

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ DİMERİZASYON BÖLGESİNE
NÖTRALİZAN MONOKLONAL ANTİ-EGFR ANTİKORU GELİŞTİRİLMESİ

Onur Bender

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Arzu Atalay

Ağustos

2020

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Onur Bender

İmzası

ÖZET

Doktora Tezi

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Dimerizasyon Bölgesine Nötralizan Monoklonal Anti-EGFR Antikoru Geliştirilmesi

Onur Bender

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Arzu Atalay

Kanser, genetik modifikasyonları içeren çok faktörlü ve heterojen bir hastalıktır. Gelişen teknolojiler ve insan genom çözünürlüğünün artması, kanserde tanı ve tedavi protokolleri için daha özgün araçların ortaya çıkmasını sağlamıştır. Transmembran bir glikoprotein olan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), ErbB tirozin kinaz reseptörleri ailesinin dört üyesinden biridir. EGFR aktivasyonu kanser gelişiminde önemli bir role sahiptir. Birçok kanser türünde anormal hücre proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve adhezyonu ile birlikte anjiogeneze ve apoptozun inhibisyonuna sebep olmaktadır. EGFR'nün bu çok yönlü onkogenik özelliği onu ilgili çekici bir hedef haline getirmiştir. Klinikte EGFR değişimlerine karşı geleneksel kemoterapötiklerin dışında hedefli tedaviler kapsamında küçük inhibe edici moleküller ve anti-EGFR monoklonal antikolar kullanılmaktadır. Fakat gelişen birçok ekzonik EGFR mutasyonu kullanılan inhibitörlere karşı direnç gelişimine sebep olmaktadır. Monoklonal antikoların beraberinde getirdiği immünojenite, zayıf efektör fonksiyonları ve farmokokinetik problemlerinin aşılması için farklı bölgelerin seçimiyle daha efektif anti-EGFR hedef çalışmaları sürmektedir. Bu çalışmada rekombinant EGFRd2 antijeni üretilmiş ve ardından hibridoma teknolojisi ile Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü dimerizasyon bölgesine özgün IgG1 kappa tipinde, antijenine yüksek afinite ile bağlanan anti-EGFR CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru üreten stabil klon geliştirilmiştir. Saflaştırılan CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru karakterize edilmiş ve etkinliği doğrulanmıştır. Antikorum çeşitli kanser hücreleri üzerindeki etkinliği nokta zamanlı ve gerçek zamanlı hücre analiz sistemleriyle araştırılmıştır. EGFR ve diğer ErbB aile üyeleri üzerinde fosforile olan aminoasitlere etkisi belirlenmiştir. Sonuç olarak mevcut haliyle araştırma ve tanı alanında kullanılabilecek aynı zamanda biyoteknoloji endüstrisi için yerli, uluslararası rekabete ve gelişime açık bir ürün oluşturulmuştur.

2020, 224 sayfa

Anahtar kelimeler: Epidermal büyüme faktörü reseptörü; Monoklonal antikor; Hibridoma; Dimerizasyon; Biyoteknolojik ürün; Anti-kanser.

ABSTRACT

PhD Thesis

Development of Neutralizing Monoclonal Anti-EGFR Antibody Against Epidermal
Growth Receptor Dimerization Domain

Onur Bender

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Dr. Arzu Atalay

Cancer is a multi-factorial and heterogeneous disease that includes genetic modifications. Developing technologies and increasing human genome resolution led to the emergence of more specific tools for diagnosis and treatment protocols in cancer. The epidermal growth factor receptor (EGFR), a transmembrane glycoprotein, is one of the four members of the ErbB tyrosine kinase receptors family. EGFR activation has an important role in cancer development. In many types of cancer, it causes abnormal cell proliferation, migration, invasion and adhesion along with angiogenesis and inhibition of apoptosis. This sophisticated oncogene feature of EGFR has made it an attractive target. Apart from traditional chemotherapeutics, small inhibitory molecules and anti-EGFR monoclonal antibodies are used against EGFR changes with respect to targeted therapies in the clinic. However, many developing exonic EGFR mutations cause resistance against anti-EGFR therapeutics. More effective anti-EGFR target studies are ongoing with the selection of different regions to overcome the immunogenicity, poor effector functions and pharmacokinetic problems brought by monoclonal antibodies. In this study, recombinant EGFRd2 antigen was produced and then a stable clone was developed which produced the IgG1 kappa type anti-EGFR CC4-B3-G3-H10 monoclonal antibody against Epidermal Growth Factor Receptor dimerization site that binds its antigen with high affinity. The purified CC4-B3-G3-H10 monoclonal antibody was characterized and further investigated. The activities of the antibody on various cancer cells were investigated using end-point and real-time cell analysis systems. Phosphorylated amino acids on EGFR and other ErbB family members were determined. As a result, a domestic product created that can be used in the field of research and diagnosis in its current form that is also open to international competition and development for the biotechnology industry.

2020, 224 pages

Keywords: Epidermal growth factor receptor; Monoclonal antibody; Hybridoma; Dimerization; Biotechnological product; Anti-cancer.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimi her öğrenci için kendine özgün bir süreçtir. Hayattaki pek çok duygunun bir arada yaşandığı bu uzun yoldaki en önemli etken sürekliliktir. Bunun sağlanması ise halden anlayan ve gerçek bir bilim insanının tecrübeleri ve yol göstericiliğiyle mümkündür. Ne şanslıyım ki hayal edebileceğimin çok daha ötesinde bir doktora dönemi geçirdim. Öncelikle beni ekibine kabul eden, fikirlerime değer veren, tüm bilgi ve tecrübesini bana aktarmaya çalışan, en güçsüz ve umutsuz düştüğüm anlarda sonsuz destek veren, tüm laboratuvar imkanlarını her daim seferber eden, daha konforlu çalışabilmem için gereken her şeyi sağlayan, yanlışlarımı düzeltip doğrularımı destekleyerek kendimi gerçekleştirmemi sağlayan, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim doktora tez danışmanım, çok kıymetli hocam Doç. Dr. Arzu ATALAY’a,

Tez çalışma sürecimde değerli katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi hocalarım Prof. Dr. Hakan GÜRDAL ve Prof. Dr. Erkan YILMAZ’a, ayrıca sabrı ve koşulsuz desteği için Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN’e,

Çalışmalarımı gerçekleştirme şansı bulduğum Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Sistem Biyoteknolojisi İleri Araştırma Birimi’ne ve tüm çalışanlarına,

Tez çalışmamı destekleyen TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (Proje No: 215S714) ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (Proje No: 19H0515001), ulusal ve uluslararası patent başvuru sürecindeki destekleri için Ankara Üniversitesi Rektörlüğü ve Ankara Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi’ne,

Lisans eğitimimin ilk gününden bu yana kadar her zaman yanımda olan, “Devler gibi eserler bırakmak için, karıncalar gibi çalışmak lazım” felsefesiyle bana ilham veren, birlikte pek çok başarılı çalışmaya imza attığımız, çalışma disiplini ve akademik karakterini örnek aldığım hocam Doç. Dr. Gökhan ZENGİN’e (Selçuk Üniversitesi) ve hayatımdaki en iyi dostum, ailemden biri olan Dr. Ramazan CEYLAN’a (Selçuk Üniversitesi),

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca destekleri ve değerli fikirleriyle her zaman yanımda olan Dr. Yama ABASSI'ye ve ayrıca tezim dışında pek çok etki değeri yüksek çalışmaya imza attığımız 9 farklı ülkeden her biri çok kıymetli bilim insanlarına,

