DEIRY, W. S. 2004. Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (trail) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to trail-induced apoptosis. *The Journal Of Bio. Chemistry.* (279):35829-35839.
- JOHNSTONE, R. W., RUEFLI, A. A., LOWE, S. W. 2002. Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Article History.* 2(108):153-164.
- JONES, C. 1998. Alphaherpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Adv Virus Res.* 51:81-133.
- JONES, C. 2009. Regulation of innate immune responses by bovine herpesvirus 1 and infected cell protein 0. *Viruses.* 1:255-75.
- WIRTH, U. V., VOGT, B., SCHWYZER, M. 1991. The three major immediate-early transcripts of bovine herpesvirus 1 arise from two divergent and spliced transcription units. *J Virol.* 65(1):195-205.

- KALE, J., OSTERLUND, E. J., ANDREWS, D. W. 2018. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death & Differentiation*. (25):65-80.
- KAMPA, J., STAHL, K., MORENO-LOPEZ, J., CHANLUN, A., AIUMLAMAI, S., ALENIUS, S. 2004. BVDV and BHV-1 Infections in Dairy Herds in Northern and Northeastern Thailand. *Acta Vet Scand*. 45:181-192.
- KANERVA, A., NOKISALMI, P., DIACONU, I., KOSKI, A., CERULLO, V., LIIKANEN, I., TAHTINEN, S., OKSANEN, M., HEISKANEN, R., PESONEN, S., JOENSUU, T., ALANKO, T., PARTANEN, K., LAASONEN, L., KAIREMO, K., PESONEN, S., KANGASNIEMI, L., HEMMINKI A. 2013. Antiviral and antitumor T-cell immunity in patients treated with GM-CSF-coding oncolytic adenovirus. *Clin Cancer Res*. 19:2734-44.
- KANNAN, K., JAIN, S. 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 7(3):153-163.
- KAUFMAN, H. L., KIM, D. W., DETAFFELE, G., MITCHAM, J., COFFIN, R. S., KIM-SCHULZE, S. 2010. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol*. 17(3):718-30.
- KAUFMAN, H. L., KOHLHAPP, F. J., ZLOZA, A., 2015. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 14;9:642-662.
- KAUFMANN, T., STRASSER, A., JOST, P. 2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ*. 19:42-50.
- KAUSHIK, S., CUERVO, A. M. 2018. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 19(6):365-381.
- KELLY, E., RUSSELL, S. J. 2007. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther*. 15:651-659.

- KEMBALL, C. C., ALIREZAEI, M., WHITTON, J. L. 2010. Type B coxsackieviruses and their interactions with the innate and adaptive immune systems. *Future Microbiol.*5(9):1329-1347.
- LICHTY, B. D., POWER, A. T., STOJDL, D. F., BELL, J. C. 2004. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med.*10(5):210-216.
- KEMENY, N., BROWN, K., COVEY, A., KIM, T., BHARGAVA, A., BRODY, L., GUILFOYLE, B., HAAG, N. P., KARRASCH, M., GLASSCHROEDER, B., KNOLL, A., GETRAJDMAN, G., KOWAL, K. J., JARNAGIN, W. R., FONG, Y. 2006. Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther.* 17: 1214-1224.
- KERR, J. F., WINTERFORD, C. M., HARMON, B. V. 1994. Apoptosis. its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 15;73(8):2013-2026.
- KIM, J., KUNDU, M., VIOLET, B., GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13:132-141.
- KLIONSKY, D. J., ZUGHAIER, S. M. 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 3(12):1-222.
- KNIPE, D. M., SAMUEL, C. E., PALESE, P. 2001. Virus-host cell interactions. Chapter 7. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields' virology.* 4th ed. Volume 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. S: 133-170.
- KOCH, C. P., LENDON, G. M. 2000. Cytochrome *c* binding to apaf-1: the effects of datp and ionic strength. *PNAS.* 97(22):11928-11931.
- KRUIDERING, M., EVAN, G. I. 2008. Caspase-8 in apoptozis; the beginning of ‘‘the end’’. *IUBMB Life.* 50(2):85-90.

