

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER TEDAVİSİ İÇİN REKOMBİNANT
PROTEİN TEMELLİ ADAY İLAÇLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

AYBİKE ERDOĞAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2014970188

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER TEDAVİSİ İÇİN REKOMBİNANT
PROTEİN TEMELLİ ADAY İLAÇLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

AYBİKE ERDOĞAN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
YÜKSEK LİSANS

İZMİR-2017

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2014970188

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Aybike ERDOĞAN “Kanser Tedavisi İçin Rekombinant Protein Temelli Aday İlaçların Geliştirilmesi” konulu Yüksek Lisans tezini 30 Ocak 2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



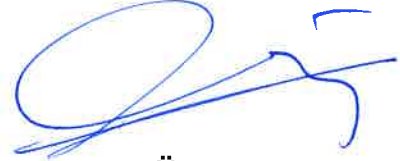
BAŞKAN

Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı



ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Özden YALÇIN ÖZUYSAL
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı



ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Şerif ŞENTÜRK
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Devrim PESEN OKVUR
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Gökhan KARAKÜLAH
Dokuz Eylül Üniversitesi
İzmir Uluslararası Biyotıp ve
Genom Enstitüsü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Kanser Tedavisinde Monoklonal Antikorlar.....	7
2.2 Meme Kanseri.....	12
2.3 Meme Kanserinde Monoklonal Antikorlar.....	16
2.3.1 Trastuzumab (Herceptin).....	16
2.3.1.1 Trastuzumab ikili tedaviler.....	17
2.3.2 Pertuzumab (Perjeta).....	18
2.3.3 Trastuzumab-Emtansine (Kadcycla).....	19
2.4 Meme Kanserinde Alternatif ve Var Olan Tedavilerin İncelenmesi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1 Araştırmanın Tipi.....	23
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	23
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları.....	23
3.4 Çalışma Materyali.....	23
3.5 Araştırmanın Değişenleri.....	23
3.6 Veri Toplama Araçları.....	24
3.6.1 Malzeme ve cihazlar.....	24
3.6.2 Besi yeri ve solüsyonlar.....	27
3.6.2.1 Hücre kültürü.....	27
3.6.2.2 İmmünofloresan.....	27
3.6.2.3 RNA izolasyonu ve jel görüntüleme.....	28
3.6.2.4 Agaroz jel.....	28
3.6.3 Yöntemler.....	29
3.6.3.1 Hücre kültürü.....	29

3.6.3.1.1 Hücrelerin açılması.....	29
3.6.3.1.2 Hücrelerin pasajlanması.....	30
3.6.3.1.2.1 Yapışkan (Adheziv) hücrelerin pasajlanması.....	30
3.6.3.1.2.2 Süspansiyon hücrelerin pasajlanması.....	30
3.6.3.1.3 Hücrelerin dondurulması.....	31
3.6.3.1.4 Hücre sayımı.....	31
3.6.3.1.5 Hibridoma hücrelerinden pelet ve antikor eldesi.....	32
3.6.3.2 İmmüno Floresan.....	32
3.6.3.3 RNA izolasyonu.....	34
3.6.3.3.1 Macherey-Nagel nucleospin RNA kiti ile izolasyon.....	34
3.6.3.3.2 Manual RNA izolasyonu.....	34
3.6.3.4 RNA miktarının ölçülmesi.....	35
3.6.3.5 Formaldehit agaroz jel ile RNA'nın görüntülenmesi.....	35
3.6.3.6 Revers Transkriptaz (RT) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	36
3.6.3.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	36
3.6.3.8 Agaroz Jel ile DNA'nın görüntülenmesi.....	38
3.6.3.9 Sekanslama/Analiz.....	39
3.7 Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	39
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi.....	40
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları.....	40
3.10 Etik Kurul Onayı.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1 HER2 Amplifikasyonu Olan Meme Kanseri Hücre Hattında Antikorların Reaktifliğinin Tayini.....	42
4.2 BH Hibridoma Klonlarından İzole Edilen RNA'ların Kararlılığına ve Bütünlüğüne Bakılması.....	45
4.3 İmmüno globulin Değişken Bölgelerinin Çoğaltılması.....	45
4.4 Ağır ve Hafif Zincir Değişken Bölgelerin Sekanslanması.....	47
4.5 İnsan İmmüno globulin İfade Vektörü Ön Tasarımı.....	51
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
7. KAYNAKLAR.....	62
8. EKLER.....	67

8.1 Kurum Onayı.....	67
8.2 Etik Kurul Raporu.....	68
8.3 Özgeçmiş.....	70



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No.
Tablo 1. Kanser tedavisinde kullanılan bazı monoklonal antikorlar ve onların özellikleri.....	10
Tablo 1. HER2 karşıtı klinik araştırmada olan örnek tedaviler.....	20
Tablo 3. Araştırmada kullanılan kimyasal, reaktif ve kitlerin listesi.....	24
Tablo 4. Araştırmada kullanılan ekipmanların listesi.....	26
Tablo 5. PCR için kullanılan malzeme miktarları ve optimum çalışma koşulları.....	37
Tablo 6. RT-PCR ve PCR'da kullanılan spesifik primerler.....	37
Tablo 7. Hibridoma klonlarının pozitif bant verdiği ağır ve hafif zincir primerler.....	46



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No.
Şekil 1. Monoklonal antikor çeşitleri ve yapısal elementleri.....	8
Şekil 2. HER2 sinyal iletimi.....	14
Şekil 3. Hücre sayımında mikroskop altında hemositometride gözükten alanlar.....	32
Şekil 4. Antikorların HER2'nin fazla ifade edildiği SK-BR-3 hücre hattında hedefe bağlanması.....	44
Şekil 5. Antikorların HER2 pozitif MCF-7 hücre hattında hedefe bağlanması.....	44
Şekil 6. RNA'nın %1.2 agaroz-formaldehit jel ile görüntülenmesi.....	45
Şekil 7. Hibridoma klonlarında immünoglobulin ağır zincir değişken bölgelerinin PCR ile amplifikasyon %1.2 agaroz jel görüntüsü.....	47
Şekil 8. Hibridoma klonlarında immünoglobulin hafif zincir değişken bölgelerinin PCR ile amplifikasyon %1.2 agaroz jel görüntüsü.....	47
Şekil 9. HER2 özgün antikorların ağır zincir değişken bölgelerinin amino asit dizisi.....	49
Şekil 10. HER2 özgün antikorların hafif zincir değişken bölgelerinin amino asit dizisi.....	50
Şekil 11. İnsan immunoglobulin gamma 1 ağır ve kappa hafif zincirleri (IgG1/ κ) birlikte ifade edebilen memeli ifade vektörü.....	52

KISALTMALAR

AI: Aromataz inhibitörü

ADCC: Antikor bağımlı hücre aracılıklı sitotoksinite (antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity)

Akt: Protein kinaz B (protein kinase 3)

CD: Farklılaşma kümesi (cluster of differentiation)

CDC: Komplement bağımlı sitotoksinite (complement-dependent cytotoxicity)

CDR: Komplementer belirleyici bölge (complementarity determining region)

CH: Antikorum ağır zincir değişmez bölgesi (antibody heavy chain constant region)

CL: Antikorum hafif zincir değişmez bölgesi (antibody light chain constant region)

CTLA: Sitotoksik T lenfosit antijen (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen)

D: Docetaxel

EGF: Epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor)

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (epidermal growth factor receptor)

ER: Östrojen reseptörü (estrogen receptor)

HER: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (human epidermal growth factor receptor)

HT: Hormon tedavisi

IF: İmmünfloresans deneyi

IgG: İmmünoglobulin G ağır zincir

IGF-1R: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (insulin-like growth factor-1 receptor)

IMGT: İmmünojenetik biyoinformatik aracı (Immunogenetics bioinformatic tool)

Fab: İmmünoglobulin antijen bağlanma bölgesi

Fc: İmmünoglobulin değişmez bölge

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Agency)

κ: Kappa hafif zincir

KT: Kemoterapi

L: Lapatinib

mAb: Monoklonal antikor (monoclonal antibody)

MAPK: Mitojen aktifleşmiş protein kinaz (mitogen activated protein kinase)

OS: Tedaviye başlanıldığından hastanın sağ kaldığı toplam süreyi (overall survival)

P: Pertuzumab

Pac: Paclitaxel

PD: Programlanmış ölüm reseptörü (programmed death receptor)

PFS: Hastalığın ilerlemediği sağ kalım (progression free survival)

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinaz

PR: Progesteron reseptörü (progesterone receptor)

RANKL: Reseptör aktivatör nükleer kappa-B ligandı (receptor activator of nuclearfactor kappa-B ligand)

T: Trastuzumab

TAM: Tamoxifen

T-DM1: Trastuzumab Emtansine monoklonal antikor- ilaç birleşimi

TGF- α : Değişiklik yapan alfa büyüme faktörü (transforming growth factor- α),

X: Capecitabine

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor)

VH: Antikorum ağır zincir değişken bölgesi (antibody heavy chain variable region)

VL: Antikorum hafif zincir değişken bölgesi (antibody light chain variable region)

TEŞEKKÜR

Tavsiyeleri ile bilimsel düşünme yetimi geliştiren ve akademik hayatımı şekillendirmede bana önemli desteklerini sağlayan Prof. Dr. Mehmet Öztürk'e en içten minnetlerimi sunarım. Eğitici yol göstermeleri ve anne şevkati ile beni destekleyen Elife Öztürk'e en derin sevgi ve teşekkürlerimi iletirim.

İlk günden itibaren paylaştıkları deneyimleri ve sağladıkları desteklerin yanı sıra, Öztürk grubuna keyifle gelmemde ve eğlenerek deney yapmamda büyük katkı sağlayan, uyum içinde çalıştığımız her gün için Dr. Evin İşcan, Uzm. Umur Keleş, Umut Ekin, Tuğçe Batur, Dr. Özden Öz, Dr. İdil Karaca Açı ve Doç. Dr. Çiğdem Özen'e en özel teşekkürlerimi sunarım. Devam ettirdiğimiz araştırmamızın, önceki çalışmalarını gerçekleştiren Dr. Ceyhan Ceran'a katkıları için teşekkür ederim.

iBG-izmir'de gerçekleştirdiğim deneylerde bu ailenin parçası olarak bana yardımcı olan, uygun araştırma ortamını sağlayan tüm akademik, destek ve hizmet personeline teşekkür ederim. Tezimin deney aşamasında, bilimsel katkıları için Yrd. Doç. Dr. Şerif Şentürk'e ayrıca teşekkür ederim. Bu çatı altında kapılarını gönül rahatlığı ile çalabildiğim bilimsel ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim Atabey, Erdal ve Özhan gruplarının tüm üyelerine içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatımın ilk gününden itibaren gerek akademik gerekse kişisel hayatımın iyi ve kötü günlerinde yanımda olan Ezgi Bağırşakçı, İsmail Küçükaylak, Betül Haykır, İlkin Aygün, İrem Artun ve aramıza sonradan katılan Dehan Çömez, Hamdullah Yanık ve Gülsün Bağcı'ya özellikle teşekkür ederim.

Tüm bu destek ve teşekkürlerin üzerinde, Erdoğan, Kalender ve Elçi ailelerinin her bir üyesine her zaman yanımda oldukları için en derin teşekkürlerimi sunarım. Fakat hayatımın iki önemli ve güçlü kadını annem Neriman Erdoğan ve ablam Aybala Erdoğan Elçi'ye fedakar destekleri, sabırları ve bitmeyen koşulsuz sevgileri için ömrümün sonuna kadar minnet borçlu olacağımdan buraya yazabileceğim yeterli teşekkürüm yoktur. Bu sebeple bu çalışmayı ikisine ve maneviyatını hep hissettiğim babama adıyorum.

KANSER TEDAVİSİ İÇİN REKOMBİNANT PROTEİN TEMELLİ ADAY İLAÇLARIN GELİŞTİRİLMESİ

**Aybike Erdoğan, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim
Dalı, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Balçova 35340 İzmir/Türkiye**

ÖZET

Biyoterapötik ilaçların kanser tedavisinde en çok ilgi gören alanı hedefe özgünlükleri nedeniyle monoklonal antikordur (mAb). Projemizin amacı, meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek mAb-temelli ilaç adayları geliştirmektir. Meme kanseri, dünya çapında yaygın görülmesi ve gelişmekte olan ülkelerde kadınların ölüm nedenlerinde ikinci sırada yer alması sebebiyle önemlidir.

Meme kanserinde %20-25 *HER2* geninin aşırı ifadesi görülmektedir. Bu gen, *HER2* (*ErbB2*) tirozin kinaz reseptörünü kodlar. *HER/ErbB* ailesine ait diğer reseptörler gibi homodimerizasyon veya heterodimerizasyon ile aktive olur. Aktif hale gelen protein kinazlar ilgili sinyal iletiminin aşağı basamaklarında yer alan aracı molekülleri uyararak zincir reaksiyonları başlatırlar. Böylece, proliferasyon, sağ kalım, hücre farklılaşması, anjiyogenez ve apoptoz engellenmesi gibi sonuçlar doğuran farklı sinyal yolları etkinleşir. Çoğalmasa kontrol edilemeyen hücreler zamanla tümör hücreleri haline gelir.

HER2 hedefli meme kanseri tedavisine alternatif olması amacıyla var olan monoklonal antikordur farklı bir *HER2* hücre dışı bölgesi tanıyan beş özgün antikor üreten fare hibridoma klonları grubumuz tarafından önceden geliştirilmiştir. Bu araştırmada üretilen monoklonal antikordur hedefi özgün olarak tanımda rol oynayan amino asit dizilimleri (CDR) belirlenerek, antikorun insanlaştırılması için ilk adımların atılması hedeflenmiştir.

Hibridoma klonlarından dördünün *HER2*'yi özgün olarak tanıdıkları immünofloresans deneyi ile gösterilmiştir. Bu hücrelerden RNA izole edildikten sonra immüoglobulin ağır ve hafif zincirlerinin değişken bölgeleri RT-PCR ve PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Sanger sekanslaması yöntemiyle elde edilen DNA dizilimlerinin dönüştürülmesi sonucunda ağır ve hafif zincir değişken bölge amino asit dizilimleri dört farklı antikor için elde edilmiştir. Bir klonda sadece füzyon partneri olan myeloma hücresinden gelen endojen hafif zincir yapısına rastlanmıştır. Hedefi özgün olarak

tanıdığı bilinen bir antikor için ise hafif zincir dizilimi açığa çıkarılamamıştır. Hedefi HER2 hala özgün olarak tanıdığı gösterilen iki monoklonal antikorun antijeni tanınmasında rol oynayan CDR alanları bulunmuştur. Geliştirilen fare antikorları ile aynı izotipe sahip IgG1/kappa insan immünoglobulini ifade eden vektörün modifiye edilecek yerleri belirlenmiştir. Modifikasyon sonrası vektör, fare tarafından üretilen antikorlar ile aynı CDR dizilimlerine sahip olacaktır. Böylece memeli hücrelerinde ifade edilebilecek HER2'yi hedef alan insanlaştırılmış antikor için moleküler temeller atılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Monoklonal antikor, immünoglobulin, HER2, meme kanseri

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT PROTEIN BASED DRUG CANDIDATES FOR CANCER THERAPY

**Aybike Erdoğan, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim
Dalı, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi Balçova 35340 İzmir/Türkiye**

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (mAbs) are the most demanded field of biotherapeutic drugs in cancer therapies because of their specificity to target. Aim of our project is to develop mAb-based drug candidates for the treatment of breast cancer. Breast cancer is significant since it is commonly observed worldwide and it takes second place in the causes of women death in developing countries.

About 20-25% of breast cancer, *HER2* gene overexpression was observed. This gene encodes HER2 (ErbB2) tyrosine kinase receptor. It is activated by homodimerization or heterodimerization like other receptors in the HER/ErbB family. Activated tyrosine kinases initialize signaling cascade by inducing downstream intermediary elements involved in signal transduction. Hence, multiple signaling pathways leading proliferation, survival, cell differentiation, angiogenesis and prevention of apoptosis were triggered. Uncontrolled growth of cells eventually results in tumor formation.

In order to be an alternative to HER2-targeted breast cancer treatment, mouse hybridoma clones producing five specific antibodies recognizing a different HER2 extracellular domain from existing mAbs have been previously developed by our group. The aim of this study was to identify the amino acid sequences (CDR) that specifically recognize the target of monoclonal antibodies and to take the first steps towards humanization of monoclonal antibody.

Four of hybridoma clones, specifically identify HER2, were shown by immunofluorescence. After isolation of RNA from these cells, immunoglobulin heavy and light chain variable regions were amplified through RT-PCR and PCR. Amino acid sequences of heavy and light chain variable regions were acquired for four different antibodies in the result of translation of DNA sequence obtained by Sanger sequencing. Only endogen light chain molecule belongs to fusion partner, myeloma cells was encountered for one clone. A clear light chain sequence result could not be

exposed for one antibody which was known to specifically recognize the target. Complementarity determining regions (CDRs) which play a role in the antigen recognition were found for two monoclonal antibodies specific to HER2. The modified regions of IgG1 / kappa human immunoglobulin expression vector having the same isotype as the murine antibodies developed were identified. After modification, the vector will have the same CDR sequences with the antibodies produced by the mouse. Thus, the molecular basis for the humanized HER2 targeted antibody that can be expressed in mammalian cells has been established.

Key Words: Monoclonal antibody, immunoglobulin, HER2, breast cancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Temel bilimlerde 1980'lere kadar ilerlenen yol, 1982'de ilk rekombinant protein insülinin üretimi ve bu dönemden itibaren biyoteknolojik gelişmelerin hız kazanmasıyla kesişince rekombinant protein temelli biyoterapötik ilaç üretimi, bilim dünyasına talep edilen yeni bir alan haline gelmiştir. İnsan büyüme hormonları, interferonların yanı sıra monoklonal antikorlar, en çok araştırılan rekombinant proteinler olmuştur ¹. Kanser tedavisinde, bu zamana kadar cerrahi müdahaleyi takiben sitotoksik kimyasal bileşiklerin veya radyasyon terapisinin uygulanıyor olması, monoklonal antikorların kanser karşıtı ilaç olarak hedeflenmesini kaçınılmaz hale getirmiştir ². Kalın bağırsak kanseri, akciğer kanseri, meme kanseri, baş/boyun kanseri ve kan kanseri FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, Food and Drug Agency) onaylı monoklonal antikor geliştirilen başlıca kanser türleri olmuştur ³. Trastuzumab, Panitumumab, Alemtuzumab, Ofatumumab gibi monoklonal antikorlar meme, kalın bağırsak ve kan kanseri için geliştirilen onaylanmış bu tedavilere örnektir ⁴.

Kadınlarda meme kanseri, dünya çapında en yaygın görülen kanser olmasıyla birlikte gelişmekte olan ülkelerde kadınların ölüm nedenlerinde ikinci sıradadır. Meme kanserinde %20-25 *ErbB2* (HER2, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2) geninin fazlaca ekspresyonu görülmektedir ^{5,6}. HER2, tirozin kinaz reseptörüdür. ErbB/HER ailesine ait reseptörler homodimerizasyon veya heterodimerizasyon ile aktive olmaktadır. Dimerizasyon sonrası aktifleşen tirozin kinazlar aşağı yöndeki sinyal iletim moleküllerini de aktifleştirirler. Aktif hale gelen sinyal yolları sonucunda çoğalma sinyali alınırken, öncül apoptotik sinyaller ve hücre döngüsünde tutulma engellendiği için hücre hayatta kalarak bölünmeye devam eder. Büyümesi kontrol edilemeyen bu hücreler zamanla tümör hücreleri haline gelir ⁷. Kinik olarak, genin fazlaca ifadesi, metastaz ve agresif kanser fenotipiyle ilişkilendirilmektedir ⁸. Bu özellikleri sebebiyle ameliyat sonrası nüksetme riski yüksek ve tedavi edilmediğinde sağ kalımı düşüktür ⁵.

ErbB2 fazla ifadesinin görüldüğü meme kanserinde insanlaştırılmış monoklonal antikor (mAb) Trastuzumab, onaylanan ilk tedavi olup hastalarda sağ kalım oranını arttırmıştır. Pertuzumab ve Trastuzumab Emtansine (T-DM1) tedavide ilerlenerek

daha sonra onaylanan antikor ve antikor-ilaç birleşimi olmuştur. Trastuzumab direnci gözlenmesi ve en son geliştirilen tedavilerin etkinliğinin klinik çalışmalar ile hala araştırılıyor oluşu HER2 hedeflenen tedavilerin sınırlandırılmasına neden olmuştur ^{5,6}.