Tez çalışmalarım sırasında her konuda desteklerini esirgemeyen, laboratuvarlarının kapılarını sonuna kadar açan çok kıymetli hocalarım Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK ve Doç. Dr. Nefise AKÇELİK'e,

Kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum, hayatımdaki en büyük destekçilerimden biri, güzel insan Burak GÜNEŞ'e,

Doktora eğitimimin bana kazandırdığı üç mükemmel insan, çok sevdiğim biricik dostlarım Betül Cansu YAZICI, Edibe Ece ABACI ve Berşan Seçil DUREL'e,

Dostlukları ve sonsuz destekleriyle her zaman sırtımı dayayabileceğim Süheyl Furkan KONCA ve Evrim ÇELEBİ'ye, tüm çalışmalarım süresince bizler için en kritik ve önem arz eden hücre kültürü çalışma alanını paylaştığım, çalışma disiplini ve titizliği ile birlikte iş birliği için Dr. Senem NOYAN'a, destekleri ve arkadaşlıkları için Benan Pelin SERMİKLİ, Gülizar AYDOĞDU, Aynur KARADAĞ GÜREL, Ayça ARSLANHAN, Çiğdem Elif ÇELİK, Gözde ERTÜZÜN, Zeynep ERAN, Sümeyye ALTUNOK ve Muhammad MUJTABA'ya,

Bugünlere gelmemde emeği olan tüm öğretmenlerime, hocalarıma, eğitmenlerime,

Varlıklarına her gün ayrı sonsuz şükrettiğim, değerleri hiçbir söz ile ifade edilemeyecek, annem Ümmü BENDER, babam Vedat BENDER ve kıymetlim, kardeşim Bahar BENDER'e,

Teşekkürlerimle...

Onur BENDER

Ağustos 2020

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. KANSER.....	3
2.1.1. KANSERİN ÖZELLİKLERİ.....	3
2.1.2. KANSER İSTATİSTİKLERİ	9
2.1.2.1. Global Kanser İstatistikleri	9
2.1.2.2. Türkiye Kanser İstatistikleri	12
2.1.3. KANSERDE TEDAVİ PROTOKOLLERİ	13
2.1.3.1. Cerrahi	14
2.1.3.2. Radyoterapi.....	15
2.1.3.3. Kemoterapi.....	15
2.1.3.4. Hedefli Tedaviler	16

2.1.3.4.1. Küçük Moleküller	18
2.1.3.4.2. Gen Terapi	22
2.1.3.4.3. Nanotaşıyıcı Sistemler	23
2.1.3.4.4. İmmünoterapi.....	23
2.2. MONOKLONAL ANTİKORLAR	27
2.2.1. MONOKLONAL ANTİKORLARIN YAPISI	29
2.2.2. MONOKLONAL ANTİKORLARIN ETKİ MEKANİZMALARI	30
2.2.3. MONOKLONAL ANTİKOR GELİŞTİRME YÖNTEMLERİ.....	33
2.2.4. MONOKLONAL ANTİKORLARIN ENDÜSTRİYEL PAZAR ANALİZİ.....	37
2.3. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ	40
2.3.1. ERBB AİLESİ, YAPI VE ÖZELLİKLERİ.....	41
2.3.2. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜNÜN YAPISI.....	44
2.3.3. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜNÜN AKTİVASYONU.....	46
2.3.4. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ HEDEFLİ AJANLAR.....	49
2.3.4.1. Anti-EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörleri	51
2.3.4.2. Anti-EGFR Monoklonal Antikorlar.....	53
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	<u>57</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>59</u>
4.1. MATERYAL	59
4.1.1. HÜCRE HATLARI.....	59
4.1.2. BAKTERİ SUŞLARI, PLAZMİTLER VE TRANSFORMANTLAR.....	59
4.1.3. FARELER.....	60
4.1.4. REAKTİF VE KİMYASALLAR.....	60

4.1.5. TAMPONLAR.....	62
4.1.6. KİTLER	62
4.2. YÖNTEM.....	63
4.2.1. REKOMBİNANT ANTİJEN ÜRETİMİ	63
4.2.1.1. Bakteriyel Kültür Şartları.....	63
4.2.1.2. Rekombinant EGFRd2 İfadesi.....	64
4.2.1.3. Protein Çözünürlük Testi	66
4.2.1.4. Nikel-Rezin Kit ile Protein Saflaştırma	66
4.2.1.5. Diyaliz.....	67
4.2.2. BCA TESTİ İLE TOTAL PROTEİN MİKTAR TAYİNİ.....	68
4.2.3. COOMASSİE BLUE BOYAMASI.....	68
4.2.4. İMMÜNBLOTLAMA	68
4.2.4.1. Klasik İmmünblotlama	69
4.2.4.2. Surf İmmünblotlama	69
4.2.4.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile Ayrılması	70
4.2.4.4. Proteinlerin Membrana Transferi.....	70
4.2.4.5. Bloklama	71
4.2.4.6. Primer Antikor ile İşaretleme	71
4.2.4.7. Sekonder Antikor ile İşaretleme ve Görüntüleme	71
4.2.5. İNDİREK ELISA TESTİ	72
4.2.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ	72
4.2.6.1. Hücre Kültürü Genel Çalışma Kuralları	72

4.2.6.2. Hücre Hatlarının Kültür Koşulları	73
4.2.6.3. Stoktan Hücre Açılması	74
4.2.6.4. Hücre Pasajlama	74
4.2.6.5. Hücrelerden Stok Alımı ve Saklama Koşulları.....	74
4.2.6.6. Hematositometre ile Hücre Sayımı	75
4.2.6.7. Hücre Hatlarından Total Protein İzolasyonu	75
4.2.7. HİBRİDOMA	76
4.2.7.1. Farelerin İmmünizasyonu	76
4.2.7.2. Miyelom Hücrelerinin Füzyona Hazırlanması	76
4.2.7.3. Splenositlerin (Dalak Hücreleri) Füzyona Hazırlanması	77
4.2.7.4. PEG Aracılı Füzyon.....	77
4.2.7.5. Yarı Katı HAT Besiyeri ile Seleksiyon	77
4.2.7.6. Hibridomaların Yarı Katı Seleksiyon Besiyerinden Toplanması	78
4.2.7.7. Alt Klonlama ile Kolonilerin Monoklonalleştirilmesi.....	78
4.2.8. ANTİKOR İZOTİPLENDİRME	78
4.2.9. ANTİKOR SAFLAŞTIRMA	79
4.2.9.1. Saflaştırma Öncesi Örnek Hazırlığı.....	79
4.2.9.2. Örneklerin Kolondan Geçirilmesi.....	79
4.2.9.3. Diyaliz ile Antikorların Tampon Değişimi	80
4.2.9.4. Antikor Miktar Tayini.....	80
4.2.9.5. Saflaştırılan Antikorum Konsantrasyonu.....	80

