

Derleme



Mikroorganizmaların Kanser Tedavisinde Kullanımı

Süleyman AYDIN,^{a,1} Hikmet GEÇKİL², Emrah ÇAYLAK¹, Nermin KILIÇ¹

¹Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, ELAZIĞ

²İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, MALATYA

ÖZET

Son on yılda biyokimya, moleküler biyoloji ve bakteriyolojideki ilerlemeler, bakterilerin antikanser ajan olarak kullanımının yanı sıra, antikanser ilaçların verilmesinde kemoterapiye duyarlı ajan ve gen tedavisi için vektör olarak kullanımına kadar kullanışlı bir çok yönlerini ortaya koymuştur.

Bu alanda özellikle *Escherichia coli* genleri ve enzimleri, kansere karşı vücut dışında etkisiz olan fakat vücut içinde oldukça aktif türlerine dönüşebilen ön-ilaç uygulamalarında yer almaktadır. Ayrıca *Pseudomonas* ekzotoksinlerine konjuge edilmiş IL-4, direkt olarak malignan beyin tümörlerine uygulanmış ve normal beyin hücreleri haricindeki hücrelerin IL-4 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlandığı görülmüş ve böylece normal beyin dokusuna zarar vermeden tümörün büyük bir kısmının tahrip edildiği saptanmıştır.

Bu derleme, bazı kanser tiplerinin tedavisi için kullanılan bakteriyel orijinli antikanser ajanlar üzerine odaklanmıştır.

©2004, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Anahtar kelimeler: Antikanser ajanlar, kemoterapi, gen tedavisi, ön-ilaçlar.

ABSTRACT

Use of Microorganisms in Cancer Therapy

In the last decade the progress in biochemistry, molecular biology, and bacteriology caused a great deal of attention to be paid for the use bacteria in cancer therapy. Some applications in this area are the use of bacteria as sensitising agents for chemotherapy, as vectors for gene therapy and as delivery agents for anticancer drugs.

In this field, especially *Escherichia coli* genes and enzymes have been the targets for pro-drug approaches to cancer therapy where inert pro-drugs can be converted to highly active species in vivo. Moreover, IL-4 fused with *Pseudomonas* exotoxin has been applied directly into malignant brain tumours and binds with high affinity to IL-4 receptors not present on normal brain cells an approach by which major part of the tumour is destroyed without harming the normal brain tissue.

This review is focused on the anticancer agents of microorganism origin that are used to treat some cancer types. ©2004, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Key words: Anticancer agents, chemotherapy, gene therapy, pro-drugs.

Bakterilerin organik maddelerin transformasyonundaki rolü 19'uncu yüzyılın ortalarına kadar anlaşılammıştır. Buna rağmen insanoğlu ilk çağlardan beri mikroorganizmaları gıda (peynir, ekmek, bira, şarap, sirke vs.) alanında kullanma gelmişlerdir. Son yıllarda biyokimya ve moleküler biyolojide ki gelişmeler mikroorganizmaların antikanser ajan olarak özellikle kanser tedavisinin omurgasını oluşturan kemoterapide kullanımını gündeme getirmiştir. Kanser gen tedavisinde onkolitik ajan olan virüslerin vektör olarak kullanımı çok iyi bilinmesine rağmen, bugüne kadar bakterilerin antikanser potansiyeli ile ilgili fazla araştırma yapılmamıştır. İlk kez 1978'de malignan beyin tümörleri için bakteriler onkolitik ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan bu çalışmada, hastalık oluşturmeyen *Clostridium butyricum* M55 sporlarının karotid artere enjeksiyonu yapılmıştır. Bu sporlar beyin tümörlerine ulaştıktan bir hafta sonra da onkolizis olduğu gözlenmiş ve cerrahi olarak çıkarılmıştır (1). Benzer olarak, bakteriyoloji ve moleküler biyolojideki gelişmeler, kanser tedavisinde bakteriyel uygulama alanlarını ve olanakları

genişletmiştir.