Kanser tedavisinde aday ilaçların geliştirilmesi hedefiyle yukarıda bahsi geçen tedavi yöntemlerine alternatif bir yaklaşım amacıyla grubumuz 2012 yılında meme kanseri üzerinde çalışmalar yapmıştır. Grubumuz tarafından piyasada var olan antikorlardan farklı bir epitop tercihi olan ve farklı proliferasyon etkinliği gösteren ve ErbB2 antikorları geliştirilmiştir ⁶. Bu araştırmada ise meme kanseri için geliştirilen beş antikordan en az bir tane hedef antikorun tedavi için öne çıkması hipotezimizdir. Bu amaçla hedefi HER2 için etkin olan antikorların ağır ve hafif zincirlerinin antijen tanıyan amino asitlerinin dizisi saptanacaktır. Ayrıca bu dizilerin insan IgG1 kodlayan vektörlere klonlanabilmesi için ön çalışmalar gerçekleştirilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

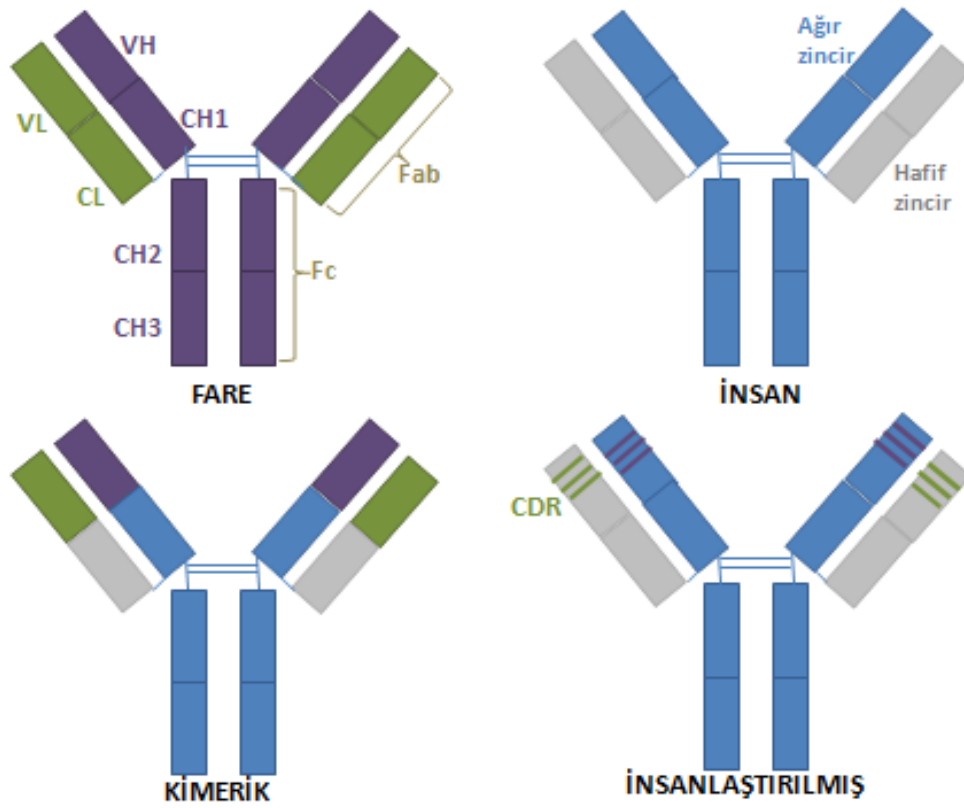
2.1 Kanser Tedavisinde Monoklonal Antikorlar

Biyoterapötik ilaçların en hızlı gelişen alanı monoklonal antikorların kanser tedavisindeki etkinlikleri her geçen gün artmaktadır. Özgün olmaları bunda anahtar bir etkidir.

Tedavi için geliştirilen monoklonal antikor üretiminin temelinde hibridoma hücreleri yer almaktadır. Bağışıklık kazandırılmış deney hayvanının dalağından izole edilen B lenfosit hücreleri ile myeloma hücrelerinin (kemik iliğinde meydana gelen tümör tipi) füzyonu sonucunda hibridoma hücreleri elde edilir. Tümör hücresi sonsuz bölünebilme özelliği verirken, B lenfosit antikor üretebilmesini sağlar böylece iki farklı özellik tek bir hücrede buluşturulur. Bu hücreler tekrarlanan klonlamalar sonucunda tek tip hibridoma hücresinden türedikleri için monoklonal olarak adlandırılırlar ve yıllar boyunca birbiriyle aynı antikoru üretebilirler. Bu antikorlar, deney hayvanın başta bağışıklık kazandırıldığı antijeni spesifik olarak tanıyabilme özelliğine sahiptirler^{9,10}.

Tek bir B lenfositinden üretilen monoklonal antikorlar, Y-şeklinde temel antikor yapısına sahip olup, gövdede birleşen iki dal biçimindedirler. Şekil 1'de gösterildiği gibi antikorun dallanan kısımları hafif ve ağır zincirden oluşurken, gövdesi sadece ağır zincirden oluşmaktadır. Gövdeden dallanan üst kısım antijen bağlanma bölgesi (Fab) olarak adlandırılırken, gövdenin kendisi değişmez bölge (Fc) olarak adlandırılmaktadır. Değişken bölgelerin (VH ve VL) uç kısımlarında ise antijen bağlanma bölgeleri veya komplementer belirleyici bölgeler denilen CDRs (complementarity determining regions) mevcuttur^{11,12}. Antijen bağlanmasını belirleyen asıl bölge burasıdır. İmmüoglobulinin, değişken ağır zincirinde üç tane ve değişken hafif zincirinde üç tane olmak üzere toplamda altı tane CDR'si vardır⁹. Bu alanlar sebebiyle, Fab bölgesi antijen bağlanmasından sorumludur. Bu göreviyle antikorun tüm işlevinden sorumlu bölgeymiş gibi dursa da immüoglobulinin Fc bölgesi de aslında antikorun görevine hizmet etmektedir. Hedeflenen tümör hücresinin direk ölümü, Fab bölgesinin antijene bağlanması sonucunda, reseptör işlevinin engellenmesi veya apoptozun başlatılması gibi yollarla gerçekleştirilebilir. Fc reseptörleri ise değişmez bölgeden tanıyarak, direk olmayan, bağışıklık sisteminin

müdahalesi ile yönetilen hücre ölümüne yola açarlar. Antikor bağımlı hücre aracılıklı sitotoksinite (ADCC, antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity) ve komplement bağımlı sitotoksinite (CDC, complement-dependent cytotoxicity) bağışıklık sistemi aracılığıyla tümör hücrelerin öldürülmesinde rol oynayan mekanizmalardır. Doğal öldürücü hücreler (natural killer cells), makrofajlar, hedef tümör hücredeki antijene bağlanmış antikorun Fc bölgesinden tanıyarak, tümör hücrelerin öldürülme mekanizmasını başlatırlar^{4,9,13}.



Şekil 1. Monoklonal antikor çeşitleri ve yapısal elementleri. Antikorlar, gövdede birleşen iki dal biçimindedirler. Antikorun dallanan kısımları hafif (H) ve ağır (L) zincirden oluşurken, gövdesi sadece ağır zincirden oluşmaktadır. Gövdeden dallanan üst kısım antijen bağlanma bölgesi (Fab) olarak adlandırılırken, gövdenin kendisi değişmez bölge (Fc) olarak adlandırılmaktadır. Antikorun uç bölgelerindeki ağır ve hafif zincirlerinde, farklılık gösteren değişken bölgeler (VH ve VL) yer almaktadır. Geri kalan alanlar değişmez bölgelerdir (CL, CH1, CH2, CH3). Değişken bölgelerin (VH, VL) uç kısımlarında ise antijenin tanınmasında rol oynayan komplementer belirleyici bölgeler denilen CDR'ler mevcuttur.

Günümüzde monoklonal antikolar, fareye ait (murin), kimerik, insanlaştırılmış ve insan monoklonal antikoları olarak gruplandırılmaktadır. 1986 yılında FDA onayıyla piyasaya sürülen ilk monoklonal antikor fareye aittir ¹⁴. Murin antikorun yapısal elementlerinin hepsi (Fab, Fc gibi) tamamıyla fareye ait olup, fare myeloma hücrelerinin, fare B-lenfosit hücreleri ile füzyonu sonucu oluşan hibridoma hücreleri tarafından sentezlenmektedir ¹². Böylece üretilen ilk jenerasyon tedavi edici monoklonal antikolar fare kökenli olmuştur. Fakat bu jenerasyonun komple fare kökenli olması antikorun yabancı antijen olarak algılanmasına ve bağışıklık sisteminde yan etkilere neden olmuştur. Aynı zamanda fare antikorunun bağlanma kapasitesinin kısıtlı olması bağışıklık sistemini etkili olarak devreye girememesine sebebiyet vermiştir. Dolayısıyla efektör fonksiyonunu yerine tam getiremeyen antikoların etkinliği ve yan etkileri sebebiyle güvenilirliği tartışma konusu olmuştur. Piyasadaki pek çok fareye ait antikor sonrasında geri çekilmiştir ^{15,17}. Murin antikoların geliştirilmesini takiben on yıl sonra rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler sayesinde 1997 yılında ilk kimerik monoklonal antikor üretilmiştir ⁸. Şekil 1’de gösterildiği gibi, kimerik monoklonal antikorda değişken bölge fareye ait kalırken, değişmez bölgenin yani Fc bölgesinin, kaynağı insan olarak modifiye edilmiştir ¹⁶. Devamında antikor tasarım araçlarının geliştirilmesi insanlaştırılmış antikoların üretilmesini sağlamıştır. 1997 yılında FDA tarafından onaylı insanlaştırılmış ilk monoklonal antikor bağışıklık sistemi hastalığına karşı üretilmiştir. Kanser tedavisinde insanlaştırılmış ilk monoklonal antikor, 1998 yılında meme kanserine karşı piyasaya sürülen Trastuzumab (Herceptin) olmuştur. İnsanlaştırılmış monoklonal antikorda sadece CDR bölgesi fareye ait kalırken geri kalan değişken ve değişmez bölgeler insan kaynaklıdır (Şekil 1). Böylece insan tarafından, fare kökenli yapılara karşı geliştirilen antikor cevabı en aza indirilmiştir. Antikorun daha etkili bir şekilde çalışması sağlanarak, hedefin yok edilmesi için efektör etkinliği artırılmıştır. Bağışıklık sisteminin ilaç için devreye girerek, ilacın atılımında rol oynaması murin ve kimerik monoklonal antikolarla göre indirgenmiştir. Sonuç olarak gelişen teknolojiyle ilacın etkinliğinin artması sağlanmıştır ^{12,17-19}. Son kuşak monoklonal antikolarda ise genetik yapısı değiştirilmiş transgenik hayvanlar veya denek hayvan kullanılmadan faj “display” teknoloji ile tamamen insan antikoları üretilmiştir. Tamamen insan ilk monoklonal antikor, otoimmün hastalığa karşı geliştirilmiş ve 2002 yılında piyasaya

girmiştir ^{20,21}. Kanser tedavisinde insan kaynaklı monoklonal antikor kullanımına, 2006 yılında kalın bağırsak kanseri tedavisi ile başlanmıştır ²⁰.

Monoklonal antikorlar yukarıda bahsi geçen üretim kaynaklarına göre adlandırılırlar. Antikorlar isimlerinin sonuna kimerik ise “-ximab”, insanlaştırılmış ise “-zumab”, tamamen insan kaynaklı ise “-mumab” ekini alırlar ²². Fare kökenli olarak yola başlayan monoklonal antikorların gelişim süreçleri insansı hale dönüştürülmeleriyle bitmemiştir. Günümüzde hala talep gören bir araştırma konusudur. Dolayısıyla keşifte ve klinikte araştırılmakta olan monoklonal antikorların sayısı her geçen gün artmaktadır. Tablo 1’de halen onaylı olarak piyasada bulunan kanser tedavisinde kullanılan bazı monoklonal antikorlar listelenmiştir ^{2,3,22-25}.

Tablo 2. Kanser tedavisinde kullanılan bazı monoklonal antikorlar ve onların özellikleri. CD, farklılaşma kümesi; CTLA, sitotoksik T lenfosit antijen; EGFR, epidermal büyüme faktörü reseptörü; HER, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü; PD, programlanmış ölüm reseptörü; RANKL, reseptör aktivatör nükleer kappa-B ligandı; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü.

Jenerik Adı	Ticari Adı	Tanım	Hedef	Kanser Türleri
Alemtuzumab	Campath	İnsanlaştırılmış, IgG1k	CD52	Kronik lenfositik lösemi
Bevacizumab	Avastin	İnsanlaştırılmış, IgG1	VEGF	Kalın bağırsak kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
Brentuximab vedotin	Adcetris	Kimerik, IgG1-ilaç birleşimi	CD30	Hodking lenfoma
Cetuximab	Erbitux	Kimerik, IgG1k	EGFR	Kalın bağırsak kanseri, baş ve boyun kanseri
Daratumumab	Darzalex	İnsan, IgG1k	CD38	Çoklu miyelom
Denosumab	Xgeva	İnsanlaştırılmış, IgG2	RANKL	Kemik tümörü

Ipilimumab	Yervoy	İnsanlaştırılmış, IgG1	CTLA-4	Melanom
Nivolumab	Opdivo	İnsan, IgG4	PD-1	Hodking lenfoma, skuamöz hücreli baş ve boyun kanseri, melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri,
Obinutuzumab	Gazyva	İnsan, IgG1k	CD20	Kronik lenfositik lösemi
Ofatumumab	Arzerra	İnsan, IgG1	CD20	Kronik lenfositik lösemi
Panitumumab	Vectibix	İnsan, IgG2k	EGFR	Kalın bağırsak kanseri
Pembrolizumab	Keytruda	İnsanlaştırılmış, IgG4	PD-1	Skuamöz hücreli baş ve boyun kanseri
Pertuzumab	Perjeta	İnsanlaştırılmış, IgG1k	HER2	Meme kanseri
Ramucirumab	Cyramza	İnsan, IgG1	VEGFR2	Mide kanseri
Rituximab	Rituxan	Kimerik, IgG1	CD20	Hodking olmayan lenfoma, kronik lenfositik lösemi
Trastuzumab	Herceptin	İnsanlaştırılmış, IgG1k	HER2	Meme kanseri, mide kanseri
Trastuzumab Emtansine	Kadcyla	İnsanlaştırılmış, IgG1-ilaç birleşimi	HER2	Meme kanseri

Etkin bir antikor tedavisinin zor olmasının temel nedenlerinden biri etkili bir hedef bulmaya dayanmaktadır. Antikor tedavisinin etkinliği ve güvenliği hedefin doğasına büyük ölçüde bağlıdır. Örneğin hedef olarak seçilecek sitokin, reseptör

molekül veya büyüme faktörü tümör hücresinin yüzeyinde fazlaca ifade edilirken normal hücrelerde üretimi yüksek oranda olmamalıdır. Aksi takdirde antikor sağlıklı ve sağlıklı hücreleri birbirinden ayıramaz ve her ikisine de karşı savunma mekanizması tetiklenir. Aynı zamanda hedef olarak seçilecek molekülün yer aldığı sinyal yolları iyi irdelenmeli, hedefin sinyal iletimi için kilit rol oynadığı belirlenmelidir. Bunların yanı sıra, tedavinin etkinliğini ve güvenilirliğini tehlikeye düşürecek başka bir yan yolda rol almadığı iyi analiz edilmelidir ^{16,21}.

Tablo 1’de özetlendiği üzere HER, EGFR gibi epidermal büyüme faktörü reseptörü, RANKL gibi ligandlar veya CD gibi kanser hücre yüzeylerinde özgün olarak üretilen farklılaşma antijenleri kanser tedavisinde hedef alınan moleküllere örnektir. Bunlar, piyasada antikorları olması sebebiyle insanda kanser tedavisi için geçerli hedef haline gelmiş antijendirler. Dolayısıyla bu moleküllere karşı geliştirilen tedavilerin etkili bir sonuç verdiği önceden kanıtlanmıştır. Grubumuz bu hedeflerden HER2 üzerinde daha önceden çalışmalar yapmıştır ⁶. Monoklonal antikor tedavisinde neden meme kanserine yönlenildiği ve meme kanseri mekanizması devam eden bölümlerde detaylı olarak anlatılmaktadır.

2.2 Meme Kanseri

Amerikan Kanser Derneği’nin 2016 yılı için yayınladığı verilere göre, kadınlarda meme kanseri, kanser kaynaklı ölüm nedenlerinde ikinci sırada yer almaktadır. 2016 yılı itibari ile yapılan istatistikler doğrultusunda %29 yeni vaka beklenmekte ve bunların %14’ünün ölüm ile sonuçlanacağı tahmin edilmektedir ²⁶. 2014 yılında Kanser Daire Başkanlığı’nın yayınladığı faaliyet raporunda, Türkiye’de meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türü olarak vurgulanmış ve yılda yaklaşık 15.000 kadının meme kanserinden etkilendiği belirtilmiştir ²⁷.

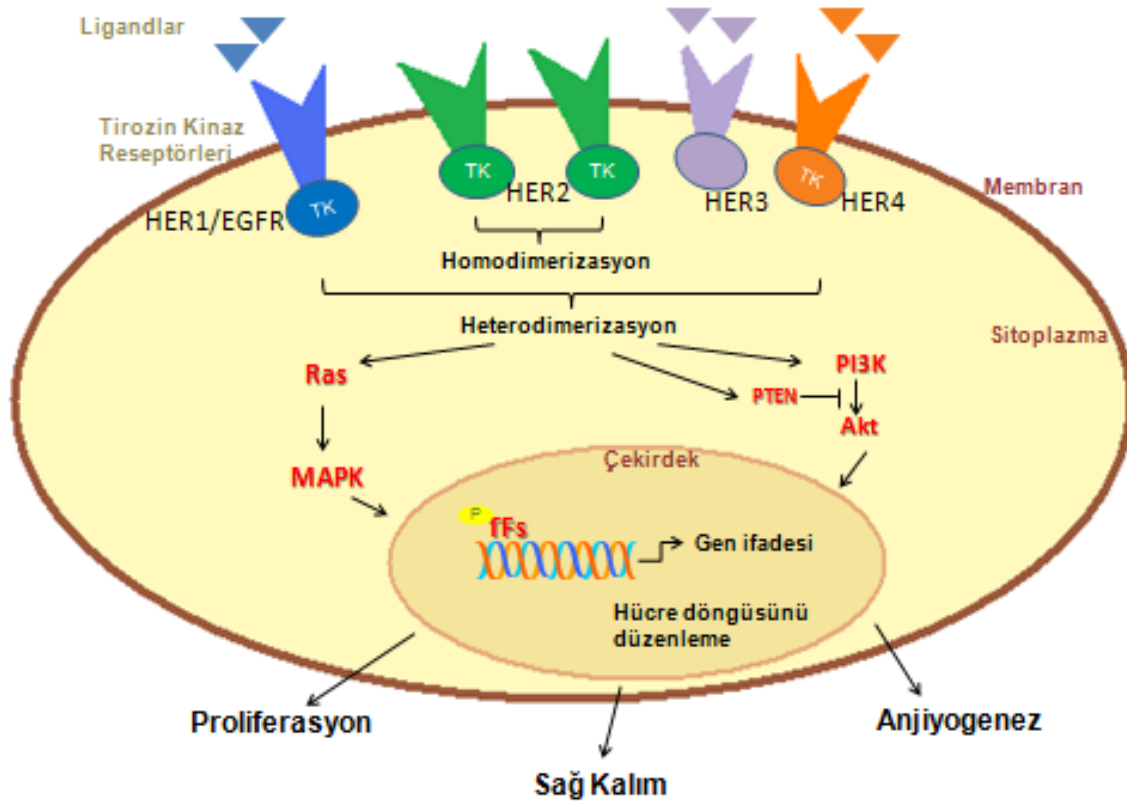
Yaygın olarak görülen meme kanserinin moleküler temeline bakıldığında yaklaşık olarak %75’inde östrojen reseptörü(ER) ve/veya progesteron reseptörünün (PR) varlığı görülmektedir. Geriye kalan %25’lik oran ise östrojen bağımsız meme

kanserini oluşturmaktadır ^{28,29}. Bu, östrojen bağımlı tipine göre daha agresif, tekrarlama oranı daha yüksek, sağ kalımının ise daha düşük olduğu meme kanseri tipidir. Meme kanserinde ayrıca %20-25 oranında HER2(ErbB2)'nin fazlaca ifade edildiği görülmektedir. HER2 pozitif meme kanserlerinin yaklaşık %50'sinde ER ve PR'nin beraber amplifiye olduğu belirlenirken ER ve PR negatif östrojen bağımsız meme kanserinin %6'sında HER2'nin pozitif olduğu belirlenmiştir ^{5,6,28,29}. Meme kanserinin her iki tipinde de rastlanılan HER2 pozitif olan tümörler hızlı büyüme eğilimi ile agresif fenotipe sahiptir. Erken metastaz ile sık yayılım gösterirler ve hastalığın seyrinin tahmin edilebilirliği zayıftır ³⁰.