4.2.10. HÜCRE CANLILIK ANALİZLERİ.....	80
4.2.10.1. WST-1 Testi ile Nokta Zamanlı Hücre Canlılık Analizi	80
4.2.10.2. xCELLigence Platformu ile Gerçek Zamanlı Hücre Canlılık Testi	81
4.2.11. EGFR FOSFORİLASYON ARRAY TESTİ	81
5. ARASTIRMA BULGULARI.....	84
5.1. REKOMBİNANT ANTİJEN ÜRETİMİ	85
5.1.1. EGFRd2 PROTEİN ÇÖZÜNÜRLÜK PROFİLİ	85
5.1.2. EGFRd2 PROTEİNİNİN BÜYÜK ÖLÇEKLİ ÜRETİMİ	87
5.1.3. EGFRd2 PROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILMASI.....	89
5.2. İMMÜNİZASYON, HİBRİDOMA GELİŞTİRME VE MONOKLONALLEŞTİRME SÜREÇLERİ.....	93
5.2.1. İMMÜNİZASYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ.....	93
5.2.1.1. İndirek ELISA Yöntemi ile Fare Serum Titrasyon Analizleri.....	93
5.2.1.2. Fare Serumlarının Rekombinant ve Endojen EGFR Tanıma Kapasitelerinin İmmünblotlama ile Belirlenmesi	96
5.2.2. HİBRİDOMA VERİLERİ	99
5.2.2.1. Miyelom Kültürü ve Füzyon.....	99
5.2.2.2. Hibridoma Eldesi ve Koloni Tarama	101
5.2.2.3. Hibridoma Kolonilerinin İdamesi ve Stabil Kolonilerin Belirlenmesi	107
5.2.2.4. Alt Klonlama ile Anti-EGFR Monoklonal Antikor Üreten Klon Eldesi	109
5.2.3. ANTİKOR İZOTİPİNİN BELİRLENMESİ.....	110
5.2.4. ANTİKOR SAFLAŞTIRMA.....	111
5.3. ANTİ-EGFR MONOKLONAL ANTİKOR KARAKTERİZASYONU VE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ	120

5.3.1. ANTİJEN - ANTİKOR AFİNİTE TESTİ	120
5.3.2. CC4-B3-G3-H10 MONOKLONAL ANTİKORUNUN REKOMBİNANT VE ENDOJEN EGFR TANIMA KAPASİTESİNİN İMMUN BLOTLAMA İLE BELİRLENMESİ	121
5.3.3. SAF ANTİKOR İZOTİPLENDİRMESİ.....	122
5.3.4. CC4-B3-G3-H10 MONOKLONAL ANTİKORUNUN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ	124
5.3.4.1. WST-1 Testi ile Nokta Zamanlı Hücre Canlılık Analizleri	124
5.3.4.2. xCELLigence Platformu ile Gerçek Zamanlı Hücre Canlılık Testi	128
5.3.5. CC4-B3-G3-H10 MONOKLONAL ANTİKORUNUN EGFR ÜZERİNDE FOSFORİLE ETTİĞİ AMİNO ASİTLERİN BELİRLENMESİ.....	131
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>135</u>
6.1. TARTIŞMA	135
6.2. SONUÇ.....	148
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>150</u>
<u>EKLER</u>	<u>171</u>
Ek 1: ÇALIŞMA İÇİN ETİK KURUL KARARI	171
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>174</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>182</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kanserin özellikleri	3
Şekil 2.2. Kanserin yeni özellikleri ve kazanılan karakteristikleri	4
Şekil 2.3. Kanser türlerinin toplam insidans ve mortalite oranları dağılımı	10
Şekil 2.4. Erkeklerde kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları	11
Şekil 2.5. Kadınlarda kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları	11
Şekil 2.6. Türkiye'de kanser türlerinin toplam insidans oranları	12
Şekil 2.7. Türkiye'de kanser türlerinin kadın ve erkeklerdeki insidans oranları	13
Şekil 2.8. Kişiselleştirilmiş kanser tedavisi yaklaşımları	17
Şekil 2.9. Protein kinazların etki mekanizması	19
Şekil 2.10. Tirozin kinaz inhibitörlerinin etki mekanizması	20
Şekil 2.11. Bir tirozin kinaz inhibitörü olarak Gefitinib'in etki mekanizması	21
Şekil 2.12. Monoklonal antikor yapısının şematik gösterimi	30
Şekil 2.13. Monoklonal antikor geliştirme yöntemleri	34
Şekil 2.14. Monoklonal antikorların molekül yapıları bakımından pazar payları	38
Şekil 2.15. Yıllara göre onaylanan monoklonal antikor sayısı	39
Şekil 2.16. Yıllara göre kanser ve kanser dışı hedeflere karşı mAb geliştirme sayısı	39
Şekil 2.17. Monoklonal antikorların yıllara göre pazar büyüklüğü	40
Şekil 2.18. ErbB reseptörlerinin yapısı	42
Şekil 2.19. Epidermal büyüme faktörü reseptörü kromozomal lokasyonu	44

Şekil 2.20. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün yapısı	45
Şekil 2.21. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ligandlarının sinyalizasyon türleri	46
Şekil 2.22. Ligand aracılı EGFR aktivasyonunun moleküler mekanizma modeli	48
Şekil 2.23. Ligand aracılı dimerizasyon mekanizmasının kristal yapı modeli	48
Şekil 2.24. Ligand bağlanması ile aktive olan EGFR'ne bağlı alt sinyal yolları	49
Şekil 2.25. EGFR hedefli ajanların etki mekanizmaları	50
Şekil 3.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü dimerizasyon bölgesine özgün monoklonal Anti-EGFR antikoru geliştirilmesi için planlanan iş akış şeması.....	58
Şekil 4.1. Surf immüblotlama işlemi için hazırlanmış aparat görüntüsü	70
Şekil 5.1. Tez çalışmasına ait iş akış süreci.....	84
Şekil 5.2. 6xHis.EGFRd2 füzyon proteininin protein çözünürlük testi	85
Şekil 5.3. 6xHis.EGFRd2 füzyon proteinin protein çözünürlük testi.....	86
Şekil 5.4. 6xHis.EGFRd2 proteinin büyük ve küçük ölçekli üretimi sonrası protein analizi	88
Şekil 5.5. 6xHis.EGFRd2 proteinin büyük ölçekli üretimi sonrası immün blotlama analizi	89
Şekil 5.6. 6xHis.EGFRd2 proteinin saflaştırılması	90
Şekil 5.7. 6xHis.EGFRd2 proteinin BL21 (soldaki jel) ve RosettaGami (sağdaki jel) suşlarından saflaştırılması	91
Şekil 5.8. 6xHis.EGFRd2 proteinin 0,5 gr pelletten (sol panel) 0,75 gr pelletten (sağ panel) saflaştırılması.....	92
Şekil 5.9. Kolon başına 250 ml BL-21 bakteri kültürü ile gerçekleştirilen saflaştırma	93

Şekil 5.10. Fare L pozitif ve negatif serumlarından gerçekleştirilen titrasyon grafiği.....	94
Şekil 5.11. Fare N pozitif ve negatif serumlarından gerçekleştirilen titrasyon grafiği	95
Şekil 5.12. Fare R pozitif ve negatif serumlarından gerçekleştirilen titrasyon grafiği.....	95
Şekil 5.13. Fare R immünizasyon öncesi serum ile immün blotlama	96
Şekil 5.14. Fare R 3. immünizasyon sonrası serum ile immün blotlama	97
Şekil 5.15. Ticari EGFR antikoru ile immün blotlama.....	98
Şekil 5.16. Hibridoma süreç özeti	99
Şekil 5.17. Füzyon öncesi kültüre alınan F0 hücrelerinin günlük fotoğrafları	100
Şekil 5.18. Füzyondan 5 gün sonra oluşmaya başlayan koloniler	102
Şekil 5.19. Toplanan kolonilerin fotoğrafları	103
Şekil 5.20. Hibridoma kolonilerinin indirek ELISA testi absorban değerleri grafiği	105
Şekil 5.21. Surf-Blot ile taranan hibridoma supernatantları	106
Şekil 5.22. Aday hibridoma kolonilerinin stabilizasyon testleri indirek ELISA sonuçları grafiği	108
Şekil 5.23. CC4-B3 kolonisinin alt klonlama çalışmaları diyagramı	109
Şekil 5.24. CC4-B3 kolonisi ve CC4-B3-G3-H10 klon süpernatantları ile immunblotlama	110
Şekil 5.25. CC4-B3-G3-H10 antikorumun izotiplendirme sonucu	111
Şekil 5.26. FBS detoksu sırasında hücrelerin antikor salgılama durumları	112
Şekil 5.27. Birinci seri antikor saflaştırma süreci fraksiyonlarının OD280 ve OD450 değerleri.....	113