Antikanser ajan olarak mikroorganizmaların kullanım alanları şunlardır (Jain Pharma Biotech) :

1. Onkolitik ajan olarak patojenik bakterilerin kullanımı
2. Antikanser ilacı yapan ajanlar olarak bakterilerin kullanımı
3. Tümörün seçici olarak tahribi için bakteriyel toksinler ve genetik olarak modifiye edilmiş bakterilerin kullanımı
4. Kanser gen tedavisi için *Vibrio cholerae* ve *Yersinia enterocolitica*'nın bakteriyel vektör olarak kullanımı
5. Kemoterapide kansere duyarlı bakterilerin kullanılmalari
6. Bazı mikrobiyal orijinli enzimlerin kanser kemo terapisinde ilaç olarak kullanımı

Tedavi amacıyla genetik olarak değişikliğe uğratılmamış patojenik bakterilerin kullanımını arzulanan bir yöntem değildir. Bakterilerin pratik ve güvenli bir şekilde tedavide kullanımı için genetik işlem yapılabileceğine dair önemli bilgiler vardır.

^a Yazışma Adresi: Dr. Süleyman Aydın, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, 23119 ELAZIĞ

Tel: 0 424 237 00 00 / 2489

e-mail: saydin@firat.edu.tr, saydin1@hotmail.com

Bakteriyel toksinler de immün düzenleyici etki kadar tümör üzerine direkt etkili bir onkolitik ajan olarak kullanılabilirler. Bakterilerin genetik olarak modifikasyonu, bakteriyel genomların diziliminin belirlenmesi ile uygun hale gelebilir. Ayrıca genetik olarak modifiye edilmiş bakteriler antikanser ajana dönüşebilir ve kanser gen tedavisinin bir bölümünü oluşturabilirler. Genetik olarak modifiye edilmiş bakteriler, normal dokulara zarar vermeden seçici olarak tümörün tahribinde ilk ajan olarak da kullanılabilirler.

1. Bakterilerin Kanser Gen Tedavisindeki Rolü

Kanser gen tedavisinin önündeki ana engel, bir antikanser gen ürününün solid bir tümör için spesifikliğinin sağlanmasıdır (2). Bir vektörün ilk olarak direkt bir tümörle karşılaşmasında gen ekspresyonunun kontrolünü bozan ciddi stratejiler bulunmaktadır. Bu sebeple solid tümörleri spesifik olarak hedefleyen sistemik bir buluşma metodu sağlanamamıştır. Bu duruma karşı *E.coli* genleri ve enzimleri, kanser için en iyi bilinen ön ilaç uygulamalarının bir parçasını oluşturmaktadır (2, 3). Ön-ilaçlar, farmakodinamik ve toksikolojik olarak etkisiz olan fakat *in vivo* koşullarda oldukça aktif türlerine dönüşebilen kimyasallardır (2).

1.1. Sitozin Deaminaz Genleri

Bakteri ve mantarlarda bulunan bir enzim olan sitozin deaminaz (SD), sitozinin urasile deaminasyonunu katalizlemektedir. Ayrıca kanser tedavisinde sık kullanılan toksik antimetabolit olan 5-florourasin toksik olmayan analogu 5-florositozine dönüşümünde de deaminasyon sağlamaktadır. Ayrıca insan kolorektal karsinoma hücre kültürlerine SD genlerinin uygulanması, 5-florositozine duyarlılığı arttırmıştır. İnsan kolorektal hücre serilerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda bu teknik, *Herpes simplex* virüs timidin kinaz (HSV-tk) stratejisine göre daha üstün bulunmuştur (4,5).

1.2. *E.coli* Pürin Nükleosid Fosforilaz Geni

E.coli pürin nükleosid fosforilaz geni (PNP) kullanılarak kanserli hücrelerin tahribatı sağlanmaktadır. Bu olay toksik olmayan deoksiadenozinin, toksik olan adenin analoguna dönüşmesiyle gerçekleştirilmektedir (6).

1.3. Kanser Gen Tedavisinde Ön-İlaç Uygulamaları

Bakteriler ile ilgili ön-ilaçların içinde; bakteriyel sitozin deaminazla aktive edilen 5-florositozin ve bakteriyel nitroreduktaz ile aktive edilen CB1954 yer almaktadır. İntihar (suicide) gen tedavisi ilaca duyarlı bir genin hedef hücrelerle buluşturulmasıdır. Daha sonra normal hücreleri etkilemeyen dozlardaki ilaç, hedef hücreleri öldürmektedir (7, 8).