- KRYCZEK, I., ZOU, L., RODRIGUEZ, P., ZHU, G., WEI, S., MOTTRAM, P., BRUMLIK, M., CHENG, P., CURIEL, T., MYERS, L., LACKNER, A., ALVAREZ, X., OCHOA, A., CHEN, L., ZOU, W. 2006. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med.* 203:871–81.
- KUMAR, S. 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death & Differentiation.* (14):32–43.
- QIU, W., DING, X., LI, S., HE, Y., ZHU, L. 2021. Oncolytic Bovine Herpesvirus 1 Inhibits Human Lung Adenocarcinoma A549 Cell Proliferation and Tumor Growth by Inducing DNA Damage. *International journal of molecular sciences.* 22(16):8582.
- LEBLANC, H. N., ASKENAZI. 2003. Apo2L/TRAIL and Its Death and Decoy Receptors. *Cell Death & Differentiation.* (10):66–75.
- LECOT, P., SARABI, M., PEREIRA, A. M., MUSSARD, J., KOENDERMAN, L., CAUX, C., 2019. Bendriss-Vermare N, Michallet MC. Neutrophil Heterogeneity in Cancer: From Biology to Therapies. *Front Immunol.* 10:2155.
- LETAI, A. 2017. Apoptosis and cancer. *Annual Review of Cancer Biology.* (1):275-294.
- LI, H., ZENG, Z., FU, X., ZHANG, X. 2007. Co-administration of oncolytic virus and a cyclophosphamide-based herpes simplex virus-2 produces a synergistic antitumor effect and enhances tumor-specific immune responses. *Cancer Res.* 67(16):7850-5.
- LI, J., YUAN, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 27(48): 6194-6206.
- LIANG, X. H., JACKSON, S., SEAMAN, M., BROWN, K., KEMPKE, B., HIBSHOOSH, H., LEVINE, B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 402:672-6.

- LI, L., YOU, L., MAO, L., JIN, S., CHEN, X., QIAN, W. 2018. Combing oncolytic adenovirus expressing Beclin-1 with chemotherapy agent doxorubicin synergistically enhances cytotoxicity in human CML cells in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.* 39(2):251-260.
- LI, X., HE, S., MA, B. 2020. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer.* 22;19(1):12.
- LI, Y., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S., BABIUK, L. A., LIANG, X. 1995. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C, and D: identification of a dual cell-binding function of gB. *J Virol.* 69: 4758-4768.
- LIN, Y., DEVIN, A., RODRIGUEZ, Y., LIU, Z. G. 1999. Cleavage of the death domain kinase rip by caspase-8 prompts tnf-induced apoptosis. *Genes & Dev.* (13):2514-2526.
- LIANG, C., FENG, P., KU, B., DOTAN, I., CANAANI, D., OH, B. H., JUNG, J. U. 2006. Autophagic and tumor suppressive activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* 8(7):688-99.
- LOKTEV, V., IVAN'KINA, T. Y., NETESOV, S., CHUMAKOV, P. 2012. Oncolytic parvoviruses. A new approaches for cancer therapy. *Ann Russ Acad Med Sci.* 67(2):42-7.
- LOPEZ, J., TAÏT, S. W. G. 2015. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer.* 112(6):957-962.
- LORETO, C., ROCCA, G. L., ANZALONE, R., CALTABIANO, R., VESPASIANI, G., CASTORINA, S., RALPH, D. J., CELLEK, S., MUSUMECI, G., GIUNTA S., DJINOVIC R., BASIC D., And SANSALONE S. 2014. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in peyronie's disease. *Biomed Res Int.* (2014):1-10.
- LOWE, S. W., LIN, A. W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 3(21):485-495.