Şekil 5.28. Antikor saflaştırma sürecine ait fraksiyonların Coomassie blue boyaması ile analizi	114
Şekil 5.29. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikor üretici hücre hattının farklı pasajlarda antikor salgılama durumunun indirek ELISA testi sonucu	115
Şekil 5.30. İkinci seri antikor saflaştırma süreci fraksiyonlarının OD280 ve OD450 değerleri.....	116
Şekil 5.31. Üçüncü seri antikor saflaştırma süreci fraksiyonlarının OD280 ve OD450 değerleri.....	117
Şekil 5.32. İkinci seri antikor saflaştırma sürecine ait fraksiyonların Coomassie blue boyaması ile analizi	118
Şekil 5.33. Üçüncü seri antikor saflaştırma sürecine ait fraksiyonların Coomassie blue boyaması ile analizi	119
Şekil 5.34. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve EGFRd2 antijeni afinite eğrisi.....	120
Şekil 5.35. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun rekombinant ve endojenik EGFR'yi tanıma kapasitesinin immun blotlama ile belirlenmesi	122
Şekil 5.36. İkinci seri CC4-B3-G3-H10 antikorunun izotiplendirme sonucu	123
Şekil 5.37. Üçüncü seri CC4-B3-G3-H10 antikorunun izotiplendirme sonucu	123
Şekil 5.38. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın Caco-2 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki etkileri.....	125
Şekil 5.39. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın HT-29 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki etkileri.....	125
Şekil 5.40. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın MDA-MB-468 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri.....	126
Şekil 5.41. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri.....	127

Şekil 5.42. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın HeLa serviks kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri.....	127
Şekil 5.43. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın Caco-2 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki etkilerinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz grafiği	129
Şekil 5.44. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın MDA-MB-468 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkilerinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz grafiği	130
Şekil 5.45. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın HeLa serviks kanseri hücre hattı üzerindeki etkilerinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz grafiği	131
Şekil 5.46. CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab monoklonal antikorlarının EGFR üzerinde fosforile ettiği aminoasitlerin analizi	133
Şekil 5.47. CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab monoklonal antikorlarının EGF varlığında EGFR üzerinde fosforile ettiği aminoasitlerin analizi	134

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri ve ligandları.....	43
Çizelge 2.2. Tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar arasındaki uygulama farklılıkları.....	51
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları	59
Çizelge 4.2. Küçük ve büyük ölçekli gece boyu kültür şartları.....	64
Çizelge 4.3. Küçük ve büyük ölçekli EGFRd2 ekspresyonu indüklemeye şartları	65
Çizelge 4.4. Hücre hatlarının kültür koşulları	73
Çizelge 5.1. Hibridoma kolonilerinin indirek ELISA testi absorbans değerleri	104
Çizelge 5.2. Aday hibridoma kolonilerinin stabilizasyon testleri indirek ELISA sonuçları	108

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
APC	Adenomatozis Polipozis Koli
ATP	Adenozin trifosfat
Bax	Bcl-2 ilişkili X protein
BCA	Bikinkoninik asit
Bcl-2	B hücre lenfoma-2
BGG	Sığır gamma globülini
BH3	Bcl-2 homoloji 3
BSA	Sığır serum albümini
CO ₂	Karbondioksit
CTNNB1	Beta Katenin
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EGFRd2	Epidermal büyüme faktörü reseptörü alan 2
ELISA	Enzyme-Linked immunosorbent assay
Fab	Antijen bağlanma fragmenti
FBS	Fetal sığır serumu
Fc	Kristalleşebilir fragman
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
gr	Gram

HAMA	İnsan anti-fare antikorları
HAT	Hipoksantin aminopterin timidin
HCl	Hidroklorik asit
HGPRT	Hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz
HRP	Horseradish peroxidase
HT	Hipoksantin timidin
IFN- α	İnterferon alfa
IgG	İmmunoglobulin G
IL	İnterlökin
IPTG	İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
JAK	Janus kinaz 2
kDa	Kilodalton
LB	Luria bertani
M	Molar
MAPK	Mitojenle etkinleşen protein kinaz
MEM	Minimum essential medium
mg	Miligram
MHC	Majör histo-uyumluluk kompleks molekülü
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MWKO	Molecular Weight Cut Off
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Monosodyum fosfat
NEAA	Esansiyel olmayan amino asitler
NK	Doğal öldürücü
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS-T	Tween-20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PD-1	Programlanmış hücre ölüm proteini 1
PEG	Polietilen glikol

PI3K	Fosfoinositid-3 Kinaz
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa
Rb	Retinoblastoma protein
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SA- β -gal	Senesens ile ilişkili beta-galaktosidaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez
sn	Saniye
STE	Saline-Tris-EDTA
TAP	Antijen işleme ile ilişkili taşıyıcı
TBS	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TBS-T	Tween-20 içeren tris tamponlu tuz çözeltisi
TCA	Trikloroasetik asit
TGF- α	Dönüştürücü büyüme faktörü alfa
TMB	3,3',5,5'-tetramethybenzidine
TNF	Tümör nekroz faktörü
UV	Ultraviyole
V	Volt
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WST-1	4-[3-(4-Idophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate

1. GİRİŞ

Kanser, kardiyovasküler ve enfeksiyon hastalıklarından sonra tüm dünyada en çok ölüm insidansına sahip olan çok faktörlü bir hastalıktır. Kanser hastalığında tedavi protokolleri 1970'lerde cerrahi ve radyasyon tedavisi ile başlamış ve bunu 1980'lerde kemoterapi takip etmiştir. 1990'lara gelindiğinde geliştirilen kemoterapötiklerin kombinasyonu ile daha başarılı sonuçlar alınmıştır. 2000'li yıllara gelindiğinde ise özellikle insan genom projesi çıktılarının ilerleyen moleküler biyolojik araçlarla birleştirilmesinin ardından hedefli tedavi uygulamalarına başlanmıştır. Aynı zamanda bu hedefli tedavi ürünleri, mevcut etkinliği bilinen kemoterapötiklerle desteklenerek daha efektif sonuçlar elde edilmiştir. Günümüzde ise en güncel yaklaşım, onkogenlerin inaktivasyonunu sağlamada insan bağışıklık sistemini kullanarak gerçekleştirilen immünoterapi olmuştur (1–4). İmmünoterapi'de genel olarak beş farklı yaklaşım uygulanmaktadır. Bunlar; bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, adaptif T hücre tedavisi, sitokinler, kanser aşılı, onkolitik virüs tedavileri ve monoklonal antikorlardır. Monoklonal antikorlar, diğer immünoterapi yaklaşımlarına nazaran temel bilimler aracılığı ile geliştirilebilen en ideal terapötik ajanlardır (4–6).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), spesifik ligandların (EGF, TGF- α gibi) bağlanmasıyla aktive olan transmembran bir proteindir ve her biri birbiriyle yakından ilişkili transmembran tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2/Neu, ErbB3/HER3 ve ErbB4/HER4'tür (7). EGFR aktivasyonu kanser gelişiminde önemli bir role sahiptir. Birçok kanser türünde anormal hücre proliferasyonu, migrasyonu, invazyonu ve adhezyonu ile birlikte angiogeneze ve apoptozun inhibisyonuna sebep olmaktadır (8–11). EGFR'nün bu şekilde çok yönlü onkogen özelliği onu ilgili çekici bir hedef haline getirmiştir. Klinikte EGFR değişimlerine karşı geleneksel kemoterapötiklerin dışında hedefli tedaviler kapsamında küçük inhibe edici moleküller ve anti-EGFR monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Fakat gelişen birçok ekzonik EGFR mutasyonu kullanılan inhibitörlere karşı direnç gelişimine sebep olmaktadır. Örneğin; EGFR ekzon 20'de gelişen T790M mutasyonu tirozin kinaz inhibitörlerine karşı yüksek oranda direnç sebep olmaktadır (12–14). Bu ve bunun gibi durumlar monoklonal antikorları hedefe özgül etkili moleküller sınıfına dahil etmiştir. Anormal aktivasyonu, birçok karsinogenez sürecinin meydana gelmesine sebep olan EGFR, monoklonal antikor endüstrisinde en ilgi çekici hedeflerden biri haline gelmiştir. 2000'li yılların başlarında