1.4. *E.coli gpt* Geni

Bu gen (*gpt*), bakteriyel bir enzim olan ve riboz fosfatı ksantin ve analoglarına transfer eden ksantin-guanin-fosforibozil transferazı kodlamaktadır. Bu genin rat glioma hücrelerini tahribi 6-tiyoksantin veya 6-tiyoguanin vasıtasıyla gerçekleşmektedir (8).

1.5. *E.coli* Nitroreduktaz B Geni

Nitroreduktaz B enzimini kodlayan genidir ve HSV-tk sisteminde CB1954 ön- ilacı olarak kullanılmaktadır (9). *E.coli* nitroreduktaz geni, *C. beijerinckii* zinciri içine sokularak, CB1954 toksik olmayan ön-ilacının toksik olan bir antikanser ilaca aktifleşmesi sağlanmaktadır (9).

2. Tip III Sekresyon Sistemleri

Çeşitli gram negatif patojenler, basit bir virulans mekanizması olan özel bir protein sekresyon sistemi kullanırlar. Buna Tip III sekresyon sistemi adı verilir ve proteinler ökaryotik hücrelerin sitozolüne enjekte (transloke) edilebilirler. Transloke edilen proteinler, konakçı hücrenin transdüksiyon ve diğer hücrel işlemlerini kullanarak bakteriyel patogenezi gerçekleştirirler (10). Tip III sekresyon sistemleri, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bordetella* türleri, *Pseudomonas aeruginosa* ve enteropatojenik *E.coli*'nin ökaryotik hücrenin yüzeyine tutunarak bakteriyel proteinlerini, hedef hücreyi tahrip etmesi için enjeksiyonuna izin verir (11, 12). *Pseudomonas aeruginosa* ekzoenzim S (ExoS), çift fonksiyonlu bir sitotoksindir. ExoS'in karboksi ucu, kültür hücrelerinde eksprese olabildiğinden sitotoksik etkisi olan ADP-riboziltransferaz zincirinden oluşur. Patojenik potansiyeli olan bakterilerde Tip III sekresyon sisteminin varlığı, kanser tedavisinde kullanılabilecek normal floradan yayılan terapötik ajanların geliştirilmesi için bir hedef sağlayabilir (13). Tip III sekresyon sistemi aynı zamanda terapötik ajan olarak heterolog proteinlerin yapılması için de kullanılabilir (14).

3. Protein İfadesi Güçlendirilmiş Tümör Tedavisi (PIGTT)

PIGTT, solid tümörleri tercih eden antikanser ilaçların oluşturulması için genetik olarak modifiye edilmiş bir bakteriyel vektör veya vektor olarak *Salmonella* bakterisini kullanan bir yöntemdir. Bu çeşit biyomühendislik ürünü bakteriler, normal dokulara kıyasla tümörlerde daha fazla miktarda replikasyon gösterirler ve prelinik toksikolojik çalışmalarda da yüksek güvenilirlik profili sergilerler (15). Tümöre karşı adeta ilaç fabrikası haline getirilen PIGTT, daha konsantre, etkili ve normal dokular için daha az toksik bir kanser tedavisi haline dönüştürülür. A faz I klinik denemeleri, Ulusal Kanser Enstitüsü'nde (Bethesda, Maryland, ABD), en uygun tedaviye rağmen ilerlemiş kanser hastalarının damar içi PIGTT enjeksiyonunu tolere edilebilirliğini ve güvenilirliğini belirlemek için gerçekleştirilmektedir. Solid tümörler içinde PIGTT organizmalarının miktarındaki artış, mikroorganizmaların tümörlerde bulunan protein ve DNA elemanlarıyla beslenmesinden kaynaklanmaktadır. Bu, bakterilerin tümör büyümesini inhibe etmesini arttırmakta ve tümör hücrelerinde kendi başına devamlı antikanser ilaçları üretmelerine izin vermektedir. PIGTT bakterileri, damar içi olarak uygulanabilmekte ve farklı bir bölgeden inokülasyon sonrası metastazik tümörlerde yüksek konsantrasyonlara erişebilmektedirler (15).