HER2 tirozin kinaz reseptörüdür. Kromozom 17'nin q kolunda bulunan *HER2* geni tarafından kodlanır ³¹. Kendisinden başka HER1 (EGFR1), HER3 ve HER4 reseptör kinazların yer aldığı HER (ErbB) ailesinin bir üyesidir ³². Bu reseptör ailesi, büyüme hormonlarının, ligandların çeşitli genlerin transkripsiyonunu etkilediği sinyal aktarım yolunda transmembran proteinlerin ve hücre içi aracı moleküllerin fosforilasyonunda veya fosforlarının giderilmesinde rol oynarlar³¹. Böylece zincir halinde yolakta bir proteinin diğerini etkilemesi sağlanarak sinyal iletimi gerçekleştirilir.

HER ailesinin üyeleri benzer yapısal bileşenlerden oluşurlar. Hücre dışında dört adet ligand bağlanma alanı, tek bir transmembran alanı ve hücre içinde ise tirozin kinaz aktivitesinden sorumlu alana sahiptirler. İçlerinden sadece HER3'ün tirozin kinaz fonksiyonuna sahip alanı yoktur ve kendisi ailenin diğer üyeleri ile heterodimerizasyon yapmadığı sürece aktif değildir. Hücre membranında bulunan bu reseptörler, epidermal büyüme faktörü (EGF, epidermal growth factor), değişiklik yapan alfa büyüme faktörü (TGF- α , transforming growth factor- α), epiregulin, betasellülin gibi ligandların bağlanması ile üç boyutlu yapılarında değişim geçirerek tetiklenirler. Tetiklenmiş reseptörler, bağlanmaya açık hale gelen diğer bir bölgeleriyle başka reseptörle etkileşime girer. Eğer kendisiyle aynı tip reseptörle etkileşime girerse bu homodimerizasyon, HER ailesine ait başka bir reseptörle birleşirse buna heterodimerizasyon denir (Şekil 2). Dimerizasyonu sonucu reseptör aktif hale gelir ve hücre içi kinaz alanları fosforiller. Bunun sonucunda aktif hale gelen protein kinazlar

sinyal iletiminde aşağı elementleri uyaracak zincir reaksiyonuna başlarlar. Bağlanan liganda ve dimerizasyon ortağına bağlı olarak, zincir halinde devam eden reaksiyonlar sonucu proliferasyon, sağ kalım, hücre farklılaşması, anjiyogenez ve apoptozun engellenmesi gibi farklı sinyal yolları etkin hale gelir³⁰⁻³². Sonuç olarak anormal büyümeye başlayan hücre, hayatta kalma sinyalleri ile yaşamına devam ederken, anjiyogenez ile ortamına daha fazla büyüme faktörü, besin ve oksijen tedarik eder. Zamanla farklılaşarak tümör hücresi haline gelir.



Şekil 2. HER2 sinyal iletimi. HER2, tirozin kinaz reseptörüdür. Bilinen bir ligandı yoktur. Homodimerizasyon veya ErbB/HER ailesine ait HER1, HER3 ve HER4 ile heterodimerizasyon yaparak aktive olmaktadır. Dimerizasyon sonrası tirozin kinaz bölgesinden(TK) birbirlerini fosforilleyen reseptörler PI3K-Akt, Ras-MAPK yolağında yer alan aşağı yöndeki sinyal iletim moleküllerini de aktive ederler. Bu mekanizmaların aktif olması sonucunda hücre döngüsünde tutulma engellendiği için hücre hayatta kalarak çoğalmaya devam ederken, hücrenin metastaz ve anjiyogenez kapasitesi artar.

HER2 reseptör ailesinden iki açıdan ayrılmaktadır. Birincisi, bu zamana kadar bulunmuş bir ligandı yoktur. İkincisi ise reseptörün hücre dışı matriks yapısı diğer

üyelerden farklı olarak ligand ile aktive edilmiş açık konformasyonuna daha çok benzemektedir. Bu şekli sebebiyle de ligand ile aktive olmuş diğer HER ailesi reseptörleri ya da kendisi ile dimer yapmaya yatkındır. Hatta bu özelliği sebebiyle HER ailesine ait diğer üyeler tarafından daha çok tercih edilen dimerizasyon ortağıdır. HER2'nin yer aldığı reseptör birleşimleri daha kararlı ve bunun sonucunda meydana gelen sinyal iletimi daha etkili olmaktadır^{5,7,31}.

Meme kanserinde HER2 geninin amplifikasyonu sonucunda fazlaca ifade edilen HER2 reseptör proteini membran yüzeyinde çok sayıya ulaşır. Yukarıda anlatıldığı gibi zaten açık konformasyonda olması sebebiyle ligand ile etkinleştirilmeye gerek duymadan kendisiyle veya HER ailesinin diğer üyeleriyle kolayca dimer oluşturur³¹. Dimerizasyon sonucu reseptör kinazlar fosforillenerek aktifleşir ve böylece aşağı yöndeki sinyal iletim molekülleri bu kinazlara fosforillenmiş bölgelerinden bağlanarak onlar da aktif hale gelir. PI3K (phosphatidylinositol 3-kinaz)- Akt(protein kinaz B, protein kinase 3) ve Ras-MAPK (mitojen aktifleşmiş protein kinaz, mitogen activated protein kinase) yolları aktive olan sinyal mekanizmalarıdır³².

Şekil 2'de gösterildiği gibi PI3K dimerizasyon ile aktif hale gelen HER2 tarafından aktive edilir. Aynı zamanda PI3K'yı baskılayıcı olarak görev yapan PTEN(fosfatidil transferaz ve tensin homologu) de fosforillenir. Fakat bu etkileşim sonrası ifadesi azalır ve PI3K aktivasyonunu engelleyemez³². Aktif halde olan PI3K, Akt mekanizması ile öncül apoptotik sinyalleri engeller. Ayrıca tümör baskılayıcı genlerin ifadesi azaltıldığı için hücre döngüsünün kontrolü ortadan kalkar ve hücreler hayatta kalarak bölünmeye devam eder. Ras-MAPK yolağının düzenlenmesinin sonucunda ise transkripsiyon faktörleri aktive edilerek gen ifadesi değiştirilir. Hücre çoğalmaya teşvik edici sinyaller aktifleştiğinden bölünmeye devam eder. Büyümesi kontrol edilemeyen bu hücreler zamanla tümör hücreleri haline gelir^{5,7}.

Fazlaca ifade edilen HER2'nin birden fazla sinyal iletimini aktifleştirerek agresif metastaz yapabilen bir meme kanseri tipi oluşturmasıyla monoklonal antikor üretimi için talep gören bir hedef haline gelmiştir. Sonraki bölümde bu zamana kadar onaylı olarak piyasada bulunan HER2 karşıtı monoklonal antikorlara değinilmiştir.

2.3 Meme Kanserinde Monoklonal Antikorlar

2.3.1 Trastuzumab (Herceptin)

1998 yılında, HER2+ meme kanserine karşı onaylanan ilk monoklonal antikor Trastuzumab, ticari adıyla Herceptin olmuştur. Trastuzumab insanlaştırılmış immünoglobulin G1 (IgG1) ağır zincirinden ve kappa(κ) hafif zincirinden oluşmaktadır¹². HER2'nin hücre dışı ligand bağlanma alanı IV'ü tanımaktadır. HER2'nin bu hücre dışı alanına bağlanarak HER2+ meme kanserinde çoğalmayı engellediği görülmüştür⁶. HER2 homodimerlerini, heterodimerlerine göre daha etkili engellediği görülürken, moleküler mekanizmasıyla hücre sinyalinin tamamen engellemediği bilinmektedir. Bunun başlıca sebebi, reseptör kinazın etkin hale gelmesini engellerken bağlandığı alan dolayısıyla özellikle reseptörün heterodimerizasyon yapmasının önüne geçememesidir^{6,30}.

Metastatik meme kanserinde ilk başta tekli tedavi olarak kullanılmış ve tedaviye başlanıldığından hastanın sağ kaldığı toplam süreyi (overall survival, OS) yaklaşık %25 oranında geliştirebildiği bulunmuştur. Buna karşın, ilk başta tedaviye cevap veren hastaların çoğunluğunda bir yıl içerisinde hastalığın gelişimini tekrar gösterdiği gözlemlenmiştir^{6,30}.

2.3.1.1 Trastuzumab direnç mekanizmaları

Trastuzumab'a karşı geliştirilen direnç mekanizmasının büyük çoğunluğunu HER ailesinin diğer üyelerinin fazlaca ifadesi ve EGF, betasellülin, heregulin gibi ligandlarının fazla üretimi oluşturmaktadır. Böylece, HER2 etkinliği engellense de heterodimer oluşturduğu partnerinin telafi edici etki yapmasıyla antikor tarafından geliştirilen büyüme karşı etki azalmaktadır^{30,33}.

MUC4 (Mucin protein 4), membran ilişkili glikoproteindir. Fazlaca ifade edildiğinde HER2'ye bağlanarak Trastuzumab'ın bağlanmasını engellemektedir. HER2'ye direk bağlandığı için onu etkin hale getirir. Böylece, apoptozun baskılanması, kanser hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasının engellenmesi, metastaz gibi sinyal mekanizmalarının aktif hale gelmesine neden olur. Tümör oluşumuna katkı sağlar³³.

HER aile üyelerinden başka proteinlerin de fazlaca ifadesi, Trastuzumab direnç mekanizmasında rol oynamaktadır. IGF-1R (insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü, insulin-like growth factor-1 receptor) hücre membranında fazlaca ifadesinin Trastuzumab'a verilen cevabın zayıf olmasıyla ilişkilendirilmektedir. IGF-1R ve HER2 arasında bağlanma olması sonucu HER2'nin etkinleşmesiyle PI3K-Akt ve MAPK gibi sinyal yolları aktive olmaktadır³³. Ayrıca heterodimerizasyon sonucu IGF-1R'nin faaliyetiyle p27, siklin bağımlı kinaz inhibitörünün ifadesi azalır. Hücrelerin, Trastuzumab kaynaklı hücre döngüsünün G1 fazında tutulmasının etkisi zayıflar. Baskılanmanın kalkmasıyla tümör hücresi büyümeye devam eder³¹.

Yukarıda anlatılan mekanizmalara ek olarak, HER2 sinyal yolağında yer alan proteinlerin herhangi birinde (HER2 PTEN, PI3K vs.) sinyal iletimini aktive edici bir mutasyonun görülmesi, Trastuzumab tarafından yaratılan baskılama mekanizmasına karşıt bir etki göstereceği için tedavinin etkinliğinin azalmasına ve direnç oluşumuna sebebiyet vermektedir⁶.

2.3.1.1 Trastuzumab ikili tedaviler

Bir önceki bölümde anlatılan direnç mekanizmalarının açığa çıkmasıyla daha iyi, etkin bir tedavi sağlanabilmesi için alternatif tedavi arayışlarına gidilmiştir. Trastuzumab hassasiyetine neden olan, ekstra büyüme sinyali sağlayan mekanizmalarda yer alan proteinleri etkileyecek antikorla birlikte uygulanacak ikincil tedaviler geliştirilmeye başlanmıştır.

Öncü klinik çalışmalar HER2'nin amplifiye olduğu fare modellerinde Trastuzumab ile beraber uygulanan tirozin kinaz inhibitörlerin veya kemoterapi ajanlarının tümör karşıtı daha iyi cevap oluşturduğunu göstermiştir²⁸.

FDA onaylı olarak uygulanan lapatinib ile klinik çalışmaları hala devam eden neratinib, afatinib gibi tirozin kinaz inhibitörler, HER aile üyelerine bağlanarak homodimer ve heterodimer oluşumunu engellemekte, böylece HER2+ meme kanseri tedavisine karşı direnç geliştirilmesini önlemektedir^{5,34,35}.

Monoklonal antikor tedavisinin tamamlanmasından sonra hastalığın nüksetmesini önlemek için antikor tedavisi aynı zamanda DNA hasarına neden olan doxorubicin, cisplatin gibi kemoterapilerle de birleştirilmiştir. Hastalığın yeniden ortaya çıkmasının 4.6 aydan 7.4 aya yükseldiği, hastanın sağ kalımının (OS) ise 20 aydan 25 aya olacak şekilde önemli artış gösterdiği gözlemlenmiştir ³⁰.

İkincil tedavilerle, Trastuzumaba karşı geliştirilen direnç giderilmeye çalışılsa da antikorun etkinliğinin sorgulanmasına neden olmuştur. Bu sebeple HER2+ meme kanserine karşı Trastuzumab ile beraber uygulanabilecek başka veya daha etkin monoklonal antikor geliştirilmesi için çalışmalara devam edilmiştir. Pertuzumab geliştirilen ikinci monoklonal antikor olurken Trastuzumab Emtansine antikor-ilaç birleşimi olarak alternatif antikor tedaviler olarak yerini almıştır. Bu antikorlar tek başına uygulandığı gibi birbirleriyle kombinasyon halinde veya kemoterapi ile birlikte de uygulanmaktadır.

2.3.2 Pertuzumab (Perjeta)

2012 yılında, HER2 pozitif meme kanserine karşı FDA tarafından onaylanan ikinci monoklonal antikor ticari adıyla Perjeta olarak bilinen Pertuzumab olmuştur. Antikor, insanlaştırılmış immünoglobulin G1 (IgG1) ağır zincirinden ve kappa(κ) hafif zincirinden oluşmaktadır ². Hücre içi tirozin kinaz aktivitesi olan transmembran glikoprotein HER2'yi tanımaktadır. Pertuzumab, Trastuzumab'dan farklı olarak reseptörün hücre dışı ligand bağlanma alanı II'ye bağlanmaktadır. Bu bölgeye bağlanması sebebiyle HER2'nin HER1, HER3, HER4 ile yani diğer HER ailesi reseptörlerle heterodimer yapmasını engellemektedir. Böylece diğer reseptörlerden gelen sinyal aktivasyonunu bloke etmektedir ⁶.

Tedaviden sonra hastalığın ilerlemeyerek, hastanın yaşadığı zamanı (progression free survival, PFS) Trastuzumab'a oranla 3.9 aydan 6.1 aya çıkardığı gözlemlenmiştir ². HER2'nin hücre dışı alanında farklı bölgeleri tanımları beraber tedavi için kullanılmalarına güçlü gerekçe oluşturmuştur. Yapılan klinik çalışmalarda birbirlerinin faaliyetini engellemediği rapor edilmiştir. Pertuzumab'ın solid tümörler

üzerinde kanserli hücrenin gelişimini durdurmada kısıtlı faaliyet gösterse de Trastuzumab ile beraber sinerjik etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Tek başına kullanıldığında az bir etki gösterirken Trastuzumab ile kombine edildiğinde etkisinin yaklaşık %50 artması ikili tedavi yaklaşımını doğrulamıştır³⁶. Ayrıca Pertuzumab ve Trastuzumab'ın her ikisinin de tümör oluşumuna karşı ADCC sinyal iletimini aktifleştirdiği ve metastatik tümör yayılımını engellediği gözlemlenmiştir².

Trastuzumab-Pertuzumab ikili monoklonal antikor tedavisi ile beraber docetaxel, paclitaxel gibi kemoterapötik ajanlar da kullanılmıştır. Bu ajanlar, mikrotübüllerin polimerizasyonunu bozduğu için mitotik inhibitör olarak görev yapmaktadırlar. Hücrelerin mitotik durdurma ile ölümüne neden olmaktadır³⁵. Bu mekanizmasıyla tümör oluşumunun engellenmesine katkı sağlamaktadır. Pertuzumab, Trastuzumab ve docetaxelin beraber uygulandığı CLEOPATRA faz III klinik denemelerinde HER2+ meme kanseri olan hastalarda tedavi etkinliğinin önemli derecede arttığı gözlemlenmiştir³⁷.

2.3.3 Trastuzumab-Emtansine (Kadcyla)

TDM-1(Trastuzumab-Emtansine veya Ado-Trastuzumab emtansine), 2013 yılında FDA tarafından HER2 pozitif metastatik meme kanserine karşı onaylanmış antikor ilaç birleşimidir. Monoklonal antikor Trastuzumab ve kemoterapötik ajan emtansine'den oluşmaktadır. Emtansine, DM1, maytansine türevidir, immün-toksindir. Tübülün inhibitörü olarak görev yapar ve mikrotübüllerin bir araya gelmesini engeller².

Antikora ekli olan küçük toksik molekül, hücre içerisine alındığında hedef bölgesinde faaliyete başlar. Bu küçük molekül tek başına yüksek oranda sitotoksik etki yaratıp ciddi sistematik sorunlara yol açabileceğinden antikor ile birlikte tedavi yöntemi olmuştur. Bu şekilde antikorla beraber doğrudan hedef tümör hücrelerine giderek tedavinin güvenilirliği artırılmıştır¹⁶.

Metastatik meme kanseri olan, docetaxel ile Trastuzumab tedavisi görürken hastalığı ilerleyen hastalara uygulanan faz III çalışmalarında (EMILIA denemesi)

TDM-1 ile tirozin kinaz inhibitörü lapatinib ve kemoterapötik ajan capecitabine karşılaştırılmıştır. Tedavi sonucunda sonucunda PFS'nin 6.4 aydan 9.6 aya çıktığı OS'de ise 25.1 aydan 30.9 aya önemli ölçüde artış görülmüştür ^{28,32}.

2.4 Meme Kanserinde Alternatif ve Var Olan Tedavilerin İncelenmesi

Önceki bölümlerde bahsedilen CLEOPATRA ve EMILIA klinik denemelerinin yanı sıra, piyasada var olan monoklonal antikörlerle yeni ilaç kombinasyonları yaparak alternatif tedavi yolları denenmektedir.

Tablo 2'de örneklendirildiği gibi araştırmada deney gruplarının bir kısmında monoklonal antikörlerin yanı sıra docetaxel, paclitaxel, capecitabine, vinorelbine gibi kemoterapötik (KT) ilaçlar bulunmaktadır. Östrojen reseptör modülatörü olan tamoxifen (TAM) ve anastrozole, letrozole gibi aromataz (östrojen sentez enzimi) inhibitörleri de devam eden çalışmaların hormon tedavisi (HT) grubunu oluşturmaktadır ^{28,30}. Böylece HER2 pozitif meme kanseri için var olan tedavilere ek yaklaşımlar denenmektedir.

Tablo 3. HER2 karşıtı klinik araştırmada olan örnek tedaviler. AI: aromataz inhibitörü; D - docetaxel; HT - hormon tedavisi; KT – kemoterapi; L - lapatinib; P - pertuzumab; Pac – paclitaxel; T - trastuzumab; TAM - Tamoxifen; X - capecitabine.

Klinik Deneme	Faz	Deneysel Gruplar
NeoALTTO	III	Pac+L, Pac+T ve Pac+LT
EMILLIA	III	TDM-1 ve X + L
CLEOPATRA	III	P + T + D ve T + D
NeoSphere	II	T + D, T + P + D, T + P ve P + T
ADAPT HER2+/HR+	II	TDM-1 + TAM/AI, TDM-1 ve Trastuzumab + TAM/AI
PER-ELISA	II	T + P+ Letrozole
PERTAIN	II	T + P + AI ve T + AI
DETECT V	III	T + P + KT vs T + P + HT

Ertumaxomab, var olan üç monoklonal antikörün yanı sıra faz I/II aşamasında olan HER2 reseptörünü hedef alan yeni monoklonal antikördür. Trastuzumab'dan farklı bir hücre dışı alan tanımaktadır. Ayrıca üç fonksiyonlu bir monoklonal antikördür. T hücreleri üzerindeki CD3'ü, tümör hücresi üzerindeki HER2 ve makrofaj, NK

hücreleri üzerindeki antijenlere bağlanabilmektedir. Böylece, T lenfosit aktivasyonu ile tümör hücrelerinin fagositoz yapılmasını sağlamaktadır^{32,38}.

HER2, meme kanserinin yaklaşık %25'inde fazlaca ifade ediliyor olması sebebiyle kanser tedavisi için ön plana çıkan, gözde bir hedef olmuştur. Geçerli kılınan, aktif bir hedef olması sebebiyle üzerinde belirtildiği gibi hala devam eden pek çok çalışma bulunmaktadır. Fakat bu çalışmaların neredeyse hepsi piyasada var olan monoklonal antikora dayanmaktadır. Hepsi OS ve PFS için önemli sonuçlar verseler de mekanizmaları gereği direnç gelişimi, neden oldukları yan etkiler sebebiyle tedaviyi kısıtlayıcı tarafları da vardır.

Trastuzumab'ın kalp ile ilgili karıncık işlev bozukluğu gibi meydana gelebilecek olaylarda riski arttırmasıyla ilgisi olduğu bulunmuştur. Bu sebep ile tedavi gören hastaların düzenli olarak kardiyak izlemesi yapılmaktadır. Ciddi yan etkiler görülmemesi için tedaviye başlamadan ve tedavi sırasında da kardiyak durum ile ilgili kısıtlamalar uygulanmaktadır³⁸. Aynı durum TDM-1 tedavisinde de geçerlidir. Ayrıca TDM-1'in ilaç birleşiminin immün-toksin olması sebebiyle verildiği dozlar belli limitlerde tutulmaktadır. Tümör hücrelerine ulaştığında dozun güçlülüğünün azalabilecek olması dezavantajdır¹⁶. Pertuzumab gerek tekli gerekse Trastuzumab ile ikili tedavide PFS ve OS'yi önemli ölçüde arttırırsa da hastalıkta ilerleme metastatik meme kanseri hastalarının çoğunda hala görülmektedir³⁶.