- MADER, E. K., MAEYAMA, Y., LIN, Y., BUTLER, G. W., RUSSELL, H. M., GALANIS, E., RUSSELL, S. J., DIETZ, A. B., PENG, K. W. 2009. Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clin Cancer Res.* 15(23):7246-55.
- MAIURI, M. C., CRIOLLO, A., KROEMER, G. 2010. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J.* 29:515-516.
- MAJI, S., PANDA, S., SAMAL, S. K., SHRIWAS, O., RATH, R., EMDAD, M. P. L., DAS, S. K., FISHER, P. B., DASH, R. 2018. Chapter Three - Bcl-2 antiapoptotic family proteins and chemoresistance in cancer. *Adv Cancer Res.* (137):37-75.
- MANTOVANI, A., MARCHESI, F., MALESCI, A., LAGHI, L., ALLAVENA, P. 2017. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 14:399-416.
- MARCELLUS, R. C., TEODORO, J. G., WU, T., BROUGH, D. E., KETNER, G., SHORE, G. C., BRANTON, P. E. 1996. Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for EIA-induced p53-independent apoptosis. *J Virol.* 70:6207-15.
- MAROUN, J., MUNOZ-ALIA, M., AMMAYAPPAN, A., SCHULZE, A., PENG, K. W., RUSSELL, S. 2017. Designing and building oncolytic viruses. *Future Virol.* 12(4):193-213.
- MARTINEK, J., WU, T. C., CADENA, D., BANCHEREAU, J., PALUCKA, K. 2019. Interplay between dendritic cells and cancer cells. *Int Rev Cell Mol Biol.* 348:179-215.
- MARTINS, G. I. A., VIEIRA, L. Q., CUNHA, F. Q., SILVA, J. S. 1999. Gamma interferon modulates cd95 (fas) and cd95 ligand (fas-l) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of trypanosoma cruzi infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun.* 67(8):3864-3871.

- MARTUZA, R. L., MALICK, A., MARKERT, J. M., RUFFNER, K. L., COEN, D. M. 1991. Experimental treatment of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*. 252(5007):854-6.
- MATSUURA, K., CANFIELD, K., FENG, W., KUROKAWA, M. 2016. Chapter two - metabolic regulation of apoptosis in cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*.(327):43-87.
- MCILWAIN, D. R., BERGER, T., MAK, T. W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Bio*. 5(4): a008656.
- MIZUSHIMA, N. 2005. The pleiotropic role of autophagy: From protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*. 12(2):1535-1541.
- MIZUSHIMA, N. 2007. Autophagy: Process and function. *Genes Dev*. 21:2861-2873.
- MURPHY, F. A., GIBBS, E. P. J., HORZINEK M. G., STUDDERT, M. J. 1999. Herpesviridae. In: FA Murphy, EPJ Gibbs, MC Horzinek, MJ Studdert (eds.) *Veterinary Virology*, 3 ed., *Academic Press*. S:301-325.
- MURRAY, P. J., ALLEN, J. E., BISWAS, S. K., FISHER, E. A., GILROY, D. W., GUERDT, S., GORDON, S., HAMILTON, J. A., IVASHKIV, L. B., LAWRENCE, T., LOCATI, M., MANTOVANI, A., MARTINEZ F. O., MEGE, J. L., MOSSER, D. M., NATOLI, G., SAEIJ, J. P., SCHULTZE J. L., SHIREY, K. A., SICA, A., SUTTLES, J., UDALOVA, I., VAN GINDERACHTER, J. A., VOGEL, S. N., WYNN, T. A. 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 41:14-20.
- NAGARA, J. S., YOUN, J. I., GABRILOVICH, D. I. 2013. Reciprocal relationship between myeloid-derived suppressor cells and T cells. *J Immunol*. 191:17-23.
- NAGATA, S., NAGASE, H., KAWANE, K., MUKAE, N., FUKUYAMA, H. 2003. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. (10):108-116.