Cetuximab ve Panitumumab onaylanarak klinikte kullanılmaya başlanmıştır. 2015 yılında ise Necitumumab monoklonal antikoruna onay almıştır (11–15). Bu monoklonal antikorlar, EGF ve TGF- α ligandlarının EGFR'ne bağlanmasını yarışmalı olarak engelleyip reseptör otofosforilasyonunu inhibe ederek aktivite gösterirler. Tüm bu monoklonal antikorlar, EGFR-EGFR dimerizasyonunu engellemeye yönelik bir mekanizmayla çalışmaktadır (15,16).

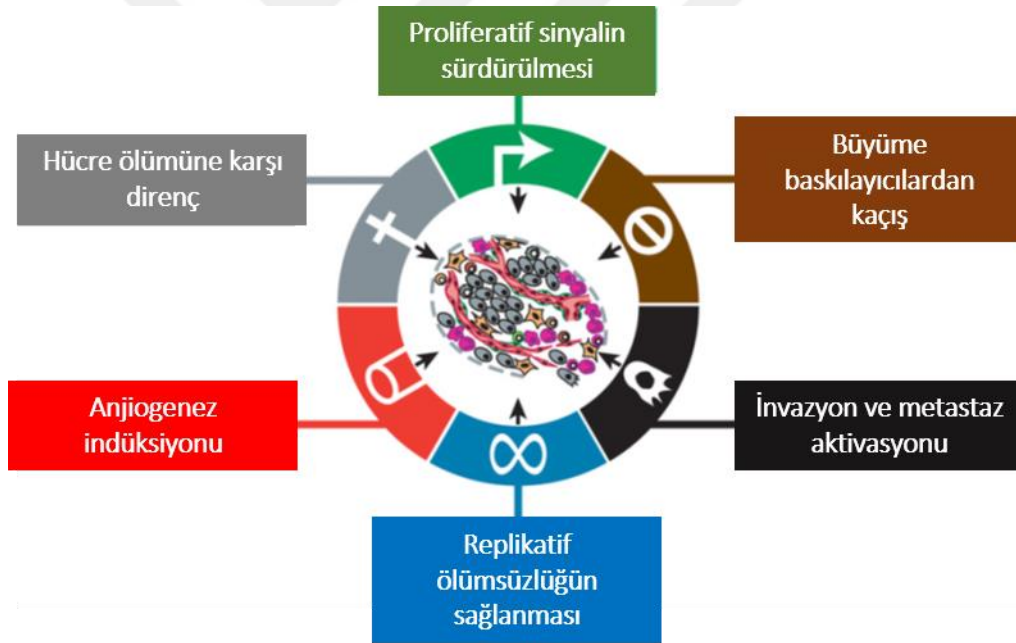
Son on yılda süregelen gelişmeler EGFR molekülüne karşı terapötik monoklonal antikor geliştirme çalışmalarının devam ettiğini göstermektedir. Monoklonal antikorların beraberinde getirdiği immünojenite, zayıf efektör fonksiyonları ve farmokokinetik problemlerinin aşılması için farklı bölgelerin seçimiyle daha efektif anti-EGFR hedef çalışmaları sürmektedir (17).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KANSER

2.1.1. KANSERİN ÖZELLİKLERİ

Kanser, genomdaki karmaşık modifikasyonları içeren çok faktörlü bir hastalıktır ve bir grup hücrenin, hücre bölünmesinin fizyolojik kurallarını göz ardı ederek kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü anormal bir durumdur (18). Laboratuvar ve klinikte tanımlanan hastalık özelliklerinin, sahip olduğu karmaşıklığın daha anlaşılır hale gelmesi için Hanahan ve Weinberg 2000 yılında kanserin karakteristik özelliklerini altı ana başlıkta belirlemiştir (19). Bunlar; i. Proliferatif sinyalin sürdürülmesi, ii. Hücre ölümüne karşı direnç, iii. Anjiogenez indüksiyonu, iv. Replikatif ölümsüzlüğün sağlanması, v. İnvazyon ve metastaz aktivasyonu, vi. Büyüme baskılayıcılardan kaçış (Şekil 2.1.).



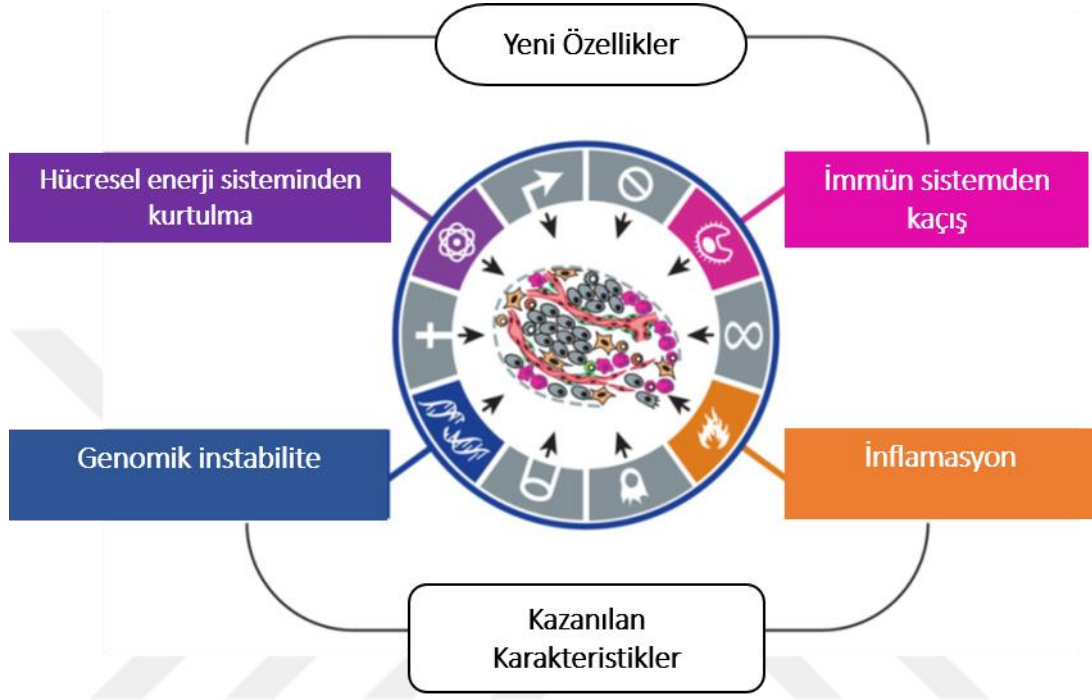
Şekil 2.1. Kanser özellikleri (20)

Belirlenen bu altı temel özellik kanser biyolojisini anlamak için sağlam bir temel oluşturmaya halen devam ederken, tıp ve teknoloji bilimlerindeki ilerlemeler on yıllık süreçte yeni birtakım güncellemelere olanak sağlamıştır. 2011 yılında bu altı özelliğe;

- i. İmmün sistemden kaçış ve

ii. Hücresel enerji sisteminden kurtulma olmak üzere iki yeni özellik eklenerek yeni nesil kanser özellikleri belirlenmiştir (20).