HER2'nin hücre dışı başka bir alanını tanıyan yeni bir ilaç, sinyal iletiminin daha etkin olarak engellenmesini sağlayabilir. Bulunan yeni antikor ile de kemoterapi veya hormon tedavisi ile de birleştirilerek tümör hücrelerini tanıyan daha hassas bir tedavi sağlanabilir.

2012 yılında grubumuz tarafından HER+ meme kanserine yeni alternatif bir yaklaşım amacıyla beş tane monoklonal antikor geliştirilmiştir. Bu antikorların SK-BR-3, BT-474, MDA-MB-361 gibi HER2'nin fazlaca ifade edildiği meme kanseri hücrelerinde hedefi in-vitro olarak tanıdığı ispatlanmıştır. Bu monoklonal antikorlar, HER2'yi piyasada bulunan antikorlardan farklı olarak reseptörün hücre dışı

alanlarının (I-IV) bütünü tanımlamaktadır. Antikorların hepsi kapa (κ) hafif zincirli IgG1 izotipindedir ⁶. Bu çalışmada, HER2'yi tanıyan IgG ağır zincir ve kapa hafif zincir amino asit sekansları belirlenerek, antikorun insanlaştırılabilmesi amaçlanmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir nitelik taşımaktadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü (iBG-İzmir) laboratuvarlarında Şubat 2015 ve Aralık 2016 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada gönüllüler üzerinde bir çalışma yapılmayıp, in vitro olarak hücreler ile çalışılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada kullanılan insan meme kanseri hücre hatları MCF-7 ile SK-BR-3 ve grubumuz tarafından geliştirilen HER2 monoklonal antikor üreten hibridoma hücreleri grubumuzun iBG-İzmir'deki stoklarından alınmıştır (Kasım,2016) ⁶. Hücre hatlarının mikoplazma negatif oldukları luminometrik olarak doğrulanmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada gen amplifikasyonu nedeniyle HER2 ifadesinin fazla görüldüğü SK-BR-3 hücresi ve antikor elde edilmesinde kullanılan hibridoma klonları bağımsız değişken iken bu hücrelerin proliferasyonu, canlılığı bağımlı değişkendir. HER2 ekspresyonunun az görüldüğü MCF-7 hücresi ise kontrol değişkendir. Hibridoma klonlarından elde edilen antikorun hedefi tanınması bağımlı değişkendir. Klon pelletlerinde elde edilen RNA'nın kararlılığı ve bütünlüğü bağımlı birer değişkendir. RNA'dan elde edilen cDNA ve onun polimeraz zincir reaksiyon ile çoğaltılmış DNA'sının dizi analizinin sonucu ve doğruluğu bağımlı değişkendir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1 Malzeme ve cihazlar

Kullanılan kimyasal ve reaktifler deney aşamalarına göre aşağıda listelenmiştir (Tablo 2). Hücre kültüründe ve laboratuarda kullanılan flask, tüp, tip gibi genel plastik sarflar Corning, Greiner Bio-one ve Thermo Scientific firmalarına aittir. Araştırma boyunca, kullanılan cihazlar ise Tablo 3'te listelenmiştir.

Tablo 3. Araştırmada kullanılan kimyasal, reaktif ve kitlerin listesi

Malzeme Adı	Firma	Katalog Numarası
Hücre kültürü		
Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)	Gibco	31885-023
RPMI-1640	Gibco	21875-034
McCoy's 5A Medium	Thermo Scientific	SH30200.01
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom	S0115
Penisilin/Streptomisin (P/S)	Biochrom	A2212
Non-Essential Amino Acid (NEAA)	Biological Industries	01-340-1B
L-Glutamine	Biological Industries	03-020-1B
%0.25 Trypsin-EDTA(1X)	Gibco	25200-056
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Lonza	BE17-516F
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Millipore	317275
Trypan Mavisı	Biological Industries	03-102-1B
MycoAlert Mikoplazma Deteksiyon Kiti	Lonza	LT07-703
Aquaguard-1	Biological Industries	01-867-1B
Aquaguard-2	Biological Industries	01-916-1E
Immünofloresan		

10X-PBS	Lonza	BE17-517Q
Formaldehit %37 Solüsyon	Amresco	0493
Triton-X	Sigma	9002-9301
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Sigma	D5417-10MG
Fluorescence Mounting Medium	Dako	S3023
Anti-ErbB2 (CB11) antikor	Abcam	Ab8054
Anti-mouse IgG(H+L) Alexa Fluor 568	Invitrogen	A11031
RNA izolasyonu, komplementer DNA sentezi, polimeraz zincir reaksiyonu ve jel görüntüleme		
NucleoSpin RNA kiti	Macherey Nagel	740955.50
TRIsure	Bioline	38033
Kloroform	Amresco	0757
İzopropil alkol	Sigma	24137
Etanol	Sigma	32221
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma	D5758
RNase Away	Sigma	83931
RevertAid First strand cDNA sentez kiti	Thermo Scientific	K1622
Mouse Ig-Primer Seti	Novagen	69831-3
MyTaq 5X Reaksiyon tamponu	Bioline	37111
MyTaq DNA Polimeraz	Bioline	21105
Tris-baz	Amresco	0826
Asetik asit(glacial)	Millipore	10063
Agaroz	BioShop	AGA001
3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS tamponu, 10X)	İntergen	S4601
GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10,000 bp	Thermo Scientific	SM0331
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 250-10,000 bp	Thermo Scientific	SM0311
SafeView Classic	Applied Biological	G108

	Materials	
--	-----------	--

Tablo 4. Araştırmada kullanılan ekipmanların listesi

Ekipmanın Adı	Firma	Katalog Numarası
Hücre kültürü & Immünofloresans		
Biyogüvenlik seviye 2 kabini	Thermo Scientific	51026637
Santrifüj(falkon tüp)	Eppendorf	05-413-327
CO ₂ İnkübatörü	Memmert	INCO153
Su banyosu	Nüve	Z10.NB
Aspiratör	Megasan Medikal	13102
Çalkalayıcı(shaker)	Thermo Scientific	88880620
Hemositometri	Marienfield Superior	0630010
Immünofloresan mikroskopu	Olympus	BX61
RNA izolasyonu, komplementer DNA sentezi, polimeraz zincir reaksiyonu ve jel görüntüleme		
NanoDrop	Thermo Scientific	ND2000
Tartı	Sartorius	8221S
Mekanik karıştırıcı	Stuart	80001490
Thermal Cycler	Applied Biosystems	A24811
Jel Elektroforez sistemi	Thermo Scientific	D2
PowerPac Güç Kaynağı	BioRad	1645050
MicroCL 17R(mikro santrifüj)	Thermo Scientific	75002455
MYSPIN6	Thermo Scientific	75005061
Vorteks	Thermo Scientific	88880018
Transillüminatör	Vilber Lourmat	-

3.6.2 Besi yeri ve solüsyonlar

3.6.2.1 Hücre kültürü

<u>Tam Besi yeri</u>	<u>Son Konsantrasyon</u>
DMEM/RPMI/McCoy's 5A	1X
FBS*	%10
NEAA	%1
P/S	%1
L-Glutamin	%1

*FBS firmadan -20°C'de teslim alındı. İlk kullanımdan önce su banyosunda 37 °C'de çözdürüldü FBS'in serum kaynağı canlıdan gelen biyolojik faktörleri 1 saat 56 °C'de inaktive edildi. Filtrelendikten sonra bölüştürülerek -20 °C'de saklandı. Besi yeri hazırlanmak istenildiğinde bu stok kullanıldı.

<u>Hücre Sayma Solüsyonu</u>	<u>Son Konsantrasyon</u>
PBS	1X
Trypan Mavisi	1X
Hücre süspansiyonu	1X

<u>Hücre Dondurma Solüsyonu</u>	<u>Son Konsantrasyon</u>
FBS	%90
DMSO	%10

3.6.2.2 Immünofloresan

<u>PBS</u>	<u>1L için</u>
10X PBS	100 mL
ddH ₂ O	900 mL

<u>Fiksasyon Solüsyonu (%2 Formaldehit)</u>	<u>20 mL için</u>
PBS	19 ml
%40 Formaldehit	1 mL

<u>Membran Geçirgenliği Solüsyonu (%0.1 PBS-T)</u>	<u>500 mL için</u>
PBS	500 mL
Triton-X	500 uL

<u>Bloke Etme Solüsyonu (%10 FBS)</u>	<u>500 mL için</u>
PBS	450 mL
FBS	50 uL

3.6.2.3 RNA izolasyonu ve jel görüntüleme

<u>%0.1 DEPC-muamele edilmiş su</u>	<u>1L için</u>
DEPC	1 mL
dH ₂ O	1L

<u>RNA agaroz jel</u>	<u>100mL için</u>	<u>Son Konsantrasyon</u>
Agaroz	1.2 g	%1.2
10X MOPS	10mL	1X
DEPC-muamele edilmiş su	87 mL	
%40 Formaldehit*	3ml	%1.2
SafeView DNA boyası*	5 uL	%5

* Agaroz, 10X MOPS, DEPC-muamele edilmiş su karıştırılıp kaynatıldı. Sonra çeker ocak altında formaldehit ve DNA boyası belirtilen oranlarda eklendikten sonra jel tanka döküldü.

3.6.2.4 Agaroz Jel

<u>50X Tris Asetat EDTA (TAE)</u>	<u>1L için</u>
Tris baz	242 g
Asetik Asit (glacial)	57.1 mL
0.5M EDTA	100mL
ddH ₂ O*	342.9

*İlk önce 800mL ddH₂O'da tris baz çözdürüldü sonrasında diğer içerikler eklendikten sonra hacim 1L'ye tamamlandı.

<u>1X TAE</u>	<u>1L için</u>
50X TAE	20 mL
dH ₂ O	980 mL

<u>DNA agaroz jel</u>	<u>100mL için</u>	<u>Son Konsantrasyon</u>
Agaroz	1.2 g	%1.2
1X TAE	100mL	
SafeView DNA boyası*	5 uL	%5

* Agaroz, TAE ile karıştırılıp kaynatıldı. Beher soğuk su altında biraz soğutulduktan sonra DNA boyası belirtilen oranlarda eklendi ve jel tanka döküldü.

3.6.3 Yöntemler

3.6.3.1 Hücre kültürü

MCF-7 hücreleri DMEM, SK-BR-3 hücreleri McCoy's 5A, hibridoma hücreleri ise RPMI-1640 besi yerinde büyütülmüştür. Tüm besi yerleri %10 FBS, %1 P/S, %1 NEAA ve %1 L-Glutamin ile desteklendikten sonra kullanılmıştır. Tüm hücreler 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde büyütülmüştür. Hücreler canlıyken üzerinde çalışılan yöntemlerin hepsi biyogüvenlik seviye 2 kabini altında yapılmıştır ⁶.

3.6.3.1.1 Hücrelerin açılması

1. Hücrelerin bulunduğu krayotüp sıvı nitrojen tankından alındı ve hızlıca su banyosunda 37°C'de ısıtıldı.
2. Tüpün içerisindeki hücre süspansiyonu çözüldüğünde önceden 9 mL besi yeri konulmuş 15mL falkon tüpün üzerine yavaş yavaş eklendi.
3. Hücreler, 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti 1 mL besi yerinde çözdürüldü ve 4mL besi yeri konulmuş 25 cm² filtreli flaska aktarıldı. Hücrelerin flask yüzeyine yayılması için nazikçe sağ-sol ve yukarı-aşağı yönünde sallandı *.

5. Flask inkübatöre konuldu. Hücrelerin yüzeye tutunmasına bağlı olarak 24-48 saat sonra hücrelerin ortamı değiştirildi. Hücreler %80 doluluk oranına ulaştığında pasajlandı (bakınız yapışkan hücrelerin pasajlanması).

* Hibridoma hücreleri süspansiyon halinde büyüdüğü için santrifügasyon sonrası süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından sonra hücre peleti 1mL besi yerinde çözülüp 9mL besi yeri içeren 25 cm² filtresiz flaska aktarıldı. Flask inkübatöre dik pozisyonda konuldu ve kapağı hava akışı için hafifçe gevşetildi. Hücre besi yeri sarıya dönmeye başladığında hücreler pasajlandı (bakınız süspanse hücrelerin pasajlanması)⁶.

3.6.3.1.2 Hücrelerin pasajlanması

3.6.1.2.1 Yapışkan(Adheziv) hücrelerin pasajlanması

1. Hücre besi yeri uzaklaştırılıp hücreler steril 5-10 mL PBS ile yıkandı.
2. %0.25Tripsin-EDTA hücre yüzeyini kaplayacak şekilde hücrelerin üstüne verildi (25 cm² flask için 500uL, 75 cm² flask için 1mL).
3. İnkübatörde hücreler yüzeyden ayrışana kadar tutuldu.
4. Toplamda 10mL hücre süspansiyonu olacak şekilde besi yeri ile hücreler toplandı. Nazik pipetleme ile hücrelerin birbirinden ayrışması sağlandı.
5. Hücre hattına bağlı olarak 1/2 -1/10 hücre süspansiyonu toplam hacmi 10 ml olacak şekilde yeni besi yeri içeren 75 cm² flaska aktarıldı.
6. Flask inkübatöre konuldu. Hücrelerin yüzeye tutunmasına bağlı olarak 24-48 saat sonra hücrelerin ortamı değiştirildi. Hücreler %80 doluluk oranına ulaştığında tekrar pasajlandı.

3.6.3.1.2.2 Süspanse hücrelerin pasajlanması

1. Hücreler pipetaj ile homojen hale getirildikten sonra 1/2-1/5 hücre süspansiyonu toplam hacmi 25 mL olacak şekilde yeni besi yeri içeren 75 cm² flaska aktarıldı
2. Flask inkübatöre dik pozisyonda konuldu ve kapağı hava akışı için hafifçe gevşetildi.
3. Hücre besi yeri sarıya dönmeye başladığında hücreler tekrar pasajlandı⁶.

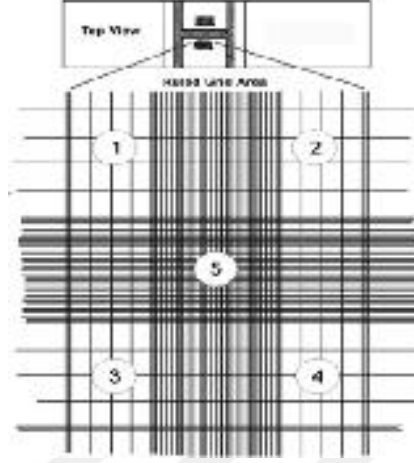
3.6.3.1.3 Hücrelerin dondurulması

1. Yapışkan hücrelerin pasajlanması bölümünde anlatıldığı gibi hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %0.25Tripsin-EDTA ile kaldırılıp, toplandı. Süspansiyon hücreler ise pipetaj ile homojen hale getirildikten sonra falkon tüpüne aktarıldı.
2. Bu aşamadan sonra yapışkan ve süspansiyon hücreler için protokol aynı şekilde uygulandı.
3. Hücreler, 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti miktarına ve hücre tipine bağlı olarak eklenen hücre dondurma ortamında (% 90 FBS+% 10 DMSO) çözündürülüp belirlenen krayotüplere 1mL dağıtıldı.
5. Tüpler 2 saat -20°C'de ve bir gece -80°C'de tutulduktan sonra daha uzun saklama için sıvı nitrojen tankına transfer edildi ⁶.

3.6.3.1.4 Hücre sayımı

1. Hücre besiyeri uzaklaştırılıp hücreler steril 5-10 mL PBS ile yıkandı. Süspansiyon hücreler ise pipetaj ile homojen hale getirildi.
2. %0.25Tripsin-EDTA hücre yüzeyini kaplayacak şekilde yapışkan hücrelerin üstüne verildi (25 cm² flask için 500uL, 75 cm² flask için 1mL).
3. İnkübatörde yapışkan hücreler yüzeyden ayrışana kadar tutuldu.
4. Toplamda 10mL hücre süspansiyonu olacak şekilde besiyeri ile hücreler toplandı. Nazik pipetleme ile hücrelerin birbirinden ayrışması sağlandı.
5. Bu aşamadan sonra yapışkan ve süspansiyon hücreler için protokol aynı şekilde uygulandı.
6. Önceden hazırlanan 100uL trypan mavisi ve 100uL PBS içeren tüpe 100 uL hücre süspansiyonu konularak hücre sayma solüsyonu hazırlandı.
7. Hücre sayma solüsyonu pipetaj ile iyice karıştırıldıktan sonra 10uL Neubauer lamının her iki tarafına da konuldu.
8. Şekil 3'te gösterildiği gibi hemositometrenin ortasında, üst ve alt tarafta bulunan kare alanlara hücre sayma solüsyonu konuldu
9. Şekil 3'teki her iki tarafta beşerden toplamda on farklı alanda bulunan canlı parlak hücreler sayıldı. (Toplam sayılan hücre sayısı/sayılan alan

sayısı) $\times 10^4$ dilüsyon faktörü ile hemositometrik olarak hücre süspansiyonunun 1mL'indeki yaklaşık hücre sayısı hesaplandı ⁶.



Şekil 3. Hücre sayımında mikroskop altında hemositometride gözükten alanlar. İşaretli beş farklı alanda bulunan hücreler hemositometrinin hem üstteki hem de alttaki kare alanı için sayıldı.

3.6.3.1.5 Hibridoma hücrelerinden pelet ve antikor eldesi

1. Hücreler pipetaj ile homojen hale getirildikten sonra falkon tüpe aktarılıp 1500rpm'de 5-10 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatant yeni bir falkona aktarıldıktan sonra immunofloresans deneyinde primer antikor olarak kullanılmak üzere -20°C ' saklandı.
3. Hücre peleti steril PBS ile çözdürülüp yıkandıktan sonra 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti RNA izolasyonunda kullanılmak üzere -80°C ' saklandı veya taze olarak kullanıldı ⁶.

3.6.3.2 İmmünofloresan

1. Hücrelerin ekileceği lamel içeren kuyucuklu plate'i hazırlamak için lameller kuyucuklara konulduktan sonra %70 etanol ile yıkandı.
2. Sonrasında etanolu uzaklaştırmak için 2 kere PBS ile yıkandı.

3. Lameller kuruduktan sonra hücreler hücre sayımı bölümünde anlatıldığı gibi sayıldıktan sonra kuyucuklara dağıtıldı. Hücrelerin eşit olarak dağılması için plate dikkatli bir şekilde yukarı-aşağı sağ-sol yönünde sallandı.
4. Hücreler plate'e ekildikten 48 saat sonra (%70-80 yoğunluğa ulaşıncaya) besi yeri uzaklaştırıldı.
5. İki kere PBS ile yıkandı.
6. %2 formaldehit ile oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi.
7. Sonrasında bir kere ddH₂O ve bir kere de PBS ile yıkandı.
8. Hücre membranını geçirgen yapmak için 5 dakika %0.1 PBS-Triton-X ile çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
9. Sonrasında 3 kere 3 dk. PBS ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı.
10. Hücreler, %10 FBS içeren bloke etme solüsyonuyla 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
11. Bloke etme solüsyonu aspire edildikten sonra PBS-T ile 5 dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandı.
12. Sonrasında 3.6.3.1.5 bölümünde elde edilen primer antikörlerin 200-250uL ile 2 saat inkübe edildi. Pozitif kontrol için kullanılan ErbB2 antikoru PBS-T içerisinde 1:50 dilüsyon yapılarak toplamda 150 uL ilgili kuyucuğa konuldu.
13. Sonrasında 3 kere 5 dk. PBS-T ile çalkalayıcıda yıkandı.
14. Sekonder antikör PBS-T ile 1:500 oranda seyreltikten sonra ve hücreler 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde karanlıkta inkübe edildi.
15. Sonrasında 3 kere 5 dk. PBS-T ile çalkalayıcıda yıkandı.
16. DAPI boyaması ile DNA boyaması için hücreler 1dakika, 100-120uL 100 ng/ml DAPI ile oda sıcaklığında bekletildi.
17. ddH₂O ile yıkandı.
18. Kuyucuklara tekrar ddH₂O koyulduktan sonra floresan birleştirme ortamı(mounting medium) ile hücreler lamlara kapatıldı.
19. Floresan mikroskop altında inceleme yapıp fotoğraflar çekildi ⁶.