- PACELLA, I., PICONESE, S. 2019. Immunometabolic Checkpoints of Treg Dynamics: Adaptation Microenvironmental Opportunities and Challenges. *Front Immunol.* 10:1889.
- PAGLIARI, L. J., PINKOSKI, M. J., GREEN, D. R. 2010. Mitochondria and the activation of caspase-9. *Handbook Of Cell Signaling (Second Edition)*.:2535-2543.
- PARK, S. H., BREITBACH, C. J., LEE, J., PARK, J. O., LIM, H. Y., KANG, W. K., MOON, A., MUN, J. H., SOMMERMANN, E. M., MARURI A. L., PATT, R., PELUSIO, A., BURKE, J., HWANG, T. H., KIRN, D., PARK, Y. S. 2015. Phase 1b trial of biweekly intravenous Pexa-Vec (JX-594), an oncolytic and immunotherapeutic vaccinia virus in colorectal cancer. *Mol Ther.* 23(9):1532-40.
- PATHRIA, P, LOUIS, T. L., VARNER, J. A. 2019. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol.* 40:310-27.
- PIHAN, P., CARRERAS-SUREDA, A, HETZ, C. 2017. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise. *Cell Death Differ.* 24(9):1478-1487.
- POPULO, H., LOPES, J. M., SOARES, P. 2012. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 13:1886-1918.
- PORTELA, A., ESTELLER, M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 28(10):1057-68.
- POZZESI, N., FIERABRACCI, A., LIBERATI, A. M., MARTELLI, M. P., AYROLDI, E., RICCARDI, C., DELFINO, D. V. 2014. Role of caspase-8'in thymus function. *Cell Death Differ.* 21(2):226–233.
- PRYSLIAK, T., VAN DER MERWE, J., LAWMAN, Z., WILSON, D., TOWNSEND, H., PEREZ-CASAL, J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. 2011. Respiratory disease caused by Mycoplasma bovis is enhanced by exposure to bovine herpes virus 1 (BHV-1) but not to bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2. *Can Vet Journal.* 52:1195-1202.

- PUHLMANN, M., BROWN, C. K., GNANT, M., HUANG, J., LIBUTTI, S. K., ALEXANDER, H. R., BARTLETT, D. L. 2000. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther.* 7(1):66-73.
- QU, X., YU, J., BHAGAT, G., FURUYA, N., HIBSHOOSH, H., TROXEL, A., ROSEN, J., ESKELINEN, E. L., MIZUSHIMA, N., OHSUMI, Y., CATTORETTI, G., LEVINE, B. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 112:1809-20.
- RADOGNA, F., CRISTOFANON, S., PATERNOSTER, L., D'ALESSIO, M., NICOLA, M. D., CERELLA, C., DICATO, M., DIEDERICH, M., GHIBELLI, L. 2007. melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of bcl-2. *J. Pineal Res.* 44(3):316-25.
- RAMPLING, R., CRUICKSHANK, G., PAPANASTASSIOU, V., NICOLL, J., HADLEY, D., BRENNAN, D., PETTY, R., MACLEAN, A., HARLAND, J., MCKIE, E., MABBS, R., BROWN, M. 2000. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther.* 7: 859-866.
- RIBAS, A., DUMMER, R., PUZANOV, I., VANDERWALDE, A., ANDTBACKA, R. H. I., MICHIELIN, O., OLSZANSKI, A. J., MALVEHY, J., CEBON, J., FERNANDEZ, E., KIRKWOOD, J. M., GAJEWSKI, T. F., CHEN, L., GORSKI, K. S., ANDERSON, A. A., DIEDE, S. J., LASSMAN, M. E., GANSERT, J., HODI, F. S., LONG, G. V. 2017. Oncolytic virotherapy promotes intratumoral T cell infiltration and improves anti-PD-1 immunotherapy. *Cell.* 170:1109-19.
- RODRIGUES, R., CUDDINGTON, B., MOSSMAN, K. 2010. Bovine herpesvirus type 1 as a novel oncolytic virus. *Cancer Gene Ther.* 17(5):344-55.
- ROULSTON, A., MARCELLUS, R. C., BRANTON, P. E. 1999. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Mikrobiol.* 53 :1-60.