4. Bakteriyel Toksinler

4.1. *Escherichia coli* toksinleri

Escherichia coli, Shiga toksin (Stx) ailesinden olan bakteriyofajlar tarafından kodlanan Stx1 (VT1) veya Shiga benzeri toksin: (SLT1) ve Stx2 (VT2,SLT2) adlı iki tipi içermektedir. Bazı kötü huylu kanser hücrelerinin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanan ve onların protein sentezini engelleyerek öldüren VT1, antikanser etkisi için çalışılmıştır. Fındık farelerinde nakille geliştirilmiş insan astrositom tümörü verotoksin ile tedavi edilmiştir (16). Verotoksin, bir vazotoksin olarak da bilinmektedir (17).

Otolog-kök hücre nakillerinin başarı ile gerçekleştirildiği CD77 + B hücre lenfoma vakalarında otolog kemik iliği naklinden önce insan kemik iliğinin arındırılması için VT1 kullanılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları (18), VT1'in vücut

dışında kullanımının myeloma, lenfoma ve meme kanseri otolog hücre greftlerinden VT1 reseptörü ekspres eden habis hücrelerin temizlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (19). Lenfoproliferatif hastalıklı doku nakli sonrası hastalardan alınan infiltre olmuş lenfoma hücrelerinde VT1'i tespit eden seçici boyama yardımıyla da CD77'nin bu hücrelerin yeni bir belirleyicisi olduğu gösterilmiştir (20). Bu gibi bireyler için VT1, habis durumların kontrolünde başvurulacak bir ajandır. VT1, N veya C ucunda influenza virüsüne ait matris proteini kaynaklı MHC (major histokompatibilite kompleksi) sınıf 1 molekülü olan bir peptit taşıyacak şekilde genetik mühendisliği tarafından dizayn edilmiştir (21).

4.2. İmmunotoksinler

Tümör hücrelerini hedefleyen ve kanser gen tedavisinde kullanılan bakteriyel orijinli immunotoksinler, *Pseudomonas* ekzotoksini ve difteri toksinidir (22).

4.3. Transferrin-CRM 107

İnsana ait transferrin (TS) ile difteri toksininin genetik bir mutantının konjugatıdır. Kan beyin bariyerine karşı interstisyel infüzyon ile glioblastomanın tedavisi için kullanılmaktadır (23).

4.4. IL-4 Toksin Bileşiği

İlaç ismi NBI-3001 olan IL-4 toksin bileşiği (Neurocrine Biosciences, San Diego, ABD), IL-4 ile *Pseudomonas* ekzotoksininin birleştirilmesi ile elde edilmiştir. İlaç, bir kateter yardımıyla tümöre uygulanmaktadır ve IL-4 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanarak normal beyin hücrelerine zarar vermeden habis beyin tümörlerini yok etmektedir (24).

4.5. *Pseudomonas* Ekzotoksinleri İçeren Bileşik Toksinler

İlk *Pseudomonas* ekzotoksinleri (PE) içeren bileşik toksin, transforme edilmiş büyüme faktörü (TGF) ile PE40 arasında gerçekleştirilmiştir (24). İdrar kesesi karsinomunda mesane içi tedavisi için klinik uygulamalara girmiştir (25). IL-2 reseptörleri taşıyan hedef hücrelerin bulunduğu kanla ilgili tümörlerin hedeflenmesi için PE40 ile IL-2 birleştirilerek yetişkin T hücre lösemisinin tedavisinde terapötik bir ajan olarak kullanılmıştır (26,27).

5. Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Bakteriler

Bakteri genetik mühendisliği, proteinlerin rekombinant olarak üretilmesi üzerine kurulmuştur. Bakteriyel genomlar hakkındaki bilgi, genlerin silinmesi ve eklenmesiyle bakterilerin özelliklerinin değiştirilmesini mümkün kılmaktadır.