3.6.3.3 RNA izolasyonu

3.6.3.3.1 Macherey-Nagel nucleospin RNA kiti ile izolasyon

1. İzolasyon sırasında RNA ile temas eden tüm tüpler önceden %0.1 DEPC ile muamele edilmiş suda bir gece bekletildi ve otoklavlandıktan sonra kullanıldı.
2. Çalışma alanı ve pipet, tüp tutucu gibi kullanılacak malzemeler deneye başlamadan önce Rnase Away ile silindi.
3. Hücre peleti taze olarak veya -80°C'den alınıp 350uL+ 3.5 uL RA1 tamponu ile liziz edildi.
4. Şırınga iğnesi ile homojenize edildikten sonra karışım filtre(mor) üstüne eklenip 11.000g'de 1 dk. santrifüj edildi.
5. Filtreden geçirilmiş lizata 350 uL %70 etanol eklenip 5 kere pipetleme yapılarak homojen hale getirildi.
6. Lizat filtre(mavi) üstüne konulup 11.000g'de 30 sn'ye santrifüj edildi.
7. Filtre membranını tuzdan arındırmak için 350 MBD tamponu filtre üstüne eklenip 11.000g'de 1 dk. santrifüj edilip filtre membranı 1 dk. kurumaya bırakıldı.
8. Sonrasında membran üstüne 95uL rDNase ve reaksiyon tamponu karışımından (90uL rDNase reaksiyon tamponu ve 10uL rDNase) eklenip 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
9. Membran yıkama aşamaları için ilk önce 200 uL RAW2 eklenip 11.000g'de 30 sn. santrifüj edildi.
10. Sonra 600uL RA3 eklenip 11.000g'de 30 sn. santrifüj edildi.
11. Son olarak da 250uL RA3 eklenip 11.000g'de 2 dk. santrifüj edildi.
12. RNA'yı membrandan ayırmak için 50uL RNase free su konulup 11.000g'de 1dk santrifüj edildi.
13. Membrandan geçip nükleaz free tüpün içine biriken solüsyondaki RNA konsantrasyonu NanoDrop ile ölçüldü. RNA -80°C'de saklandı³⁹.

3.6.3.3.2 Manual RNA izolasyonu

1. İzolasyon sırasında RNA ile temas eden tüm tüpler önceden %0.1 DEPC ile muamele edilmiş suda bir gece bekletildi ve otoklavlandıktan sonra kullanıldı.
2. Çalışma alanı ve pipet, tüp tutucu gibi kullanılacak malzemeler deneye başlamadan önce RNase Away ile silindi.

3. Hücre peleti taze olarak veya -80°C 'den alınıp üzerine 1 mL TRIzol (TRIzol reaktif) konularak pipet ile al-ver yapıp homojenize edildikten sonra 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Üzerine 200 uL kloroform eklendikten sonra 2-3 dk. inkübe edildi.
5. İnkübasyon bittikten sonra 12.000g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk. santrifüj edildi.
6. Santrifügasyon sonucunda üstte bulunan sulu faz(aqueous) yeni bir tüpe transfer edildi.
7. Alınan sulu faz hacmiyle aynı miktarda isopranoöl üstüne eklenip karıştırıldı.
8. Solüsyon bir gece -20°C 'de bekletildi.
9. Ertesi gün hafif vortekslendikten sonra 12.000g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10dk. santrifüj edildi.
10. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet üstüne 1mL %70 etanol eklenerek tüp yavaşça çalkalandı.
11. Örnek 7.500g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk. santrifüj edildi
12. Basamak 8'deki gibi yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra 7.500g'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dk. santrifüj edildi.
13. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pelet in bulunduğu tüp 20-25 dk. ters çevrili bir şekilde kurumaya bırakıldı.
14. 40-50uL RNase free su konulup pelet çözdürüldükten sonra RNA konsantrasyonu NanoDrop ile ölçüldü. RNA -80°C 'de saklandı⁴⁰.

3.6.3.4 RNA miktarının ölçülmesi

1. İzole edilen RNA'lardan 1uL alınarak NanoDrop'da konsantrasyon ve saflıkları 260nm ve 280nm'deki absorbanlarına bakarak spektrofotometrik olarak saptandı.
2. A260/A280 oranından faydalanarak RNA saflık değerleri elde edildi. RNA'ların saflıklarının yaklaşık 2.0 olmasına dikkat edildi⁴¹.

3.6.3.5 Formaldehit agaroz jel ile RNA'nın görüntülenmesi

1. Jel, son konsantrasyonu %1.2 agaroz, %1.2 formaldehit, 1X MOPS tamponu, %5 SafeView yeterli miktarda %0.1 DEPC-muamele edilmiş steril su RNA jel solüsyonu bölümünde belirtildiği gibi hazırlandı.

2. Jel tanka dökülüp kuyucuk oluşumu için tarak yerleştirildikten sonra kurumaya bırakıldı.
3. Jel kuruyunca 2.5ug RNA, nükleaz-free su ve 6X jel yükleme tamponu ile karıştırılıp jele yüklendi. Örneğin NanoDrop'da ölçülen RNA konsantrasyonu 764,9 ng/uL ise 2.5ug RNA için (2.5ug/0.764ug/uL hesabından) 3.3 uL RNA, 1.7 uL nükleaz free su ve 1uL 6X jel yükleme tamponuna ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi.
4. 80V'da yaklaşık bir saat yürütüldükten sonra RNA'lar UV saptaması ile görüntülendi.
5. RNA bütünlüğü ve kararlılığı yoğun 18S ve 28S rRNA bantlarının elde edilmesi ile onaylandı ⁴².

3.6.3.6 Revers Transkriptaz(RT) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

1. RNA'dan komplementer DNA (cDNA) yapmak için Thermo Scientific "Revertaid First Strand cDNA Synthesis" kiti kullanıldı.
2. Nükleaz free su, 1ug RNA ve 10pmol/uL revers primer (2uL) toplamda 12 uL olacak şekilde PCR tüpünün içine konuldu. Örneğin 800ng/uL RNA konsantrasyonu ölçülmüş bir örnek için => 8.75uL nükleaz free su,1.25uL RNA, 2uL revers primer kullanıldı. Tüpe yavaşça vurarak içerisindekiler karıştırıldı ve tüpe kısa bir döndürme yapıldı.
3. Örnekler 65°C'de 5 dakika inkübe edildi.
4. Sonrasında üzerine: 4uL 5X reaksiyon tamponu +1 uL RNase inhibitörü(20U/uL) + 2 uL 10mM dNTP karışımı+1 uL Revertaid revers transkriptaz=8 uL toplamda eklenip nazikçe karıştırıldı ve örnekler kısa bir döndürme yapıldı.
5. Örnekler 42°C'de 60 dakika ve bunu takiben 70°C'de 5 dakika inkübe edildi.
6. cDNA bir hafta içerisinde kullanılacaksa -20°C'de yoksa -80°C'de saklandı ⁴³.

3.6.3.7 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

1. PCR, Biorline MyTaq polimeraz kiti ve Novagen primerleri ile kılavuzlarına uygun olarak yapıldı. Aşağıda Tablo 5'te PCR için gereken malzeme ve miktarları, Tablo

6'da ise hem RT-PCR'da hem de PCR'da kullanılan primerlerin sekansları verilmiştir.

2. Tablo 5'te belirtilen miktarda malzemeler buz üzerinde çalışılarak 0.2mL'lik tüplere konuldu.
3. Tüpler, iyice kapatıldıktan sonra tüplerin dibine hafif dokunuşlar ile vurularak karıştırıldı.
4. Örnekler kısa döndürüldükten sonra (spin) Tablo 5'te optimize edilmiş sıcaklık ve süre ile polimeraz zincir reaksiyonunun denatürasyon, bağlanma ve uzama basamakları uygulandı.

Tablo 5. PCR için kullanılan malzeme miktarları ve optimum çalışma koşulları

Malzeme	Miktar	PCR koşulları
Nükleaz free su	16,2uL	İlk denatürasyon: 5dk. 98°C
5X MyTaq Tampon	5uL	Denatürasyon: 1dk. 98°C
Polimeraz	0.125	Bağlanma: 1dk. 50/60°C
cDNA	2.5uL	Uzama: 2 dk. 72°C
İleri Forward primer	1.25uL	Son uzama: 6dk. 72°C
Toplam:	25uL	Döngü sayısı: 35

Tablo 6. RT-PCR ve PCR'da kullanılan spesifik primerler. *AA ve AT, hafif zincir A primerinin sekasına bakılarak tasarlanmış primerlerdir. B = C veya G veya T, D = A veya G veya T, H = A veya C veya T, I = inozin, K = G veya T, M = A veya C, R = A veya G, S = C veya G, V = A veya C veya G, W = A veya T, Y = C veya T

IgG Ağır Zincir Primerleri	İleri (Forward) Sekans(5'-3')	Revers Sekans (5'-3')
A	GGGAATTCATGRASTTSKGGYTMARCTKGRTTT	CCCAAGCT TCCAGGG RCCA
B	GGGAATTCATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT	
C	ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCT ACTAGTCGACATGGCTGTCTYTRGBGCTGYTCYTCTG ACTAGTCGACATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCTATTCTT	
D	ACTAGTCGACATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT	

	ACTAGTCGACATGGRCAGRCTTACWTYYYTCATTCCCT ACTAGTCGACATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT	
E	ACTAGTCGACATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT ACTAGTCGACATGGRATGGASCKKIRTCTTTMTCT	
F	ACTAGTCGACATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRTTT ACTAGTCGACATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT ACTAGTCGACATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	
Kappa Hafif Zincir Primerleri	Forward Sequence(5'-3')	Reverse Sequence(5'-3')
A	GGGAATTCATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT	CCCAAGCT TACTGGAT GGTG
AA*	GGGAATTCATGGAGACACA	
AT*	GGGAATTCATGGAGTCACA	
B	GGGAATTCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	
C	ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGG T	
D	ACTAGTCGACATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWT CTT ACTAGTCGACATGGGCWTCAAGATGRAGTCACAKWYYC WGG	
E	ACTAGTCGACATGAGTGTGCYCACTCAGGTCCTGGS GTT ACTAGTCGACATGTGGGGAYCGKTTYAMMCTTTTCAAT TG ACTAGTCGACATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	
F	ACTAGTCGACATGAGIMMKTCIMTTCAITTCYTGGG ACTAGTCGACATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG ACTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG ACTAGTCGACATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	
G	ACTAGTCGACATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT ACTAGTCGACATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG	

3.6.3.8 Agaroz jel ile DNA'nın görüntülenmesi

1. Jel, son konsantrasyonu %1.2 agaroz, %5 SafeView ve yeterli miktarda 1X TAE DNA jel solüsyonu bölümünde belirtildiği gibi hazırlandı.
2. Jel tanka dökülüp kuyucuk oluşumu için tarak yerleştirildikten sonra kurumaya bırakıldı.

3. Jel kuruyunca PCR örneğinden 5uL alınıp, 1uL 6X jel yükleme tamponu ile karıştırılıp jele yüklendi.
4. 80V'da yaklaşık bir saat yürütüldükten sonra DNA'lar UV deteksiyonu ile görüntülendi.
5. Pozitif olan örnekler sekanslanmaya gönderildi.

3.6.3.9 Sekanslama/Analiz

1. PCR örnekleri DNA purifikasyon sonrası Sanger methodu ile dizi analizi için firmaya gönderildi.
2. In siliko olarak elde edilen sekans analizinin güvenilirliği okuma eğrilerine bakılarak kontrol edildi.
3. Farklı zamanlarda elde edilen DNA dizilerinin incelenmesi için CLC, Finch Tv programları kullanıldı. Dizilerin benzerliğine bakılması için Clustal Omega sekans hizalama aracı kullanıldı ⁴⁴.
4. Fareye ait DNA dizileri, NCBI ORF finder veritabanı ile amino asit dizisine çevrildikten sonra NCBI Blast, Immunogenetics (IMGT) biyoinformatik veritabanları ve Kabat numaralandırması ile dizilerdeki hedef antikora özgü olan komplementer belirleyici bölgeler (CDR) belirlendi ⁴⁵⁻⁴⁸.
5. Analizlerin nasıl yapıldığı, veri kaynakları üzerinden anlatılarak bulgular bölümünde daha detaylı olarak verilmiştir.

3.7 Araştırma Planı ve Takvim





3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmada belirtilen tüm deneyler en az iki kere tekrarlandı ve tutarlılıkları incelendi. Sonuçların literatür ve ürün klavuzları ile örtüşüp örtüşmediği değerlendirildi. DNA dizi analizi için okumanın kalitesi ve verilerin yorumlanabilmesi için Finch TV, CLC programları kullanıldı. Dizilerin anlamlandırılması ve karşılaştırılması için NCBI Blast, IMGT ve Clustal Omega biyoinformatik veri tabanlarından yararlanıldı ⁴⁶⁻⁴⁸.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmada RNA izolasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu, immunohistokimya gibi moleküler biyolojik yöntemler için kitlerin klavuzları ve bilimsel yayınlardan yararlanıldı. Bunu yanı sıra bu teknikler grubumuzda yıllardır başarılı bir şekilde uygulandığı için büyük sorun çıkması beklenmedi.

DNA dizi analizi için teknolojinin yetersiz olması sebebiyle sekanslama işlemi yetkinliği kanıtlanmış, geçerliliği olan bir firmaya yaptırıldı. Analizin doğruluğu farklı

zamanlarda yapılan okumalarla geçerli kılındı. Başarılı bir sonuç elde edilememesi durumunda farklı bir firma veya yöntem tercih edilmesi planlandı.

Araştırma, hücre ile çalışılması sebebiyle etkinliği, in vitro olarak sınırlıdır.

3.10 Etik Kurul Onayı

Araştırma için, 03.11.2016 tarihinde Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay kararı alınmıştır (Karar No:2016/28-29). Belge eklede sunulmuştur.

Araştırma, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü (iBG-İzmir) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Kurum onayı eklede sunulmuştur.

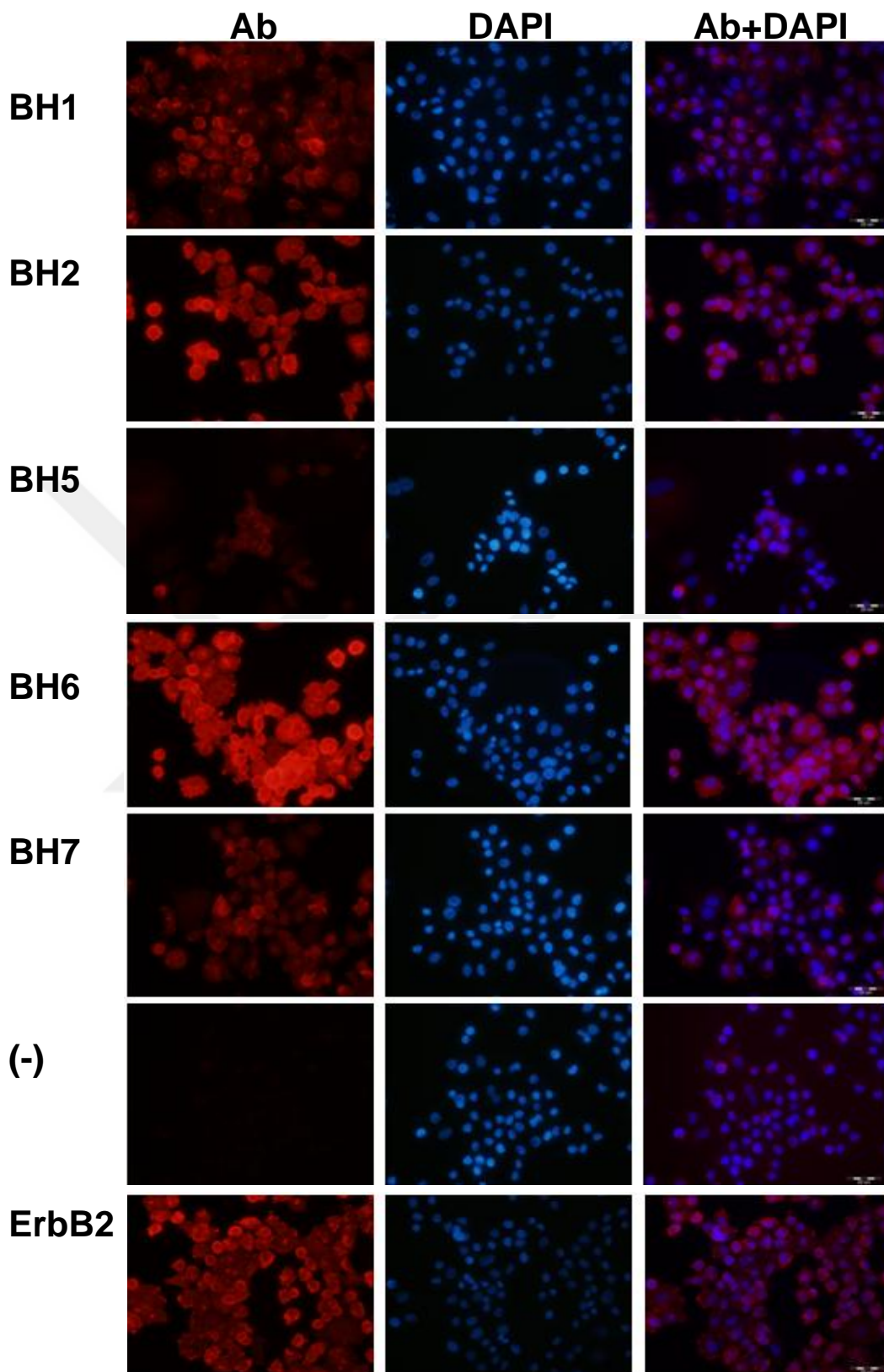
4. BULGULAR

4.1 HER2 Amplifikasyonu Olan Meme Kanseri Hücre Hattında Antikorları Reaktifliğinin Tayini

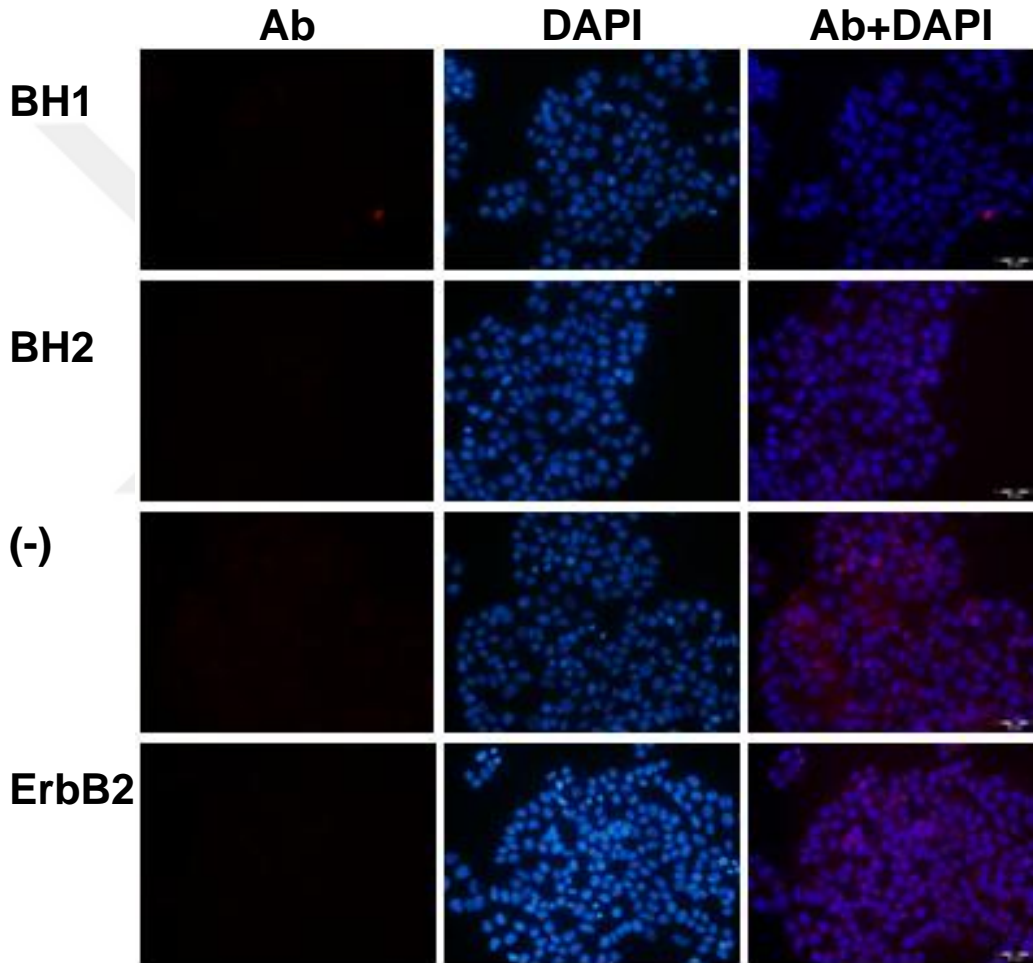
Grubumuzun daha önce yapmış olduğu çalışmalar sonucunda, HER2 antijenine karşı özgün antikor üreten BH1, BH2, BH5, BH6 ve BH7 olarak adlandırdığımız beş tane hibridoma klonu bulunmaktadır. Bu klonların ürettiği antikorlar çoğaltıldıkları besi yerinde fazlaca mevcuttur. Bu antikorların HER2'yi özgün olarak tanıdığını göstermek için HER2'yi fazlaca ifade eden SK-BR-3 ve HER2 pozitif fakat amplifikasyonu olmayan MCF-7 meme kanseri insan hücre hatlarında immünofloresan (IF) deneyleri yapılmıştır.