- RUSSELL, S. J., PENG, K. W., BELL, J. C., 2012. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol.* 30:658-70.
- SADE-FELDMAN, M., KANTERMAN, J., KLIEGER, Y., ISH-SHALOM, E., OLGA, M., SARAGOVI, A., SHTAINBERG, H., LOTEM, M., BANIYASH, M. 2016. Clinical Significance of Circulating CD33+CD11b+HLA-DR-Myeloid Cells in Patients with Stage IV Melanoma Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res.* 22:5661-72.
- SAHA, S., MUKHERJEE, S., KHAN, P., KAJAL, K., MAZUMDAR, M., MANNA, A., MUKHERJEE, S., DE, S., JANA, D., SARKAR, D. K., DAS, T. 2016. Aspirin Suppresses the Acquisition of Chemoresistance in Breast Cancer by Disrupting an NF κ B-IL6 Signaling Axis Responsible for the Generation of Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 1;76(7):2000-12.
- SANTOS, J. M., HAVUNEN, R., HEMMINKI, A. 2020. Modulation of the tumor microenvironment with an oncolytic adenovirus for effective T-cell therapy and checkpoint inhibition. *Methods Enzymol.* 635:205-30.
- SARASTE, A., PULKKI, K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 3(45):528-537.
- SCHRODER, C., KEIL, G. M. 1999. Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH(W450) and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *J Gen Virol.* 80: 57-61.
- SHAKERI, R., HEIROLLAHI, A. K., DAVOODI, J. 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie.* (135):111-125.
- SHALAPOUR, S., FONT-BURGADA, J., DI CARO, G., ZHONG, Z., SANCHEZ-LOPEZ, E., DHAR, D., WILLIMSKY, G., AMMIRANTE, M., STRASNER, A., HANSEL, D. E., JAMIESON, C., KANE, C. J., KLATTE, T., BIRNER, P., KENNER, L., KARIN, M. 2015. Immunosuppressive plasma cells impede T-cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature.* 521:94-8.

- SHARMA, S. V., LEE, D. Y., LI, B., QUINLAN, M. P., TAKAHASHI, F., MAHESWARAN, S., MCDERMOTT, U., AZIZIAN, N., ZOU, L., FISCHBACH, M. A., WONG, K. K., BRANDSTETTER, K., WITTNER, B., RAMASWAMY, S., CLASSON, M., SETTLEMAN, J. A. 2010. chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*. 2;141(1):69-80.
- SHI, Y. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* 13(8):1979–1987.
- SISTIGU, A., DI MODUGNO, F., MANIC, G., NISTICO, P. 2017. Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* 36:67-77.
- SMYTH, M. J., THIA, K. Y., STREET, S. E., MACGREGOR, D., GODFREY, D. I., TRAPANI, J. A. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 192:755-60.
- STOLZ, A., ERNST, A., DIKIC, I. 2014. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* 16:495-501.
- SUN, X, INGMAN, W. V. 2014. Cytokine networks that mediate epithelial cell-macrophage crosstalk in the mammary gland: implications for development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 19:191-201.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A., BRAY, F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 71(3):209-249.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A., BRAY F. 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021:21660.

- SUNGUR C. M., MURPHY, W. J. 2014. Positive and negative regulation by NK cells in cancer. *Crit Rev Oncog.* 19:57-66.
- SWANN, J. B., SMYTH, M. J. 2007. Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation.* 117(5):1137-1146.
- SYN, N. L., TENG, M. W. L., MOK, P. T. S. K., MBBS, R. A. S. 2017. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet Oncology.* 18(12):731-741.
- TAKEDA, K., HAYAKAWA, Y., SMYTH, M. J., KAYAGAKI, N., YAMAGUCHI, N., KAKUTA, S., IWAKURA, Y., YAGITA, H., OKUMURA, K. 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med.* 7:94-100.
- TAZAWA, H., YANO, S., YOSHIDA, R., YAMASAKI, Y., SASAKI, T., HASHIMOTO, Y., KURODA, S., OUCHI, M., ONISHI, T., UNO, F. 2012. Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1-microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *Int. J. Cancer.* 131(12):2939-50.
- TODDE, V., VEENHUIS, M., VAN DER KLEI, I. J. 2009. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1792(1):3-13.
- TODO, T., MARTUZA, R. L., RABKIN, S. D., JOHNSON, P. A. 2001. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I expression and tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(11):6396-401.
- TONG, Y., YOU, L., LIU, H., LI, L., MENG, H., QIAN, Q., QIAN, W. 2013. Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing Beclin-1 via induction of autophagic cell death in leukemia. *Oncotarget.* 4(6):860-74.
- TORII, S., YOSHIDA, T., ARAKAWA, S., HONDA, S., NAKANISHI, A., SHIMIZU, S. 2016. Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO Rep.* 17:1552-1564.