Ayrıca kansere olanak sağlayan iki yeni karakteristik ise inflamasyon ve genomik instabilite olarak belirlenmiştir.



Şekil 2.2. Kanser'in yeni özellikleri ve kazanılan karakteristikleri (20)

Hücre proliferasyonu, hücre büyümesi ve bölünmesi nedeniyle hücre sayısındaki artış anlamına gelmektedir. Kanser hücrelerinin bilinen en temel özelliği, **proliferasyonu kronik olarak sürdürme** yetenekleridir. Sağlıklı hücreler hücre büyüme ve bölünme döngüsüne girmeyi bildiren sinyalizasyonu dikkatlice kontrol edebilirler. Böylece hücre sayısının homeostazisini, normal doku mimarisi ve fonksiyonunun korunmasını sağlarlar. Hücre proliferasyonunun düzeni yaşam boyunca hücre içi sinyallerin koordinasyonu ile korunur ve hücre proliferasyonunun düzensizliği, tüm tümörlerin karakteristik özelliğidir. Düzensizlik mekanizmaları değişmekle birlikte, kaçınılmaz olarak hücre içi sinyal iletimindeki bozulmalar yoluyla olmaktadır. Bu bozulmalara mutasyonlar, amplifikasyonlar, aşırı ifade durumları ve kromozomal delesyonlar gibi değişimler sebep olmaktadır. Bu değişimlerle ortaya çıkan düzensizlik hücre canlılığı ve enerji metabolizması gibi pek çok fizyolojik durumu da olumsuz yönde etkiler (20,21). Kanser hücreleri proliferatif sinyalizasyonu farklı mekanizmalarla sağlarlar. Aynı kökenli çoğalma

stimülasyonu ile sonuçlanan endojenik ligand üretimini sağlayabilirler veya diğer kanser hücrelerine çeşitli büyüme faktörleri sağlayarak tümörle ilişkili stroma içindeki normal hücreleri uyarmak için sinyaller gönderebilirler. Düzensiz artan büyüme faktörleri salınımı onkogenlerin aşırı aktivasyonuna sebep olarak karsinogenezi başlatır (20,22). Öte yandan somatik mutasyonlar hücre replikasyonu sırasında veya çevresel faktörlerin bir sonucu olarak ortaya çıkarlar. Özellikle yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte pek çok yeni somatik mutasyonlar tanımlanmıştır. Elde edilen veri setleri artık prognoz ilişkilerinden kanser alt tiplendirmesine kadar geniş bir ölçekte çıktılar sağlamaktadır. Büyüme faktörlerinde meydana gelen somatik mutasyonlar artan mutasyonel yük ile birlikte kontrolsüz hücre çoğalmasını ve bilinen onkogenlerin aktivasyonlarına sebep olmaktadır. Örneğin; Piccolo ve Frey'in COSMIC veritabanı üzerinde yaptıkları bir çalışmada; kolorektal kanserlerde APC, CTNNB1, KRAS, BRAF ve PIK3CA gibi hücre proliferasyonu ile doğrudan ilişkili genlerde meydana gelen somatik mutasyonlar analiz edilerek ayırt edici gen modellerine sahip kanser kümelerinin oluştuğu belirlenmiştir (23–25).

Kanser hücrelerinin bir başka özelliği ise **hücre ölümüne karşı kazandıkları dirençtir**. Organizmada farklı mekanistik yollarla hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Apoptoz veya programlı hücre ölümü, yaşlı veya işlev bozukluğu bulunan hücreleri organizmadan çıkarmanın doğal yoludur. Evrimsel olarak korunmuş, gelişim ve doku homeostazında önemli rollere sahip bir süreçtir. Kanser hücrelerinin genellikle apoptotik kaskadın aktivasyonuna direnmede önemli rol oynayan proteinlerin çoğunu aşırı ifade ettiği bulunmuştur (20,26,27). Apoptoz sinyal yolları ekstrasik (ölüm reseptör yolları) ve intrinsik (mitokondriyel yollar) olarak tanımlanmıştır. Karsinogenez sürecinde hücreler bu yollardaki değişikliklerle apoptozun neden olduğu ölüme maruz kalma yeteneklerini farklı mekanizmalarla kaybederler. Ölüm reseptörleri, hücre ölümünün ve sağ kalımın düzenlenmesi, farklılaşma gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip 20'den fazla protein içeren TNF reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptörlerdeki anormal değişiklikler, yüzey ekspresyonu azaltabilir veya tamamen yok edebilirler, böylece ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyalleşme kaskadlarına iletilmesini önlerler. Sonuç olarak hücre ölümüne karşı direnç gelişerek doğrudan tedaviye karşı da direnç gelişimi oluşur. Mitokondriyel yolaktaki pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküller üzerinde gerçekleşen değişiklikler de hücre ölüm direncine neden olur. Bcl-2 aşırı ekspresyonu, Bax veya BH-3

moleküllerinin inaktivasyonu gibi nedenlerle onkogenik sinyalizasyon artarak apoptoz direnci oluşmaktadır. Öte yandan kanser hücrelerinde IAP gibi apoptoz inhibitörleri aktif kaspaz 3 ve 7'ye bağlanıp kaspaz 9 aktivitesini önleyerek apoptozu engellerler (28,29).

Endojenik kimyasal sinyaller, hasar görmüş kan damarlarını onarmak için endotelial hücrelerin ve düz kas hücrelerinin işlevlerini koordine ederler. Normal **anjyogenez** süreçleri embriyo gelişimi, yara iyileşmesi ve organların sağlıklı perfüzyonu için çok önemlidir. Bununla birlikte, patolojik anjiyogenez süreçleri, çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Normal dokular gibi, tümörler de besinler ve oksijen gereksinimlerinin yanı sıra metabolik atıkları ve karbondioksiti boşaltmaya ihtiyaç duyarlar. Anjiogenez sırasında oluşturulan yeni kan damarları ise bu görevleri üstlenir. Bu tümör ekosistemindeki büyüme ve yayılma için ilk gereksinimlerden biridir. Bu süreçte dokulardaki bazal membran lokal olarak yaralandıktan sonra yıkım ve hipoksi başlar. Ardından, anjiyogenik faktörler tarafından aktive edilen endotel hücreleri göç edip çoğalarak stabilize olurlar. Kanser hücrelerinde anjiyogenik faktörler bu süreci sürekli hale getirirler. VEGF-A ve TSP-1 gibi anjiogenez süreç kontrol genlerinde hipoksi veya onkogenik sinyalizasyon sonucu ifade değişimleri gerçekleşmektedir. Değişen ifadelerle patolojik anjiogenez gelişerek kanser hücrelerinin aynı organın farklı bölgesine infüzyonuna veya farklı organlara metastaz yapmasına öncülük eder (20,30–32).