Antikorların bulunduğu ortamdan alınan örnekler primer antikor olarak kullanılırken, IgG ağır ve hafif zincirini tanıyan fare antikoru sekonder olarak kullanılmıştır. Kontrol grupları için primer antikor olmadan sadece sekonder antikor ile IF yapılmıştır. Diğer bir kontrol grubunda ise piyasada var olan HER2 (ErbB2) spesifik antikor, primer olarak kullanılmıştır.

Şekil 4'te gösterildiği gibi, SK-BR-3 hücrelerinde BH1, BH2, BH6 ve BH7 güçlü sinyal verirken BH5 klonu zayıf sinyal vermektedir. Şekil 5'te görüldüğü gibi BH1 ve BH2 klonu MCF-7 hücre hattında zar zor saptanabilen sinyal vermektedir.



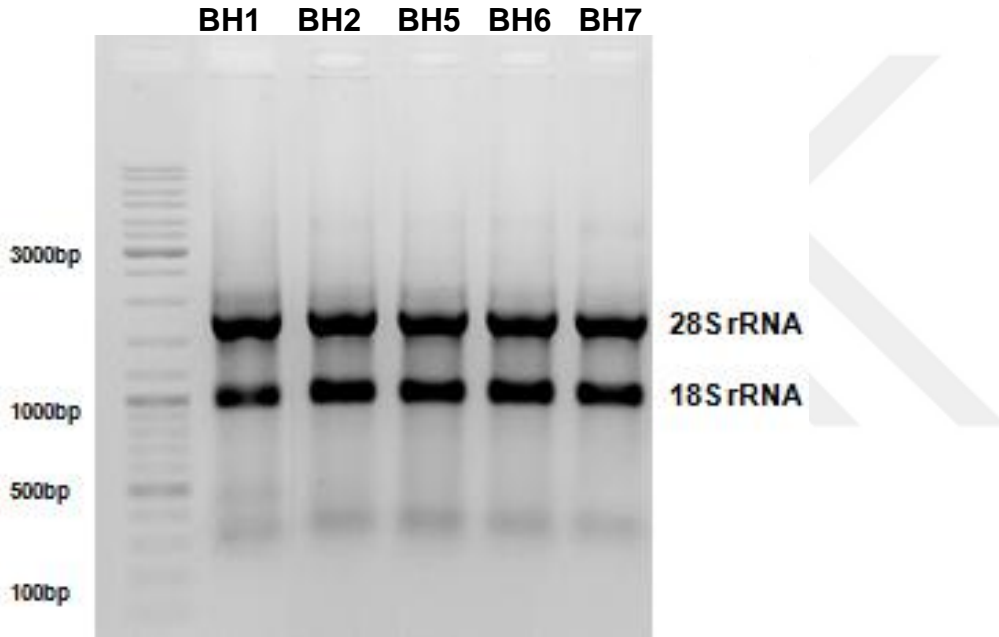
Şekil 4. Antikorların HER2'nin fazla ifade edildiği SK-BR-3 hücre hattında hedefe bağlanması. Antikorların in vitro olarak HER2'ye bağlanmaları IF boyaması ile analiz edildi. Hibridoma klonlarından(BH olarak adlandırıldı) alınan antikorlar(Ab) formaldehit ile fikse edilmiş hücrelere uygulandı. Primer antikor bağlanması Alexa 568 birleşik IgG fare antikoruna ile saptandı (ilk sütun, kırmızı). (-): Primer antikor kullanılmadı. ErbB2: HER2 spesifik ticari monoklonal antikor. Çekirdek DAPI ile karşıt boyandı (orta sütun, mavi). Antikor ve DAPI birleştirilmiş görüntüsü (Ab+DAPI sütünü).



Şekil 5. Antikorların HER2 pozitif MCF-7 hücre hattında hedefe bağlanması. Antikorların in vitro olarak HER2'ye bağlanmaları IF boyaması ile analiz edildi. Hibridoma klonlarından(BH olarak adlandırıldı) alınan antikorlar(Ab) formaldehit ile fikse edilmiş hücrelere uygulandı. Primer antikor bağlanması Alexa 568 birleşik IgG fare antikoruna ile saptandı (ilk sütun, kırmızı). (-): Primer antikor kullanılmadı. ErbB2: HER2 spesifik ticari monoklonal antikor. Çekirdek DAPI ile karşıt boyandı (orta sütun, mavi). Antikor ve DAPI birleştirilmiş görüntüsü (Ab+DAPI sütünü).

4.2 BH Hibridoma Klonlarından İzole Edilen RNA'ların Kararlılığına ve Bütünlüğüne Bakılması

Klonların ürettikleri antikorların aktifliğine bakıldıktan sonra, hibridoma hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'lar spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra formaldehit-agaroz jelde kararlılıkları ve bütünlükleri tayin edildi. İzole edilen RNA örneklerinde 18S ve 28S rRNA, herhangi bir genomik DNA kontaminasyonu olmadan temiz bir şekilde saptandı.



Şekil 6. RNA'nın %1.2 agaroz-formaldehit jel ile görüntülenmesi.

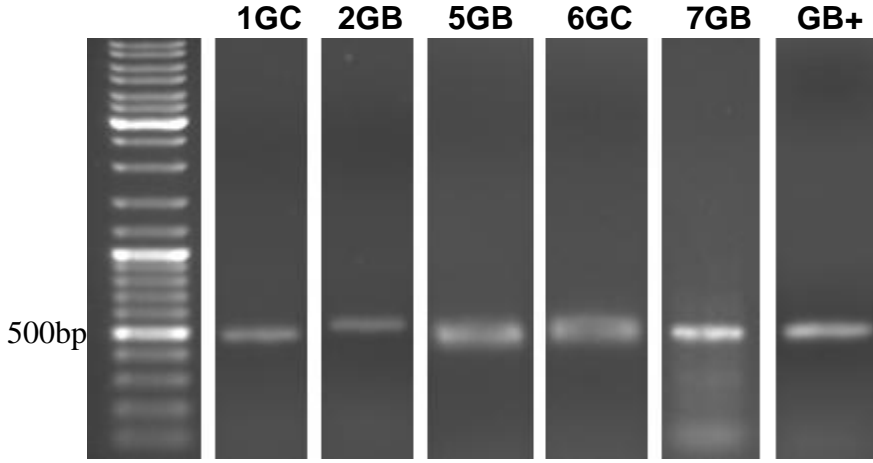
4.3 İmmüoglobulin Değişken Bölgelerinin Çoğaltılması

Bu aşamada elde ettiğimiz RNA'ları kullanarak RT-PCR yöntemi ile komplementer DNA (cDNA) devamında PCR ile cDNA'lar amplifiye edildi. RT-PCR ve PCR, ticari olarak piyasada bulunan immüoglobulin ultra değişken bölgeleri (CDR), çoğaltan primerlerle yapıldı. Primerlerin, ultra değişken bölgelere bitişik korunmuş immüoglobulin alanından tanıyarak reaksiyona başlayıp yaklaşık olarak 500bp'lik ampikon üretmeleri hedeflendi. Ağır zincir için altı farklı dejenere

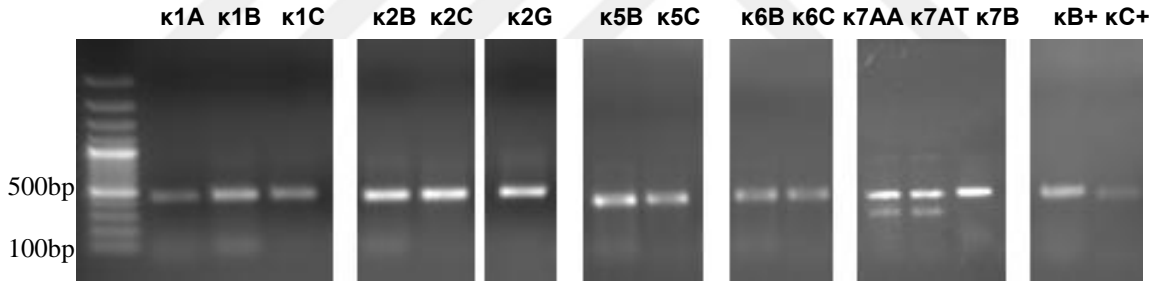
forward(ileri) primer (A-F) ile bir tane revers(geri) primer(A-G) kullanıldı. Hafif zincir için ise 7 farklı dejenere forward(ileri) primer ile bir tane revers(geri) primer kullanıldı. RT-PCR direk revers primerler kullanılarak yapılırken cDNA forward primerlerin hepsi ile amplifiye edildi. Şekil 7 ve 8’de amplifikasyon veren bantların agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Bundan sonra PCR ürünleri sekanslarının adlandırılmasında bu primerler de kullanılacağı için Tablo 7’de hibridoma klonlarının hangi primerler ile pozitif bant verdiği özetlenmiştir. Amplifikasyon elde edilen bu dejenere primerlerin dizileri PCR yöntemi bölümünde verilmiştir.

Tablo 7. Hibridoma klonlarının pozitif bant verdiği ağır ver hafif zincir primerler.

Hibridoma Klonu	PCR sonucu	
	IgG ağır zincir primerleri	Kappa hafif zincir primerleri
1	C	A,B,C
2	B	B,C,G
5	B	B,C
6	C	B,C
7	B	A,B



Şekil 7. Hibridoma klonlarında immünoglobulin ağır zincir değişken bölgelerinin PCR ile amplifikasyon %1.2 agaroz jel görüntüsü. Sayılar hibridoma klon numarasını, G IgG ağır zinciri, harfler ise ağır zincir primerlerini simgelemektedir. GB+: Ağır zincir B primeri için taslak DNA amplifikasyonu, pozitif kontrol.



Şekil 8. Hibridoma klonlarında immünoglobulin hafif zincir değişken bölgelerinin PCR ile amplifikasyon %1.2 agaroz jel görüntüsü. κ : Kappa hafif zincir, sayılar hibridoma klon numarasını, harfler ise hafif zincir primerlerini simgelemektedir. κ B+ ve κ C+: Hafif zincir B ve C primeri için taslak DNA amplifikasyonu, pozitif kontrollere.

4.4 Ağır ve Hafif Zincir Değişken Bölgelerin Sekanslanması

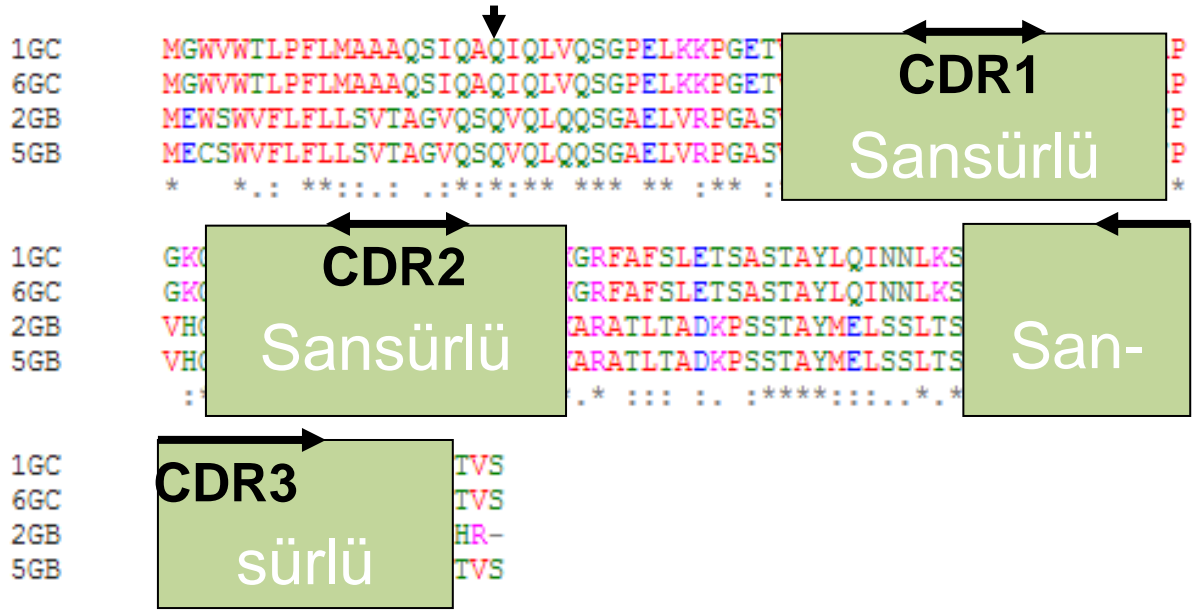
Bir önceki, immünoglobulin değişken bölgelerinin çoğaltılması kısmında şekillerde gösterildiği gibi amplifikasyon elde ettiğimiz örnekler çoğaltıldığı ileri

(forward) ve geri (revers) primerler ile DNA dizi analizine gönderildi. Farklı zamanlarda iki kez Sanger sekanslaması yapılan örneklerin sonuçları yinelendi.

Elde edilen sekans sonuçlarının ABI kromatogram formatında olanları, Finch TV programı ile analiz edildi. Okuma eğrilerinin düzgün, birbirlerinden rahatlıkla ayırt edilebilen, belirli bir nükleotid için tepe oluşturup oluşturmadığına bakıldı. Yaklaşık olarak 30-50 bazdan itibaren temiz, belirgin nükleotid tepeleri vermeye başladığı için DNA dizileri bu sıradan itibaren seçildi. BH7 klonunun ağır ve hafif zincirleri için temiz sekans sonucu elde edilemedi. Diğer klonlar için ise farklı zamanlarda elde edilen aynı örneklere ait DNA dizileri karşılaştırıldı. Geri primer ile elde edilen DNA dizisi, ileri primer ile okunan diziler ile karşılaştırılması için QIAGEN Bioinformatics, CLC programı ile revers komplementer hale çevrildi. Karşılaştırılan DNA dizilerin amino asit sekansını değiştirici herhangi bir nükleotid farklılığı içermediği tespit edildi (veri gösterilmedi).

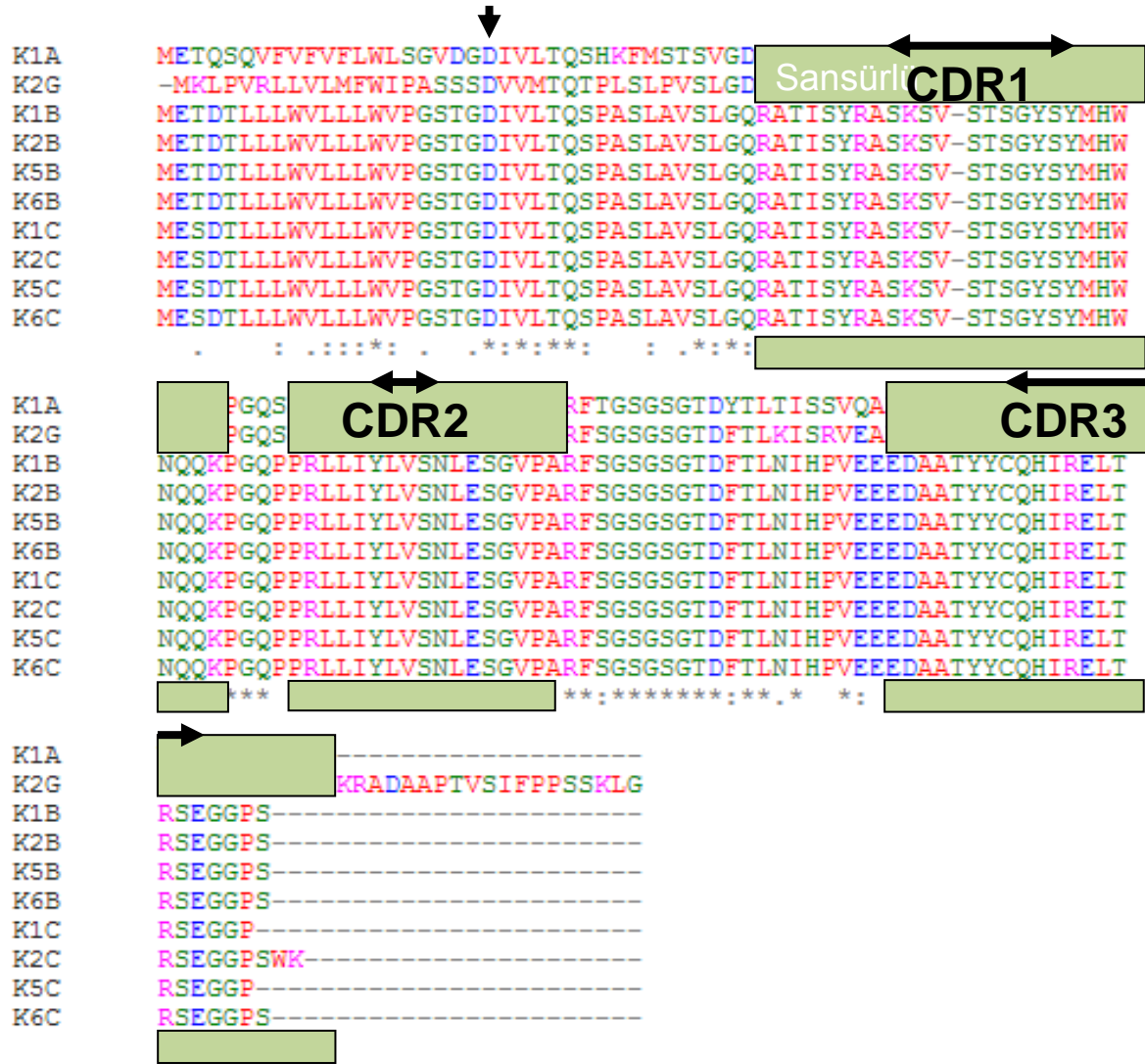
Tutarlılıkları doğrulanan DNA dizilerinin, NCBI "ORF(open reading frame) Finder" veritabanı üzerinde en uzun diziyi oluşturan ORF seçilerek, amino asit sekansları elde edildi ⁴⁵. Şekil 9'da gösterildiği gibi immünoglobulin ağır zincirleri için klonların amino asit dizileri Clustal Omega aracı ile hizalandırıldı.

HER2'yi özgün olarak tanımasında önemli olan bölgeler belirlendi. Bu alanlar genel bilgiler bölümünde de anlatıldığı gibi komplementer belirleyici bölge (CDR, complementarity determining region) olarak adlandırılmaktadır ^{11,12}. Antijen bağlanmasını belirleyen asıl bölgedir ve immünoglobulinin, değişken ağır zincirinde üç tane ve değişken hafif zincirinde üç tane olmak üzere toplamda altı tane CDR'si vardır ⁹. DNA dizileri girdi olarak kullanılarak antikorun CDR bölgeleri, NCBI IgBlast ve Immunogenetics biyoinformatik (IMGT) araçları aracılığıyla belirlenmiştir. Şekil 9 üzerinde immünoglobulin ağır zincirlerinde CDR1, CDR2 ve CDR3 dizilerinin bulunduğu alanlar yatay oklar ile gösterilmiştir. Antikora özgünlüğünü veren sekanslar olduğu için CDR ve bu bölgeye komşu diziler, ileride patent başvurusu yapılacağı için gizli tutulmuş ve sansürlenmiştir.



Şekil 9. HER2 özgün antikorların ağır zincir değişken bölgelerinin amino asit dizisi. Sekanslar, Clustal Omega Multiple Sequence Alignment ile bir araya getirilip hizalandı. Dizi adlarındaki sayılar hibridoma klon numarasını, G IgG ağır zinciri, harfler ise ağır zincir primerlerini simgelemektedir. Dik ok antikor ağır zincir değişken bölge dizisinin başladığı bölgeyi göstermektedir. Yatay okla gösterilen bölgeler antikorun ağır zincirinin HER2'ye bağlanmasından sorumlu komplementer belirleyici bölgelerdir (CDR, complementarity determining region). Küçük ve hidrofobik amino asitler (AVFPMILW) kırmızı, asidik amino asitler (DE) mavi, bazik amino asitler (RK) macenta renginde gösterilmiştir. Hidroksil, sülfhidril, veya amin grubuna sahip amino asitler (STYHCNGQ) yeşil ile kalan diğer amino asitler ise gri ile gösterilmiştir. Verilen dizilerde her bir hizadaki amino asitler birbirleriyle aynı ise yıldız işareti(*), birbirlerine oldukça benzer ise iki nokta(:), birbirlerine az benzer ise nokta işareti (.) ile gösterilmiştir.