- TOTH, K., WASSERKORT, R., SIPOS, F., KALMAR, A., WICHMANN, B., LEISZTER, K., VALCZ, G., JUHASZ, M., MIHELLER, P., PATAI, Á. V., TULASSAY, Z., MOLNAR, B. 2014. Detection of methylated septin 9 in tissue and plasma of colorectal patients with neoplasia and the relationship to the amount of circulating cell-free DNA. *PloS one*. 9(12): e115415.
- TRAFIALEK, J., KOLANOWSKI, W. 2014. Dietary exposure to meat-related carcinogenic substances: is there a way to estimate the risk? *Int J Food Sci Nutr*. 65(6):774-80.
- TROY, C. M., AKPAN, N., JEAN, Y. Y. 2011. Regulation of caspases in the nervous system implications for functions in health and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 99:265-305.
- TURIN, L., RUSSO, S., POLI, G. 1999. BHV-1: New Molecular Approaches to Control a Common and Widespread Infection. *Mol Med*. 5, 261-284.
- TYLER, K. L., NATHANSON, N. 2001. Pathogenesis of viral infections. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields' virology*. 4th ed. Volume 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. S:199-243.
- VARFOLOMEEV, E. E., ASHKENAZI, A. 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis junkie. *Cell*. (116):491-497.
- WAJANT, H., PFIZENMAIER, K., SCHEURICH, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*. (10):45-65.
- WANG, F., MA, Y., BRARRETT, J. W., GAO, X., LOH, J., BARTON, E., VIRGIN, H. W., MCFADDEN, G. 2004. Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol*. 5(12):1266-74.
- WANG, S., EL-DEIRY, W. S. 2003. TRAIL and apoptosis induction by tnf-family death receptors. *Oncogene*. (22):8628–8633.

- WASHBURN, B., SCHIRRMACHER, V. 2002. Human tumor cell infection by Newcastle Disease Virus leads to upregulation of HLA and cell adhesion molecules and to induction of interferons, chemokines and finally apoptosis. *Int J Oncol.* 21(1):85-93.
- WEBSTER, J. D., VUCIC, D. 2020. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Front Cell Dev Biol.* 21;8:365.
- WILD, P., MCEWAN, D. G., DIKIC, I. 2014. The LC3 interactome at a glance. *J. Cell Sci.* 127:3-9.
- WINKLER, M. T. C., DOSTER, A., JONES, C. 1999. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4+ t lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J Virol.* 73:8657-8668.
- WONG, H. H., LEMOINE, N. R., WANG, Y. 2010. Oncolytic viruses for cancer therapy: overcoming the obstacles. *Viruses.* 2(1):78-106.
- WONG, R. S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 30(1):87.
- WYLER, R., ENGLES, M., SCHWYZER, M. 1989. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: Wittmann G, editor. *Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs., Developments In Veterinary Virology.* Boston: Kluwer Academic Publishers. S:1-172.
- XU, X., ZHANG, K., HUANG, Y., DING, L., CHEN, G., ZHANG, H., TONG, D. 2012. Bovine herpes virus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria-controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. *Virol J.* 17;9:202.
- YAGHCHI, A. C., ZHANG, Z., ALUSI, G., LEMOINE, N. R., WANG, Y. 2015. Vaccinia virus, a promising new therapeutic agent for pancreatic cancer. *Immunotherapy.* 7(12):1249-58.