5.1. Bakteriyel Genomlar

Şu ana kadar yaklaşık 100 mikroorganizmanın genomu çalışılmıştır. Yeni tedavilerin geliştirilmesi ile ilişkili olarak genomik dizilimi tamamen bilinen bakteriler ise şunlardır: *Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium tetani*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia prozawekii*, *Salmonella typhimurium*, *Treponema pallidum*.

Bakteriyel genomun bilinmesi daha çok kansere yönelik ilaçların geliştirilmesinde yararlı olup aynı zamanda terapötik amaçlar için bakterilerin manipülasyonunu da mümkün kılmaktadır (28).

5.2. Tümöre Hedeflenen Bakteriler

Gen tedavisindeki uygulamaların çoğu lipozomlar gibi viral veya viral olmayan vektörlere sahiptir. Bakterilerden özellikle *Salmonella*, antikanser vektörü olarak birçok potansiyel avantaja sahiptir:

1. *Salmonella*, anaerobik ya da aerobik koşullar altında üretilir.
2. Farklı bir inokulasyon bölgesinden birçok tümör hedeflenebilir.
3. *Salmonella*, *Herpes simplex* virüsü timidin kinazı (HSV-tk) gibi intihar genlerini eksprese etme yeteneğindedir.

Yabani tip *Salmonella* tümör tedavisi için kullanıldığında tümör dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaştığı zaman hayvanların ölümüne sebep olmaktadır. Fakat atenüe edilmiş hiperinvazif mutant *Salmonella* türlerinin ise, tümör hedeflerini tahrip ederken sınırlı miktarda da patojenite gösterdiği rapor edilmiştir. HSV-tk geni içeren bir plazmid *Salmonella*'ya aktarılmış ve ganciclovir ile birlikte melanom taşıyan hayvanlara uygulandığında doza bağımlı olarak tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (28). Tümöre-hedefli *Salmonella*'nın msbB geninin çıkarılması ile genetik modifikasyonu, lipit A'yı değiştirmiş ve TNF indüksiyonunu azaltarak güvenliği arttırmıştır. Tümöre spesifik bakteriyel vektörlerin lipit modifikasyonu, septik şoku anlamlı bir şekilde azaltmış ve bakterilerin antitümör aktivitesinin TNF'den bağımsız olduğu ileri sürülmüştür. Genetik mühendisliği ürünü *Salmonella*, solid tümörleri seçici hedef olarak algılamıştır. Lipit A mutant-*Salmonella*'nın antitümör etkisi, tek başına ve röntgen ışınları eşliğinde B16F10 ya da Cloudman S91 melanomu taşıyan farelerde gösterilmiştir (29). Her bir tedavi tek başına tümör büyümesini yavaşlatmış ve yaşam süresini uzatmıştır. Tek dozlu *Salmonella* ile yükseltelen radyasyonla doza bağımlı çalışmalarda iki ajan hesaplanan aditif etkiden daha fazla tümör büyümesini geriletmiştir. Sonuçlar genetik mühendisliği ürünü *Salmonella* ile radyoterapinin birlikte melanom, akciğer, kalın barsak, meme, böbrek ve karaciğerin solid tümörleri için yeni ve yararlı bir tedavi olduğunu göstermiştir (30).

6. Bazı mikrobiyal orijinli enzimlerin kanser kemoterapisinde ilaç olarak kullanımı

Bu çeşit uygulamada en yaygın kullanılan enzimden, bazı gram-negatif bakterilerden elde edilen L-asparaginazdır (31). L-asparaginaz enzimi çeşitli kanser (çocuk lösemisi başta olmak üzere, lemfosarkoma, melanosarkoma, non-Hodkin, vb.) türlerindeki yüksek terapötik değeri ile bilinmektedir (32). Geni insanlarda bulunmayan bu enzimin anti-lösemik etkisi sirkülasyonda bulunan L-asparagin amino asidini hızlı bir şekilde yıkmaya dayanmaktadır. Enzim, asparagini aspartat ve amonyağa çevirerek kanserli hücrelerin büyümek ve bölünmek için ihtiyaç duydukları essansiyel amino asitten yoksun bırakmaktadır. Normal hücreler için L-asparagin essansiyel bir amino asit olmadığından bu hücreler, böyle bir enzim muamelesinden etkilenmezler. Çünkü nedeni, normal hücreler kendi asparagin amino asidini aktif şekilde üreten asparagin sentetaz enzimine sahipken, kanserli hücrelerde bu enzim ya bulunmaz ya da normal hücrelerdeki seviyede sentezlenmemektedir. Dolayısı ile kanserli hücrelerde, sağlıklı