Tablo 7'de gösterildiği gibi immunoglobulin hafif zinciri için klonların pozitif sonuç verdiği PCR ürünleri, bu primerlerle Sanger DNA dizi analizine gönderildi. Sonuçlar elde edildikten sonra ağır zincir için yukarıda anlatılan biyoinformatik araçlar, antikorun hafif zincir amino asit diziliminin ve CDR alanlarının belirlenmesi için de kullanıldı. Şekil 10'da immunoglobulin kappa hafif zincir değişken bölge sekansları ve HER2 ile özgün olarak etkileşime girerek antikor-antijen bağlanmasını sağlayan CDR bölgeleri verilmiştir. Patent başvurusu yapılacağı için ağır zincir sekasında olduğu gibi hafif zincir için de bu bölgelerin bazıları sansürlenmiştir.



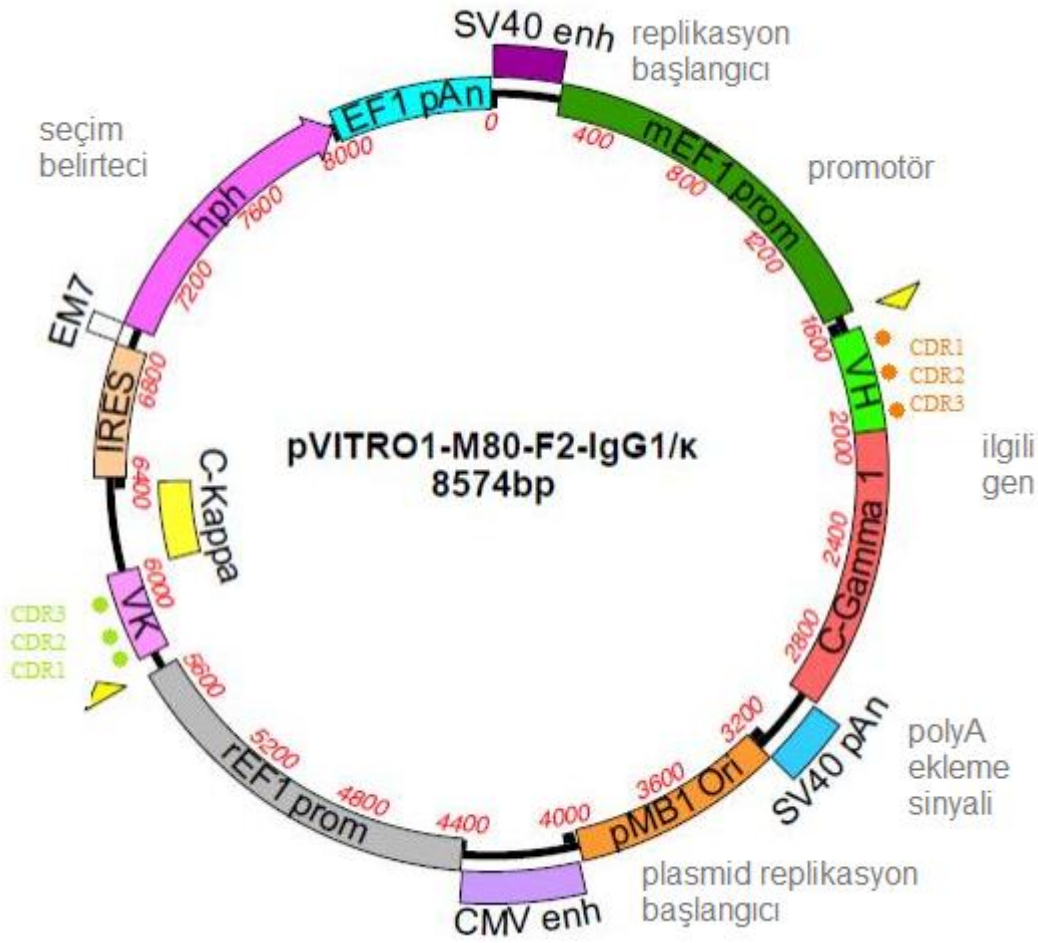
Şekil 10. HER2 özgün antikorların hafif zincir değişken bölgelerinin amino asit dizisi. Sekanslar, Clustal Omega Multiple Sequence Alignment ile bir araya getirilip hizalandı. Dizi adlarındaki sayılar hibridoma klon numarasını, K Kappa hafif zinciri, harfler ise ağır zincir primerlerini simgelemektedir. Dik ok antikor hafif zincir değişken bölge dizisinin başladığı bölgeyi göstermektedir. Yatay okla gösterilen bölgeler antikorun hafif zincirinin HER2'ye bağlanmasından sorumlu komplementer belirleyici bölgelerdir (CDR, complementarity determining region). Küçük ve hidrofobik amino asitler (AVFPMILW) kırmızı, asidik amino asitler (DE) mavi, bazik amino asitler (RK) macenta renginde gösterilmiştir. Hidroksil, sülfhidril, veya amin grubuna sahip amino asitler (STYHCNGQ) yeşil ile kalan diğer amino asitler ise gri ile gösterilmiştir. Verilen dizilerde her bir hizadaki amino asitler birbirleriyle aynı ise yıldız işareti(*), birbirlerine oldukça benzer ise iki nokta(:), birbirlerine az benzer ise nokta işareti (.) ile gösterilmiştir.

4.5 İnsan İmmüoglobulin İfade Vektörü Ön Tasarımı

Genel bilgiler bölümünde anlatıldığı gibi immüoglobulinin ağır ve hafif zincir için belirlenen CDR dizileri farede üretilen antikorun izotipi ile aynı insan antikoruna aktarılması için ön çalışmalar bu bölümde yapılmıştır.

Şekil 11'de gösterilen insan immüoglobulin IgG 1 ağır zincir ve kappa hafif zinciri bir arada ifade eden vektör seçilmiştir. Şekil üzerinde ağır ve hafif zincir dizilerinde (VH, VK) simgelenen CDR1-3, BH antikorlarının antijen tanımda özgün rol oynayan dizimleri ile değiştirildiğinde vektörden ifade edilecek protein HER2'yi spesifik olarak tanıyabilecektir. İmmüoglobulinin geri kalan taslağı insana ait kalırken sadece hedefine bağlanmasında rol oynayan CDR bölgeleri fare kökenli kalacaktır. Böylece antikorlar insanlaştırılacaktır.

Şekilde simgelenen CDR alanları vektör üzerinde altı farklı oligonükleotid dizilerini oluşturmaktadır. Bu diziler bir önceki bölümde anlatıldığı gibi vektör DNA dizisinin girdi olarak kullanıldığı NCBI IgBlast ve IMGT araçları ile belirlendi. Şekil 10 ve 11'de gösterilen klon 1 ağır zincir C (1GC) ve hafif zincir A (K1A) immüoglobulin dizilerinin ürünü olacak antikor incelenmek için örnek olarak seçildi. HER2 özgün fare antikorunun ve şekildeki vektörün DNA dizileri Clustal Omega ile bir araya getirildi (data gösterilmedi). CDR alanlarına denk gelen farklılıklara bakıldı. Ağır ve hafif zincirde üçer olmak üzere toplamda altı farklı CDR dizileri 9-30 nükleotid'den oluşmakta ve fare antikorunun CDR'lerine göre 4-20 nükleotid uyumsuzluk göstermektedir. Şekilde noktalar ile simgelendiği gibi vektör üzerindeki bu diziler, HER2'yi tanınması için özgünlüğü veren fare dizileri ile "site directed mutagenesis" yoluyla değiştirilecektir. Fare antikorunun insanlaştırılması için moleküler teknikler ve hücre deneyleri bu projenin devam çalışması olarak gerçekleştirilecektir.



Şekil 11. İnsan immunoglobulin gamma 1 ağır ve kappa hafif zincirleri(IgG1/ κ) birlikte ifade edebilen memeli ifade vektörü. Şekil üstünde gösterildiği gibi SV40 ve CMV replikasyon başlangıcı; mEF1 prom fare, rEF1 sıçan uzama faktörü 1 alfa promotörü; VH immunoglobulin ağır zincir değişken bölgesi, VK hafif zincir değişken bölgesi; C-Gamma ve C-Kappa ağır ve hafif zincir sabit bölgesi; SV40 ve EF1 pAn polyA ekleme sinyali; pMB1 Ori plasmid replikasyon başlangıcı; IRES ribozom içi giriş bölgesi; hph hygromycin seçim belirteci, EM7 promotörü ⁴⁹ (değiştirilmiştir).

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada, meme kanserinin yaklaşık %20-25'inde görölen HER2'nin fazlaca ifadesine karşı alternatif monoklonal antikor geliştirilmesi amacıyla grubumuz tarafından başlanan çalışmalara devam edilmiştir ^{5,6}. 2012 yılında gelinen noktada beş farklı monoklonal antikorun hedefi HER2'ye yatkınlığı ve hücre proliferasyonunu durdurucu etki gösterdiği bilinmektedir.

Devam niteliğinde olan bu araştırmaya başlarken, ilk önce geliştirilen fare hibridoma klonlarının hala HER2'ye özgü antikor ürettiklerini göstermek için immünofloresan (IF) deneyleri yapıldı. *HER2* geninin kopya sayısının artarak HER2'nin fazlaca ifade edildiği SK-BR-3 ve HER2'nin amplifiye olmadığı MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında antikorların etkinliğine bakıldı ⁶. SK-BR-3 hücrelerinin membran yüzeylerinde fazlaca bulunan HER2 reseptörleri, hibridoma antikorları için antijen görevi göreceğinden etkileşim hedeflendi. Bu basamağın yinelenen bir çalışma olması sebebiyle HER2'nin amplifiye olduğu BT-474 gibi başka hücre hatları ile de çalışılması ilk aşamada gerekli görölmedi ve iki hücre hattı ile deneyler yapıldı. Eğer beklenildiğinin aksine SK-BR-3 hücreleri ile pozitif sinyal alınmazsa diğer hücre hatlarının denenmesi planlandı.

BH1, BH2, BH5, BH6 ve BH7 hibridoma hücreleri ürettikleri antikorları besi yerlerine verdikleri için süspansiyon hücrelerden uzaklaştırdıktan sonra toplanan süpernatantlar IF'de primer antikor olarak kullanıldı. Hibridoma hücreleri elde edilirken bağışıklığı aktiveştirilmiş B lenfosit hücreleri kullanıldığından, HER2 antikoru üretiminin ortamda baskın olması beklenildi. Bu nedenle antikorların hedefe bağlanması için toplanan süpernatantların %10 FBS içeren besi yerinde olmasında bir sakınca görölmedi. Serumun kökeninden gelecek antikor etkileşimleri minimal olacağı öngöröldü. Ayrıca serumsuz ortamın kullanılmasının hücreler üzerinde yaratabileceği stres ve stresin önlenmesi için uygulanacak FBS oranının seri azaltılmasının getireceği malzeme ve zaman kaybı önlenmek istendi.

Antikor bağlanmasının SK-BR-3 hücresinde güçlü iken MCF-7 hücresinde zayıf olması beklendi. Şekil 4 ve 5'te gösterildiği gibi beklentilerimizle tutarlı sonuçlar elde

edildi. Şekil 4'te görüldüğü gibi SK-BR-3 hücrelerinde hibridoma antikorları BH1, BH2, BH6 ve BH7 hedefleri HER2'yi tanıyarak ticari ErbB2 antikoruna kadar güçlü immüno Floresans sinyal verdiği görüldü. Diğer klonlarının aksine BH5 antikorundan çok zayıf sinyal elde edildi. Eş zamanlı, aynı koşullarda uygulanan ve tekrarlanan deneyler ile yöntemeye dayalı bir hata olmadığından emin olundu. Antikor bağlanması için zayıf sinyal elde edilmesi, hibridoma klonlarının yıllar boyunca kararlı bir şekilde antikor üretebilme yetenekleri sebebiyle öngörülmesi de seçilen klonun önceki çalışmalarımızda hücre hattına bağlı olarak ErbB2'ye bağlanma eğiliminin olmadığı veya diğer klonlara göre düşük olduğu gösterildiğinden tutarlı bulundu ⁶. Şekil 5'te beklenildiği gibi MCF-7 hücrelerinde HER2 fazlaca ifade edilmediği için BH1 ve BH2 antikorlarının güçlü sinyal vermediği gösterilmiştir. Diğer antikorlar ile de aynı sonuç öngörüldüğünden bu hücrelerde sadece iki klon için IF yapılmıştır. Böylece deney içi kontrollerinin yanı sıra HER2 amplifiye olmamış bir hücre hattında da antikorların denenmesiyle, antikorun hedefi tanımadaki doğruluğu gösterilmiştir.

Hibridoma klonlarının neredeyse hepsinin hedefi hala özgün olarak tanıyabilen antikor ürettikleri ispat edildikten sonra immüno globulinlerin ağır ve hafif zincir amino asit sekansının öğrenilmesi için RNA izolasyonu yapıldı. Bu aşamadan itibaren devam eden basamaklarda elde edilen RNA'lar üzerinde çalışılacağı ve immüno globulin özgü sekansın önemli olması sebebiyle, RNA kararlılığı ve bütünlüğü jelde tayin edildi (Şekil 6). Ribozomal RNA, total RNA'nın çoğunluğunu oluşturduğu için jelde gözlenebilmiştir. Şekildeki gibi yaklaşık 2:1 büyüklük oranında elde edilen 28S ve 18S rRNA'lar bozulmamış bütün RNA'nın simgesidir.

Bir sonraki aşamada immüno globulin ağır ve hafif zincirlerinin değişken bölgelerine komşu değişmez bölgelere özgü dejenere primerler kullanılarak üretilen antikorun ağır ve hafif zincirlerinin antikordan antikora değişebilen özgün bölgelerinin amplifiye edilmesi amaçlandı. RNA'dan cDNA ve devamında amplifikasyon ile immüno globulin ağır ve hafif zincir değişken bölgelerinin PCR ürünü elde edildi. Tablo 6'da sekansları gösterilen dejenere primerler ağır ve hafif zincir için dahil olduğu grupta tüm klonlar için denendi. Her bir klon için, en az bir tane ağır ve bir tane de hafif zincir olmak üzere toplamda en az iki ampikon elde edilmesi beklendi.

Şekil 7 ve 8'de IgG ağır ve kappa hafif zincir için çoğalma ürünü veren örneklerin jel sonucu gösterilmiş, pozitif olan primerler Tablo 7'de listelenmiştir. Genel olarak klonlarda IgG ağır zincirleri birer primer ile amplikon verirken, kappa hafif zincirleri birden fazla primer çeşidiyle amplikon vermiştir.

Antikorların çoğaltılan ağır ve hafif zincir ürünleri, DNA dizi analizine gönderilmiştir. Tablo 6'da listelendiği gibi dejenere A primerinin daha kısa hali ve dejenere olmayan sadece A ve T nükleotid farkı bulunan AA ve AT primerleri ile hedeflenen alana özgü olmayan amplikonlar vermiştir. Bunların, 500bp'lik elde edilmesi esas hedeflenen dizi analizine müdahale edeceği düşünüldüğü için, BH klonu 7'nin kappa hafif zincirinde pozitif olan örneklerden K7AA ve K7AT sekans analizine gönderilmedi. Spesifik olmayan bantlanmadan kurtulmak için primer bağlanma sıcaklığı artırıldı, primer konsantrasyonu azaltıldı, primer saflığından emin olmak için yeni dilüsyon kullanıldı. Bu değişikliklere rağmen hala aynı bantlanmalar elde edilmesi sebebiyle BH klon 7'nin A primeri ile verdiği amplifikasyon analiz edilemedi.

DNA dizi analizine gönderilen örnekler PCR ile çoğaltılırken yüksek duyarlılığı ve düzeltme özelliği olan polimeraz enzimi kullanılmadı. Bilinmeyen bir DNA dizisinin analiz ediliyor olması sebebiyle başta bu çeşit bir polimeraz enzimi kullanılması hedeflense de istenilen saflıkta ve yoğunlukta bantlar elde edilemediği için ileri teknoloji Taq polimeraz enzimi kullanılarak hedeflenen bölgeler çoğaltıldı. Elde edilecek sekanslarda PCR kaynaklı dizi değişiminin saptanabilmesi için farklı zamanlarda çoğaltılan PCR örnekleri, farklı zamanlarda dizi analizine gönderildi. Bulgular bölümünde açıklandığı gibi aynı örnek için elde edilen sekans sonuçlarının tutarlılıkları kontrol edildi. Antikor ağır ve hafif zincirinin amino asit diziliminde farklılık yaratacak herhangi bir dizi uyumsuzluğuna rastlanmadı.

Elde edilen DNA dizileri ağır zincir ve hafif zincir için olanlar kendi grupları içerisinde karşılaştırıldı (veri gösterilmedi). Yapılan analiz sonucunda IgG ağır zincir için aynı primerlerle çoğaltılan farklı klonlara ait dizilerin birebir örtüştüğü tespit edildi. Aynı durumun kappa hafif zincir için de geçerli olduğu gözlemlendi. Örneğin, Şekil 9 da

gösterilen BH1 ve BH6 klonunun ağır zincir C primeri ile çoğaltılan DNA dizileri dolayısıyla amino asit dizilimi 5GC ve 6GC birbiriyle birebir aynıdır. Şekil 10'da gösterildiği gibi hafif zincir B primeri ile çoğaltılan K1B, K2B, K5B, K6B DNA dizileri de ve sonucunda amino asit sekansları da birebir aynıdır.

Daha önce gerçekleştirilen BH antikorlarının bağlanma eğilimlerine ve hücre proliferasyonunu engelleme kapasitelerine bakıldığında sekans sonuçlarındaki benzerlik şaşırtıcı bulundu. Çünkü özellikle BH1 ve onu takiben BH6 antikor klonları HER2'ye bağlanabilme ve bunun sonucunda hücrenin bölünmesini durdurabilme etkinliği olarak ön plana çıksalar da klonlardan elde edilen antikorların hepsinin birbirinden farklı kapasitede etkinlik gösterdikleri bulunmuş ⁶. Dolayısıyla amino asit sekanslarında küçük de olsa farklılıklar beklenmekteydi. Fakat sonrasında bu sonuçlar, antikorun yapısındaki ağır ve hafif zincirlerin farklı kombinasyonlarının bir araya gelmesi ile ilişkilendirildi. Aynı ağır zincir dizilimine sahip olsalar da farklı amino asit diziliminden gelen hafif zincir yapısı proteinin üç boyutlu yapısında farklılığa neden olmaktadır. Aynı durum hafif zincir amino asit diziliminin aynıyken ağır zincirin farklı olmasında da geçerlidir. Şekil 1'de gösterildiği gibi antikorun hedefe bağlanması için antijen epitopunun tanınmasında hem VH hem de VL rol almaktadır. Bu bölgelerden herhangi birindeki farklılık, bağlanma eğilimini buna bağlı olarak aktiveleştirilen sinyal şiddetini değiştireceği için antikorlardan farklı etkinlikler alınacaktır.

BH1 ve BH6 antikor klonları üzerinden örneklere devam ettiğimizde Şekil 9'da gösterilen ağır zincir amino asit dizilimi birebir aynı olsa da Şekil 10'da görüldüğü gibi kappa hafif zinciri için A primeri ile verilen aminoasit dizilimi K1A, hibridoma klonu BH1'e özgüdür. Dolayısıyla BH1 ile BH6'nın bağlanma ve etkinlik kapasitelerinin farklı olmasında K1A hafif zincirinin, immünooglobulin yapısına katılması neden olabilir. Bunların yanı sıra Tablo 7'de özetlendiği ve Şekil 10'da gösterildiği üzere K1B, K6B, K2C, K6C gibi B ve C primeri ile çoğaltılan hafif zincir değişken bölgelerinin neredeyse tüm hibridoma klonlarında ortak olduğu bulundu. Bu durum, bu amino asit dizilerinin endojen sekanslar olabileceği şüphesini doğurdu. Yani, bu dizilerin B lenfosit hücrelerinin bağıışıklık kazandırıldığı hedef proteine özgü

antikor sekansı değil, hibridoma hücrelerinin kendisinin ürettiği antikorlara özgü sekanslar olabileceği düşünülür.

Literatürde hibridoma hücrelerinde endojen özellikler görülebileceği ve bunların antikor ağır ve hafif zincirleri için normal olmayan mRNA'lar ifade edebileceği vurgulanmaktadır. MOPC-21 myeloma hücrelerinden türetilmiş Sp2/0, NS-0, OUR-1 ve P3-X63-Ag8.653 gibi hücrelerin hibridoma üretiminde B lenfosit hücreleri ile füzyon partneri olarak kullanılmasının, endojen antikor oluşumuna neden olabileceği ifade edilmektedir^{50,51}. Grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen hibridoma hücreleri üretiminde Sp2/0 myeloma hücrelerinin füzyon için kullanılması şüphelerimizi doğrulamıştır. MOPC-21'den türemiş myeloma hücreleri tarafında ifade edilen endojen kappa hafif zincirinin DNA sekansı BH hibridoma klonların hafif zincirinin B ve C örnekleri ile hizalanıp karşılaştırıldı (data verilmedi). Kappa zincir B ve C DNA dizilerinin myeloma endojen antikor sekansı (Gen Bankası No. M35669) ile bire bir aynı olduğu bulundu⁵⁰. Dolayısıyla Tablo 7'de özetlenen kappa hafif zincir B ve C amplikonları endojendir. Bunun yanı sıra, ağır zincir için bilinen endojen diziler (Gen Bankası ID: EU121635, X58634 ve AY646832.1) klonlardan da elde ettiğimiz ağır zincir DNA sekansları ile Clustal Omega aracı ile karşılaştırıldı⁵⁰. Önemli bir benzerlik saptanmadı (data verilmedi). Hibridoma hücrelerinden rekombinant protein elde edilirken, kararlı hücrelerin oluşturulması sırasında endojen genlerin susturulması veya yok olması sebebiyle endojen antikorlar her zaman ifade edilmemektedir. Dolayısıyla hedeflenen rekombinant antikor için her zaman engel teşkil etmez⁵¹.