- YAMADA, A., ARAKAKI, R., SAITO, M, KUDO, Y., ISHIMARU, N. 2017. Dual role of fas/fasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Front. Immunol.* (8): 403.
- ZAMARIN, D., PALESE, P. 2012. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol.* 7;3:347-367.
- ZEHIR, A., BENAYED, R., SHAH, R. H., SYED, A., MIDDHA, S., KIM, H. R., SRINIVASAN, P., GAO, J., CHAKRAVARTY, D., DEVLIN, S. M., HELLMANN, M. D., BARRON, D. A., SCHRAM, A. M., HAMEED, M., DOGAN, S., ROSS, D. S., HECHTMAN, J. F., DELAIR, D. F., YAO, J. J., MANDELKER, D. L., CHENG, D. T., CHANDRAMOHAN, R., MOHANTY, A. S., PTASHKIN, R. N., JAYAKUMARAN, G., PRASAD, M., SYED, M. H., REMA, A. B., LIU, Z. Y., NAFA, K., BORSU, L., SADOWSKA, J., CASANOVA, J., BACARES, R., KIECKA, I. J., RAZUMOVA, A., SON, J. B., STEWART, L., TESSARA, B., MULLANEY, K. A., AL-AHMADIE, H., VAKIANI, E., ABESHUSE, A. A., PENSON, A. V., JONSSON, P., CAMACHO, N., CHANG, M. T., WON, H. H., GROSS, B. E., KUNDRU, R., HEINS, Z. J., CHEN, H. W., PHILLIPS, S., ZHANG, H., WANG, J., OCHOA, A., WILLS, J., EUBANK, M., THOMAS, S. B., GARDOS, S. M., REALES, D. N., GALLE, J., DURANY, R., CAMBRIA, R., ABIDA, W., CERCEK, A., FELDMAN, D. R., GOUNDER, M. M., HAKIMI, A. A., HARDING, J. J., IYER, G., JANIGIAN, Y. Y., JORDAN, E. J., KELLY, C. M., LOWERY, M. A., MORRIS, L. G. T., OMURO, A. M., RAJ, N., RAZAVI, P., SHOUSHARI, C. M., SHUKLA, N., SOUMERAI, T. E., VARGHESE, A. M., YAEGER, R., COLEMAN, J., BOCHNER, B., RIELY, G. J., SALTZ, L. B., SCHER, H. I., SABBATINI, P. J., ROBSON, M. E., KLIMSTRA, D. S., TAYLOR, B. S., BASELGA, J., SCHULTZ, N., HYMAN, D. M., ARCILA, M. E., SOLIT, D. B., LADANYI M., BERGER M. F. 2017. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med.* 23:703–713.
- ZHANG, J., LAI, W., LI, Q., YU, Y., JIN, J., GUO, W., ZHOU, X., LIU, X., WANG, Y. 2017. A novel oncolytic adenovirus targeting Wnt signaling

effectively inhibits cancer-stem like cell growth via metastasis, apoptosis and autophagy in HCC models. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;491(2):469-477.

ZHANG, Y., LAZARUS, J., STEELE, N. G., YAN, W., LEE, H. J., NWOSU, Z. C., HALBROOK, C. J., MENJÍVAR, R. E., KEMP, S. B., SIRIHORACHAI, V., VELEZ-DELGADO, A., DONAHUE, K., CARPENTER, E. S., BROWN, K. L., IRIZARRY-NEGRON, V., NEVISON, A. C., VINTA, A., ANDERSON, M. A., CRAWFORD, H. C., LYSSIOTIS, C. A., FRANKEL, T. L., BEDNAR, F., PASCADI, M. M. 2020. Regulatory T cell depletion alters the tumor microenvironment and accelerates pancreatic carcinogenesis. *Cancer Discov.* pii: CD-19-0958.

ZINGONI, A., FIONDA, C., BORRALLI, C., CIPOITELLI, M., SANTONI, A., SORIANI, A. 2017. Natural Killer Cell Response to Chemotherapy-Stressed Cancer Cells: Role in Tumor Immunosurveillance. *Front Immunol.* 8:1194.

ZITVOGEL, L., TERME, M., BORG, C., TRINCHIERI, G. 2006. Dendritic cell–NK cell cross-talk: regulation and physiopathology. *Curr Top Microbiol Immunol.* 298:157-74.