hücrelerin tersine yeterince L-asparagin sentezi yapılamamaktadır. Bu nedenle, kanserli hücreler dışardan alınan veya sağlıklı hücreler tarafından yapılarak kana verilen L-asparagine bağımlıdır. Dolaşımında serbest olarak bulunan bu amino asitin, enjekte edilen L-asparaginazla yıkılması sonucu neoplastik hücrelerde protein sentezi bloke edilmiştir. Böylece, hücre büyümesi durmakta ve aynı zamanda DNA replikasyonu gerçekleşmemektedir. Bu uygulama sonunda hücrelerin belli bir süre sonra normal apoptosis ile ortadan kalktıkları saptanmıştır (33). Enzim tedavisi görmüş lösemili çocuklarda, kanserli hücrelerinin zamanla ortadan kalktığı saptanırken, çeşitli kanser tümörlerinin ise büzüşerek

kayboldukları rapor edilmiştir (34). Bu çeşit bir uygulamada kullanılan diğer bir enzim çeşidi ise L-lizin oksidazdır (35).

SONUÇ

Moleküler biyoloji, bakteriyoloji ve biyokimya alanındaki gelişmeler, mikroorganizmaların antikanser ajan olarak keşfini ve böylece kanser gen tedavisinde kullanımını gündeme getirmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda kanser tedavisinde mikroorganizmaların genlerinden yararlanılabileceği de ortaya konulmuştur. Fakat kanser vakalarında amaçlanan tedavinin anlamlı olması için tümörlerin % 100 ortadan kalkmasının gerekliliği sınırlamasını da beraberinde getirmektedir.