Kanser hücreleri makroskopik tümörler oluşturmak için sınırsız replikasyon potansiyeline ihtiyaç duymaktadır. **Replikatif ölümsüzlük** normal hücrelerde senesens mekanizmalarıyla sınırlandırılmıştır. Buna göre, tekrarlanan hücre bölünme döngüleri önce yaşlanmanın indüklenmesine ve daha sonra, bu engeli aşmayı başaran hücreler için popülasyondaki hücrelerin büyük çoğunluğunun öldüğü bir kriz fazına yol açmaktadır. Bazı durumlarda, hücreler krizdeki bir popülasyondan çıkar ve sınırsız çoğalma potansiyeli sergiler. Bu geçiş hücreler için ölümsüzlük olarak adlandırılır (20). Bu özellik, klonal soyların, artan proliferasyon hızına, invazyona ve tedavi direncini arttırabilen ardışık sapmalar elde etmesine izin verir. Hücrel senesensin çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlere katılımı sadece proliferasyon ile değil, aynı zamanda, hücre-hücre etkileşimleri ve çevre hücreleri etkileyen faktörlerin salgılanması ile de desteklenebilir. Senesens belirteçleri arasında SA- β -gal reaktivitesi, hücre döngüsü ile ilişkili Ki67 proteininin eksikliği, sikline bağlı kinaz inhibitörü p16^{INK4a}'nın (CDKN2A) yüksek düzeyde

ekspresyonu, DNA replikasyonu eksikliği ve trimetile histon H3 lizin 9 (H3K9me3) ve SASP faktörlerinin indüksiyonu sayılabilir (33–35). Öte yandan, sınırsız replikasyon potansiyeli, insan kromozomlarının uçlarında bulunan DNA'nın tekrarlayan “TTAGGG” dizileri olan telomerlerin durumu ile de ilgilidir. Normal hücrelerin her replikasyon turunda telomerleri kısalırken, tümör hücrelerinde telomer uzunluğu esas olarak bir RNA bileşeni (hTR veya hTERC) ve bir katalitik proteinden (hTERT) oluşan “telomeraz” adı verilen ters transkriptazın yeniden aktivasyonu yoluyla stabilize edilir (36).

İnvazyon ve metastaz aktivasyonu kanserin en enigmatik özelliklerinden biridir. İnvazyon-metastaz kaskadı olarak adlandırılan bu yapı uzak ikincil tümörlerin oluşumuna yol açan karmaşık sıralı, birbiriyle ilişkili bir süreçtir (37). Metastazın temel gelişim özellikleri sırasıyla; epitelyal polarite kaybı ve doku mimarisinin parçalanması, bazal membranın aşılması, tümör hücrelerinin kan ve lenfatik damarlara geçişi, tümör hücrelerinin damarlardan sızması, tümör hücrelerinin farklı bir organa migrasyonu ve son olarak burada kolonizasyonla metastatik özelliğin sürdürülmesidir (38). Metastatik faktörler olarak adlandırılan çeşitli genetik, anatomik ve fizyolojik durumlar kanser hücrelerinin metastaz fenotiplerini etkilerler. Bunlar hücre dışı matriks, integrinler, kadherinler, hücrel adezyon molekülleri, hücrel hareket faktörleri (motilite ve kemotaksi), epitelyal-mezenkimal geçiş, metastaz genleri, metastaz baskılayıcıları ve bazı proteinazlardır (39). Bu faktörlerde meydana gelen mutasyon veya düzensizlik şeklindeki anormallikler, primer tümörün ayrılmasına ve kanser hücrelerinin ikincil yerlere metastatik yayılma potansiyeline yol açabilir. Örneğin; invazif kanser hücrelerinde, kadherin ailesinin fonksiyonel düzensizliği ve özellikle epitelyal-mezenkimal geçişin anahtar molekülü E-cadherin (CDH-1, metastaz baskılayıcı gen) kaybı yaygın olarak gözlenmektedir. Oluşan doku yapısının gevşemesi ve artan hücrel değişimler nedeniyle epitel hücrelerinin oldukça mezenkimal bir karaktere sahip olması mümkündür (39,40).

Büyüme baskılayıcılarından kaçış, kanser hücrelerinin sınırsız replikasyon kabiliyeti kazanmasına ve tümör baskılayıcılar tarafından eliminasyon, büyüme durması ve yaşlanmadan kaçınmalarını sağlar. Tümör baskılayıcı genler normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümünü engellerler. Bu işlevler farklı moleküler elemanlar tarafından düzenlenmektedir. Rb ve p16 gibi hücre döngüsünün spesifik bir aşamasına ilerlemeyi kontrol eden hücre içi proteinleri kodlayan genler, TGF- β ve APC gibi hücre

proliferasyonunu inhibe eden sinyaller için reseptörleri veya sinyal çeviricileri kodlayan genler, BRCA1, p16 ve p14 gibi DNA hasarına veya kromozomal bozukluklara yanıt olarak hücre döngüsünün durmasını tetikleyen kontrol noktası proteinlerini kodlayan genler, p53 gibi apoptozu indükleyen proteinleri kodlayan genler ve MSH2 gibi DNA'daki hataları onarmada yer alan proteinleri kodlayan genler bunların başlıcalarıdır. Bu kritik proteinlerde meydana gelen anormal değişiklikler kanser gelişimiyle doğrudan ilişkilidir. Bulunan genetik değişikliklerin %70'inden fazlasının tümör baskılayıcı mekanizmalarından kaçınmayı temsil ettiği tahmin edilmektedir (41–43).

İmmün sistem tarafından kanserleşme sürecinin gözetimi (immunosurveillance) 1909 yılında Paul Ehrlich ve sonrasında 1970 yılında Frank Macfarlane Burnet tarafından açıklanmıştır. Buna göre; immün sistem gelişen tümörleri tanımlayıp kontrol altında tutarak elemine etmektedir. Son yıllarda kanserin moleküler biyolojisini anlamaya yönelik çalışmaların artmasıyla kanser ve immün sistem arasındaki kompleks ilişki düzeni de daha anlaşılır boyutlara ulaşmıştır. Kanserın immün gözetimi; immüdüzenleme (immune editing) adında gözetim ve gelişim aşamalarını kontrol eden dinamik bir süreç ile açıklanmıştır. Bu teori karsinogenez sürecinde immün sistemin eliminasyon-denge-kaçış şeklinde üç temel aşama ile çalıştığını ifade etmektedir. İmmüdüzenleme temel olarak eliminasyon, denge ve kaçış arasında değişen tümör ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimin bir sürekliliğini temsil eder (44,45). Her ne kadar immün sistem hastalığa sebep olan somatik mutasyonları dahi tanımlayabilecek, elemine edebilecek veya baskılayabilecek kadar kusursuz çalışsa da kanser hücreleri **immün sistemden kaçış** için pek çok immün tepkileri önleyici yol geliştirmiştir. Bazı regülatör T hücreleri tarafından tümör mikroçevresinde gerçekleştirilen immün baskılama, MHC1 ve TAP gibi kilit proteinlerin düzensizliği ile antijen işlev mekanizmalarının baskılanması, immün sistem baskılayıcı sitokinlerin (TGF- β , TGA- α ve bazı interlekinler) aşırı üretimi, apoptoz mekanizmalarını kullanarak sitotoksik T hücrelerine zarar vererek immün sistemden kaçma gibi mekanizmalarla işlev görürler (46–48).