Bu bilgiler doğrultusunda Şekil 4'e tekrar bakıldığında BH5 antikorunun güçlü bir HER2 bağlanması vermemesinin sebebi endojen kappa zincire sahip olması olabilir. Kappa hafif zincir mRNA'sı tam fonksiyonlu bir immunoglobulin proteinine dönüştürülemedi. Aynı durum BH6 klonu için geçerli olsa da Şekil 4 IF sonucunda görüldüğü gibi hedefe karşı bağlanma sinyali oldukça kuvvetlidir. Dolayısıyla BH6 klonu endojen sekansların yanı sıra antikorun HER2'ye bağlanmasını sağlayan başka bir hafif zincir sekansını da içeriyor demektir. Fakat Tablo 6'da listelenen hafif zincir primerleri ile bu özgün dizi saptanamamıştır. Farklı dizilime sahip başka

primerler denenerek bu klon için gerçek pozitif hafif zincir sekansı ileriki aşamalarda elde edilebilir.

Şekil 9 ve Şekil 10 üzerinde gösterildiği gibi ağır ve hafif zincir değişken bölgelerin amino asit dizilimleri elde edildikten sonra bu bölgeler üzerinde hedef HER2'ye bağlanmada esas rol oynayan kısımların bulunması hedeflendi. Bu şekilde bağışıklığı aktive edilmiş fare tarafından insan HER2'sine karşı üretilen antikorların antijen bağlanmasında rol oynayan alanlar bulundu. İnsan immünoglobulin sentezinde kullanılan vektör iskeleti üzerinde değiştirilecek bölgeler belirlenerek HER2 karşıtı insanlaştırılmış monoklonal antikor üretimi için moleküler temeller atıldı.

Antijen bağlanmasında belirleyici rol oynayan bu bölgeler genel bilgiler bölümünde daha önce değinildiği gibi CDR olarak adlandırılır. Bu bölgelerin bulunması için immünoglobulin DNA ve amino asit dizileri kullanılarak NCBI IgBlast ve IMGT veritabanlarından faydalanılmıştır. Bu araçlar 1970 yılında geliştirilen Kabat numaralamasına dayanmaktadır⁴⁸. CDR bölgeleri değişken bölge içerisinde yer alan ultra değişken bölgeler olduğu için immünoglobulin veri tabanında bu bölgelerin başladığı sıralar belirlenerek üç farklı CDR bölgesi için genel bir sıralama oluşturulmuştur. Değişken ağır zincir amino asit diziliminde 31-35B, 50-65 ve 95-102 sırasındaki amino asit dizilimleri CDR1 CDR2 ve CDR3 dizilimleridir. Değişken hafif zincir amino asit diziliminde ise 24-34, 50-56 ve 89-97 sırasındaki amino asit dizilimleri CDR1 CDR2 ve CDR3 olarak ifade edilir^{48,52}.

Şekil 9 ve 10'da yatay çizgiler ile gösterilen alanlar hedefe bağlanılmasında rol oynayan ağır ve hafif zincir CDR dizileridir. Dik çizgi ile gösterilen Şekil 9'da QIQ ile Şekil 10'da DIV ile başlayan amino asit dizilimleri Kabat numaralamasında hafif zincir değişken bölgeler için başlangıç kabul edilmektedir. Bu sebeple bundan önceki amino asit dizilimlerinin değişmez bölgelerden geldiği düşünülmektedir. Bu çalışmanın devamında monoklonal antikor patenti için başvurulacağından CDR alanları ve antikorun bağlanma kapasitesini arttırmak için modifiye edilecek komşu alanlar sansürlenmiştir. Şekilde kısıtlanan CDR bölgeleri 3 ile 10 arasında değişen amino asit dizilimlerinden oluşmaktadır. Beklenildiği gibi farklı primerler ile çoğaltılan

amino asit zincir dizilimlerinin birbirinden en fazla farklılık gösterdiği yerler bu kısımlardır. Bu dizilerin proteinin üç boyutlu yapısında yarattığı değişiklik sebebiyle hibridoma klonları tarafından üretilen monoklonal antikolar, HER2'ye karşı farklı bağlanma eğilimleri ve etkinlikler göstermiştir (Şekil 4 IF sonuçları ve önceki çalışmalar⁶).

Araştırmanın amacı olan CDR bölgelerinin belirlenmesinin ardından monoklonal antikorun insanlaştırılması yolunda insan immünoglobulin üretiminde kullanılacak vektör seçildi. BH antikoları ile aynı ağır ve hafif zincir izotipi IgG1/k'ya sahip olduğu ve iki zinciri de aynı anda memeli hücresinde ifade edilmeye uygun olarak tasarlandığı için Şekil 11'de gösterilen pVITRO1-M80-F2-IgG1/k vektörü seçildi. Vektörün immünoglobulin genel dizilimini içermesinin haricinde herhangi bir hedefe karşı özgünlüğü yoktur. Moleküler olarak onu hedefimiz HER2 reseptör proteine hassas hale gelmesi için fare tarafından geliştirilen HER2 karşıtı BH antikolarının antijen tanıma spesifik rol oynayan CDR dizilimlerine sahip olması gerekir. Bulgular bölümünde BH1 monoklonal antikor için anlatıldığı gibi farede belirlenen CDR'ler, vektör DNA diziliminde bu bölgeler ile karşılaştırıldı. Vektör tarafından ifade edilecek antikorun BH1'le aynı özgünlüğe sahip olması için amino asit diziliminde farkı ortadan kaldıracak şekilde vektör DNA diziliminin Şekil 11'de simgelenen kısımlarının modifiye edilerek değiştirilmesi hedeflenmektedir. Böylece CDR alanları fare kökenli kalırken immünoglobulinin diğer yapıları insan kaynaklı olacaktır. Bunu takip eden moleküler çalışmalar yardımıyla meme kanserinde HER2 karşıtı insanlaştırılmış monoklonal antikor üretimi gerçekleştirilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

BH hibridoma klonları tarafından üretilen antikorlar içerisinde zayıf etki gösteren BH5 antikoruna hariç hepsinin hedefleri HER2'yi in vitro olarak etkili bir şekilde hala tanımakta oldukları ispatlandı. Çalışmanın devamında BH5 hafif zincirinin endojen kappa hafif zincir yapısı içerdiğinin bulunması HER2'ye zayıf bağlanma eğilimiyle ilişkilendirildi.

BH6 antikoruna HER2 proteinini güçlü bir şekilde tanıırken elde edilen hafif zincir amino asit diziliminde endojen dışında sekanslar saptanamaması şüpheli bulundu. Araştırmada kullanılan hafif zincir primerlerinin tanıyamadığı başka bir hafif zincir immüoglobulin yapısına sahip olduğu düşünüldü. Bu amaçla farklı primer taramalarıyla ileride bu sekansın elde edilmesi hedeflendi.

PCR ile başarılı bir şekilde çoğaltmamıza rağmen anlamlı bir sekans sonucu elde edemediğimiz BH7 antikoruna ile çalışmalara da devam edilecektir. Pozitif bant verdiği primerler ile PCR tekrarlanacak ve sekansı elde edilmesi için dizisi bilinen bir vektöre alt klonlama yapılarak vektör taslağından itibaren okuma yapıp anlamlı DNA dizimleri elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bu örnek için ayrıca immüoglobulin hafif zincir değişken bölgelerin çoğaltılması sırasında elde edilen spesifik olmayan banttaki PCR optimizasyonu ile kurtulmaya çalışılacak veya görülmesi beklenen, hedef bantlardan izole edilip sekanslanmaya gönderilecektir. Bu şekilde ileride BH6 ve BH7 antikorları için de anlamlı diziler elde edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışmanın en güçlü sonucu BH1 ve BH2 antikorları için hem ağır hem de hafif zincirde endojen olmadığından emin olduğumuz ve HER2'yi özgün olarak tanımasını sağlayan immüoglobulin sekanslarının elde edilmesidir. Grubumuz tarafından daha önce gerçekleştirilen antikorların bağlanma etkinliklerinin ve hücre çoğalmasını engelleme kapasitelerinin gösterildiği çalışmada öne çıkan BH1 antikoruna böylece bu çalışmada da olumlu sonuç vermiştir.

Antikorların DNA ve amino asit dizilimlerinde hedeflenen HER2 proteinine bağlanmasını sağlayan CDR alanları başarılı bir şekilde analiz edildi. Böylece memeli IgG1/kappa immunoglobulinin ifade edilmesinde kullanılacak vektör üzerinde değiştirilecek alanlar belirlendi. Bu sayede ağır ve hafif zincirinde bütün olarak insan immünoglobulin yapısına sahip olan ama sadece CDR bölgelerinde bağışıklık kazandırılmış fareye ait yapılar içeren antikorların sentezlenmesi sağlanacaktır. HER2 karşıtı insanlaştırılmış antikor üretilmesi için moleküler adımlar atıldıktan sonra hücresel olarak antikorun üretilmesi için deneyler yapılması gelecek çalışmalarda hedeflenmektedir.

Bu araştırmanın devamı niteliğinde BH1 ve BH2 antikorlarının CDR dizilimlerini ve antikorun etkinliğini artıracak şekilde modifiye edilmiş komşu bölgelerin sekanslarını içeren memeli immünoglobulin ifade vektörü CHO hücre hattına transfekte edilecektir. İnsanlaştırılmış antikoru üreten klonlar seçilecektir. Daha sonra bu klonlar tarafında üretilen monoklonal antikorların HER2 reseptörüne bağlanma kapasiteleri ölçülecektir. Safılaştırılan antikorların meme kanseri hücre hatlarında büyüme karşıtı faaliyetlerinin etkinliği test edilecektir. Olumlu sonuç alınması halinde fare modelleri ile in vivo olarak antikorların tümör karşıtı etkinliği gözlemlenecektir.

Planlanan basamakların başarıyla gerçekleşmesi halinde klinik çalışmalara geçilmek üzere HER2 pozitif meme kanseri için alternatif insanlaştırılmış monoklonal antikor elde edilmiş olacaktır. Böylece piyasada bulunan monoklonal antikordardan farklı bir HER2 hücre dışı alanına özgün, konformasyonel olarak epitopunu tanıyan antikor geliştirilmiş olacaktır.

BH antikorlarının günümüzde meme kanseri tedavisinde kullanılan monoklonal antikordardan biri Trastuzumab ile hedefi tanımada rekabete girmedeği grubumuz tarafından önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Dolayısıyla geliştirilecek antikor meme kanseri tedavisinde etkinliğine göre tekli tedavilerde kullanılacağı gibi ikili tedavilerde de kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology advances*, 2012; 30.5: 1158-1170.
2. Sliwkowski M. X, Mellman I. Antibody therapeutics in cancer. *Science*, 2013; 341.6151: 1192-1198.
3. Zhou L, Xu N, Sun Y, ve Liu X. M. Targeted biopharmaceuticals for cancer treatment. *Cancer letters*, 2014; 352.2: 145-151.
4. Scott A. M, Allison J. P, Wolchok J. D. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity Archive*, 2012; 12.1: 14.
5. Martinello R, Milani A, Geuna A., E, Zucchini G ve ark. Investigational ErbB-2 tyrosine kinase inhibitors for the treatment of breast cancer. *Expert Opin Inves Drugs*. 2016; 25:4 393-403.
6. Ceran C, Cokol M, Cingoz S, Tasan I, ve ark. Novel anti-her2 monoclonal antibodies: synergy and antagonism with tumor necrosis factor- α . *BMC Cancer*, 2012; 12:450.
7. Hudis C. A. Trastuzumab - mechanism of action and use in clinical practice. *New Eng J Med* 2007; 357:39–51.
8. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T. ve ark. The expression patterns of er, pr, her2, ck5/6, egfr, ki-67 and ar by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast cancer: basic and clinical research*, 2010; 4:35.
9. Carter P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews Immunology*, 2006; 6.5: 343-357.
10. Nelson P. N. ve ark. Monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Pathology*, 2000; 53.3: 111-117.
11. Reichert J. M. Monoclonal antibodies in the clinic. *Nature biotechnology*, 2001; 19.9: 819-822.
12. Reichert J. M, Rosensweig C.J, Faden L.B. ve Dewitz M.C. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature biotechnology*, 2005; 23.9: 1073-1078.
13. Chan A. C, Carter P. J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2010; 10.5: 301-316.
14. Smith S. L. Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *Progress in Transplantation*, 1996; 6.3: 109-121.

15. Chames P, Van Regenmortel, M, Weiss, E, ve Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, 2009; 157(2), 220-233.
16. Reichert J. M, ve Valge-Archer V. E. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2007; 6.5, 349-356.
17. Carter P, Smith L, ve Ryan M. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocrine-related cancer*, 2004; 11.4, 659-687.
18. Clark M. Antibody humanization: a case of the “Emperor’s new clothes”? *Immunology today*, 2000; 21.8, 397-402.
19. Almagro J. C. ve Fransson, J. Humanization of antibodies. *Front Biosci*, 2008; 13.1, 1619-1633.
20. Nelson A. L, Dhimolea E, Reichert J. M. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*, 2010; 9.10: 767-774.
21. Beck A, Wurch T, Bailly C. ve Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 2010; 10.5, 345-352.
22. My Cancer Genome. <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/overview-of-targeted-therapies-for-cancer/> (Aralık 2016).
23. Guan M, Zhou Y. P, Sun J. L. ve Chen S. C. Adverse events of monoclonal antibodies used for cancer therapy. *BioMed research international*, 2015
24. Prescription Drug Information, Interaction & Side Effects. <https://www.drugs.com/#> (Aralık 2016)
25. CenterWatch: Clinical Research and Drug Information <http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/therapeutic-area/12/oncology> (Aralık 2016)
26. American Cancer Society. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf> (Aralık 2016)
27. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. <http://kanser.gov.tr/Dosya/Bilgi-Dokumanlari/raporlar/birim.pdf> (Aralık 2016)

28. Schettini F, Buono G, Cardalesi C, Desideri I, ve ark. Hormone receptor/human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: where we are now and where we are going. *Cancer treatment reviews*, 2016; 46, 20-26.
29. Slamon D. J, Godolphin W, Jones L. A, Holt J. A, ve ark. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 1989; 244.4905, 707-712.
30. Rimawi M. F, Schiff R. ve Osborne C. K. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. *Annual review of medicine*, 2015; 66, 111-128.
31. Ross J. S, Fletcher J. A, Bloom K. J, Linette G. P. ve ark. Targeted therapy in breast cancer the HER-2/neu gene and protein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004; 3.4, 379-398.
32. Desai M. D, Saroya B. S. ve Lockhart A. C. Investigational therapies targeting the ErbB (EGFR, HER2, HER3, HER4) family in GI cancers. *Expert opinion on investigational drugs*, 2013; 22.3, 341-356.
33. Nahta R. ve Esteva F. J. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Research*, 2006; 8.6, 1.
34. Hurvitz S. A, Shatsky R. ve Harbeck N. Afatinib in the treatment of breast cancer. *Expert opinion on investigational drugs*, 2014; 23.7, 1039-1047.
35. Suder A, Ang J. E, Kyle F, Harris D. ve ark. A phase I study of daily afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in combination with weekly paclitaxel in patients with advanced solid tumours. *European Journal of Cancer*, 2015; 51.16, 2275-2284.
36. Yamamoto N, Yamada Y, Fujiwara Y, Yamada K. ve ark. Phase I and pharmacokinetic study of HER2-targeted rhuMAb 2C4 (Pertuzumab, RO4368451) in Japanese patients with solid tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2009; 39, 260–266.
37. Swain S. M, Baselga J, Kim S. B, Ro J. ve ark. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 2015; 372.8, 724-734.
38. Huszno J. ve Nowara E. Current therapeutic strategies of anti-HER2 treatment in advanced breast cancer patients. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2016; 20.1, 1-7.

39. RNA-Macherey Nagel
http://www.mnnet.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNA.pdf (Kasım 2016)
40. TRIsure Bioline. http://www.bioline.com/au/downloads/dl/file/id/953/pi-50260_trisure_v3_020316.pdf (Kasım 2016)
41. ThermoScientific NanoDrop Products. <http://www.nanodrop.com/Library/T009-NanoDrop%201000-&-NanoDrop%208000-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf> (Kasım 2016)
42. ThermoScientific Agarose Gel Electrophoresis of RNA
<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/rna-protocol/agarose-gel-electrophoresis-of-rna.html>
(Kasım 2016)
43. ThermoScientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012716_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1622_UG.pdf (Kasım 2016)
44. Clustal Omega Multiple Sequence Alignment EMBL-EBI
<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Aralık 2016)
45. NCBI Open Reading Frame Finder <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> (Aralık 2016)
46. NCBI IgBlast <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/> (Aralık 2016)
47. IMGT/V-QUEST
http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=mouseIg (Aralık 2016)
48. Wu T.T. ve Kabat E.A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.*, 1970; 132, 211–250.
49. Dodev T. S, Karagiannis P, Gilbert A. E, Josephs D. H. ve ark. A tool kit for rapid cloning and expression of recombinant antibodies. *Scientific reports*, 2014;4.
50. Ding G, Chen X, Zhu J. ve Cao B. Identification of two aberrant transcripts derived from a hybridoma with amplification of functional immunoglobulin variable genes. *Cellular & molecular immunology*, 2010; 7.5, 349-354.
51. Yuan X, Gubbins M. J. ve Berry J. D. A simple and rapid protocol for the sequence determination of functional kappa light chain cDNAs from aberrant-

chain-positive murine hybridomas. Journal of immunological methods, 2004; 294.1, 199-207.

52. Johnson G. ve Te Wu T. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. Nucleic acids research, 2000; 28.1, 214-218.



8. EKLER

8.1 Kurum Onayı



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
İZMİR ULUSLARARASI BİYOTİP VE GENOM
ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ



Sayı : 96350690.000 / 765
Konu : Etik Kurul Hk.

23/09/2016

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
(Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna)

Prof. Dr. Mehmet Öztürk'ün koordinatörlüğünde yürütülmesi planlanan **“Kanser Tedavisi için Rekombinant Protein Temelli Aday İlaçların Geliştirilmesi”** başlıklı tez çalışmasının İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü laboratuvarlarında yapılacağını saygılarımla bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. Mehmet ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

8.2 Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	2966-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kanser Tedavisi İçin Rekombinant Protein Temelli Aday İlaçların Geliştirilmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Mehmet ÖZTÜRK İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/28-29	Tarih:03.11.2016
	Prof.Dr.Mehmet ÖZTÜRK'ün sorumlusu olduğu "Kanser Tedavisi İçin Rekombinant Protein Temelli Aday İlaçların Geliştirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Sevine ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Doç.Dr.Şeyda SEREN INTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Uzm.Dr.Ahmet Can BILGIN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılabadı

8.3 Özgeçmiş

ADI SOYADI: AYBIKE ERDOĞAN

TC Kimlik No / Pasaport No:	26972305318/ U03981800
Doğum Yılı:	1991
Yazışma Adresi :	Korutürk Mah. Palmiye Sok. Beste Kız Öğrenci Yurdu No.4 35330 Balçova, İzmir/Türkiye
Telefon :	05359777289
Faks :	
e-posta :	aybikeerdogan@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Yüksek Lisans	
TR	İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi	Fen Fakültesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Lisans	2014

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü	TR	İzmir	Biolzmir	Teknisyen	Haziran 2015- Aralık 2016
Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi	TR	İzmir	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Stajyer Öğrenci	Eylül 2014- Ocak 2015
Max Delbrück Moleküler Tıp Merkezi(MDC)	Almanya	Berlin	Bağlantılı Sinyal (Anchored Signalling)	Stajyer Öğrenci	Temmuz- Eylül 2013
İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi	TR	Ankara	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Stajyer Öğrenci	Şubat 2012- Haziran 2013

Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi	TR	Ankara	Genetik Laboratuvarı	Stajyer Öğrenci	Aralık 2010- Haziran 2012
--	----	--------	----------------------	-----------------	---------------------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Moleküler ve hücre biyolojisi, monoklonal antikor geliştirilmesi

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)		İyi Üretim Uygulamaları (GMP) eğitimi, TÜRKAK TS EN ISO/IEC 17025 eğitimi BSL3 Odaklı Biyogüvenlik ve Biyoemniyet eğitimi	

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
<input type="checkbox"/>	Erasmus Staj Hareketliliği Program Bursu	T.C. Avrupa Birliği Bakanlığı	2013

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