KAYNAKLAR

1. Heppner F, Mose JR. The liquefaction (oncolysis) of malignant gliomas by a non pathogenic Clostridium. Acta Neurochir 1978; 42: 123-125.
2. Cao Y, Hamada T, Matsui T, Date T, Iwabuchi K. Hepatitis C virus core protein interacts with p53-binding protein, 53BP2/Bbp/ASPP2, and inhibits p53-mediated apoptosis. Biochem Biophys Res Commun. 2004;315:788-795.
3. Trochon-Joseph V, Martel-Renoir D, Mir LM ve ark. Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. Cancer Res 2004; 64:2062-2069.
4. Trinh QT, Austin EA, Murray DM, Knick VC, Huber BE. Enzyme/prodrug gene therapy: comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. Cancer Res. 1995; 55: 4808-4812.
5. Rogulski KR, Kim JH, Kim SH, Freytag SO. Glioma cells transduced with an *Escherichia coli* CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. Hum Gene Ther 1997; 8: 73-85.
6. Parker WB, King SA, Allan PW, et al. In vivo gene therapy of cancer with *E. coli* purine nucleoside phosphorylase. Hum Gene Ther 1997; 8: 1637-1644.
7. Kerr DJ, Young LS, Searle PF, McNeish IA. Gene directed enzyme prodrug therapy for cancer. Adv Drug Deliv Rev 1997; 26: 173-184.
8. Tamiya T, Ono Y, Wei MX, Mroz PJ, Moolten FL, Chiocca EA. *Escherichia coli gpt* gene sensitizes rat glioma cells to killing by 6-thioxanthine or 6-thioguanine. Cancer Gene Ther 1996; 3: 155-162.
9. Lemmon MJ, Van Zijl P, Fox ME, Mauchline ML, Giaccia AJ, Minton NP, Brown JM. Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. Gene Ther 1997; 4: 791-796.
10. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 379-433.
11. Bleves S, Cornelis GR. How to survive in the host: the Yersinia lesson. Microbes Infect 2000; 2: 1451-1460.
12. Garipey J. The use of Shiga-like toxin I in cancer therapy. Crit Rev Oncol Hematol. 2001;39:99-106
13. Galan JE, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science 1999; 284: 1322-1328.
14. Boyd AP, Grosdent N, Totemeyer S, ve ark. Yersinia enterocolitica can deliver Yop proteins into a wide range of cell types: development of a delivery system for heterologous proteins. Eur J Cell Biol 2000; 79: 659-671.
- 15.
16. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector. Cancer Res 1997; 57: 4537-4544.
17. Arab S, Rutka J, Lingwood C. Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. Oncol Res 1999; 11: 33-39.
18. Lingwood CA. Verotoxin/globotriol ceramide recognition: angiopathy, angiogenesis and antineoplasia. Biosci Rep 1999; 19: 345-354.
19. LaCasse EC, Saleh MT, Patterson B, Minden MD, Garipey J. Shiga-like toxin purges human lymphoma from bone marrow of severe combined immunodeficient mice. Blood. 1996; 88: 1561-1567.
20. LaCasse EC, Bray MR, Patterson B, et al. Shiga-like toxin-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34 (+) hematopoietic stem cells: implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. Blood. 1999; 94: 2901-2910.
21. Arbus GS, Grisaru S, Segal O. Verotoxin targets lymphoma infiltrates of patients with post-transplant lymphoproliferative disease. Leuk Res 2000; 24: 857-864.
22. Noakes KL, Teisserenc HT, Lord JM, Dunbar PR, Cerundolo V, Roberts LM. Exploiting retrograde transport of Shiga-like toxin I for the delivery of exogenous antigens into the MHC class I presentation pathway. FEBS Lett 1999; 453: 95-99.
23. Pastan I, Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev 1998; 31: 53-88.
24. Laske DW, Youle RJ, Oldfield EH. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin TF-CRM107 in patients with malignant brain tumors. Nat Med 1997; 3: 1362-1368.
25. Puri RK. Development of a recombinant interleukin-4-Pseudomonas exotoxin for therapy of glioblastoma. Toxicol Pathol 1999; 27: 53-57.
26. Goldberg MR, Heimbrook DC, Russo P, et al. Phase I clinical study of the recombinant oncotxin TP40 in superficial bladder cancer. Clin Cancer Res 1995; 1: 57-61.
27. Zhang M, Zhao X, Li H, Lu S. Cloning and expression of the gene coding for IL-2 (60)-PE40, a molecular targeted protein. Chin Med Sci J 1995; 10: 136-140.
28. Kreitman RJ, Pastan I Targeted toxin hybrid therapy. In: Novel therapeutics from modern biotechnology. Oxender DL, Post I.E., Springer, 1999.
29. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted Salmonella. Highly selective delivery vectors. Adv Exp Med Biol 2000; 465: 57-63.

30. Low KB, Ittensohn M, Le T, et al. Lipid A mutant Salmonella with suppressed virulence and TNF alpha induction retain tumor-targeting in vivo. Nat Biotechnol 1999; 17: 37-41.
31. Platt J, Sodi S, Kelley M, Rockwell S, Bermudes D, Low KB, Pawelek J. Antitumour effects of genetically engineered Salmonella in combination with radiation. Eur J Cancer 2000; 36: 2397-2402.
32. Geckil H, Gencer S. Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake. Appl Microbiol Biot 2004; 63:691-697.
33. Ettinger LJ, Ettinger AG, Avramis VI, Gaynon PS. Acute lymphoblastic leukaemia: a guide to asparaginase and pegaspargase therapy. BioDrugs 1997; 7:30-39.
34. Stecher AL, de Deus PM, Polikarpov I, Abrahão-Neto J. Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. Pharm Acta Helv 1999; 74:1-9.
35. Müller HJ, Boos J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. Crit Rev Oncol Hemat 1998; 28:97-113.
36. Kusakabe H, Kodama K, Kuninaka A, and Yoshino H. A new antitumor enzyme, L-lysine α -oxidase from *Trichoderma viride*. J Biol Chem 1980; 255:976-981.

Kabul Tarihi: 28.05.2004