Hücreşel enerji sisteminden kurtulma ya da diğeri bir ifadeyle hücreşel enerjisi sisteminin yeniden programlanması kanser hücrelerinin bilinen en eski özelliklerinden biridir. Otto Warburg 1923 yılında kanser hücrelerinin oksijen varlığında bile normal dokulara kıyasla çok yüksek derecede glikoz alımı ve laktat üretimi gösterdiğini bildirmiştir (Warburg

etkisi). Buna göre glikoliz sistemiyle, daha düşük verimlilikle fakat oksidatif fosforilasyondan daha hızlı bir oranda ATP üretilir. Bu daha hızlı ATP üretimi kanser hücrelerinin daha hızla çoğalmasına neden olmaktadır. Bunun için kanser hücreleri, glikolitik yolağa glikoz ve enzimleri almak veya bu enzimlerin spesifik izoformlarını kodlamak için glikoz taşıyıcılarını (Örneğin; en bilinen olarak GLUTs gen ailesinden GLUT1 veya glikolizin ilk aşamasını katalizleyen HKII enzimi) aşırı ifade etmektedir (49,50). Bu teori hücreler için oksijensiz ortamda yalnızca glikoz varlığı durumunda daha etkindir. Kanser hücreleri ATP üretimi için farklı özellikler de geliştirmiştir. Bir diğer metabolizma faaliyeti ise simbiyotik ilişki şeklinde gerçekleşir. Bir kanser hücresi, glikoz tüketerek ATP üretimi ile laktat üretir ve komşu kanser hücresi, TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyon yoluyla salgılanan laktatı tüketir. Bu şekilde laktat veya glutamin gibi ürünlerde ATP kaynağı olarak değerlendirilir (51–53).

Kansere olanak sağlayan iki karakteristik, yukarıda bahsedilen kanser özelliklerinin gelişmesini sağlayan yanıtları içermektedir. Bunlardan genomik instabilite, kanser hücrelerine tümörögenezi sağlayan genetik değişiklikleri yüksek mutasyon oranlarıyla kazandırır. Enfeksiyonlarla savaşmak ve yaraları iyileştirmek için tasarlanan doğal immün hücreler tarafından oluşturulan inflamasyonda, pek çok onkogenik sinyal yollarının tetiklenmesiyle tümör destekleyici fenotipler ortaya çıkarır (20).

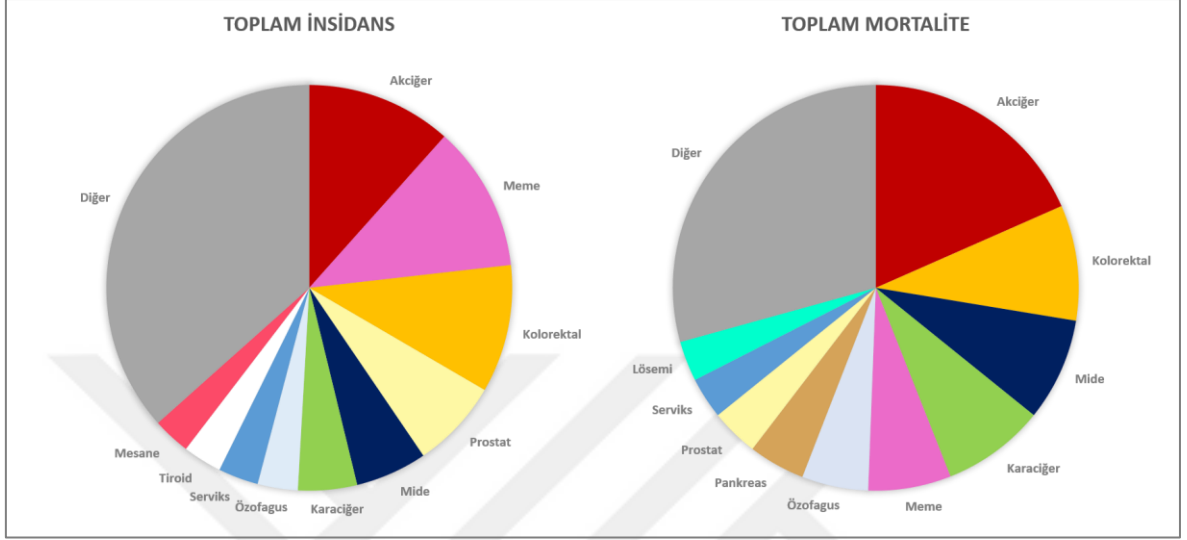
2.1.2. KANSER İSTATİSTİKLERİ

Yaş, cinsiyet, sebep, yıl ve coğrafyaya göre ayrılmış ölümler ve ölüm oranları hakkında karşılaştırılabilir bilgiler, bilinçli sağlık politikaları için bir başlangıç noktası sağlar. Tüm popülasyonlar için sağ kalımları geliştirmek ve yaşam süresini uzatmak, yerel ölüm hızı seviyeleri ve eğilimleri hakkında detaylı ve kanıta dayalı verilerle desteklendiği takdirde anlamlı olmaktadır (54). Ülkesel, kıtasal ve küresel çapta hastalıklara dair insidans bilgileri her geçen yıl daha yüksek çözünürlükle güncellenerek yetkili kurumlar tarafından yayınlanmaktadır.

2.1.2.1. Global Kanser İstatistikleri

Kanser hastalığı ile ilgili detaylı verileri küresel ölçekte Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı düzenli olarak yayınlamaktadır. En son yayınlanan 185 ülkeden 36 farklı kanser

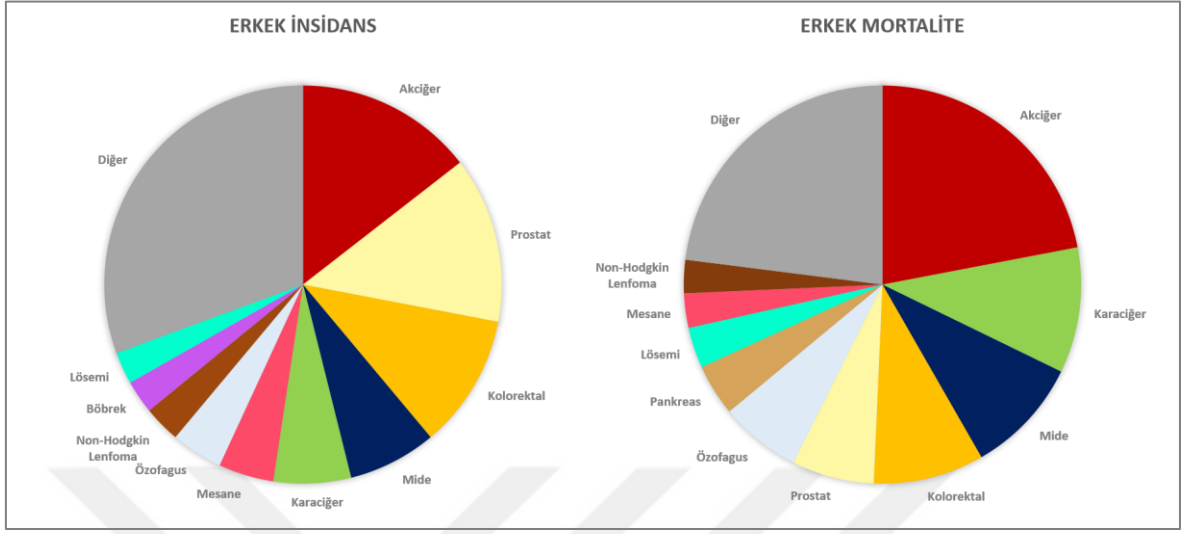
türüne dair global kanser istatistiklerine göre (GLOBOCAN 2018) 2018 yılında tahmini 18,1 milyon yeni kanser vakası ve 9,6 milyon kanser ölümü olacağı tahmin edilmiştir. Şekil 2.3.'te pasta grafiği görüldüğü üzere toplamda en sık teşhis edilen kanser %11,6 oranı ile akciğer kanseridir ve toplam kanser ölümlerinin %18,4'ü ile ilk sıradadır (55).



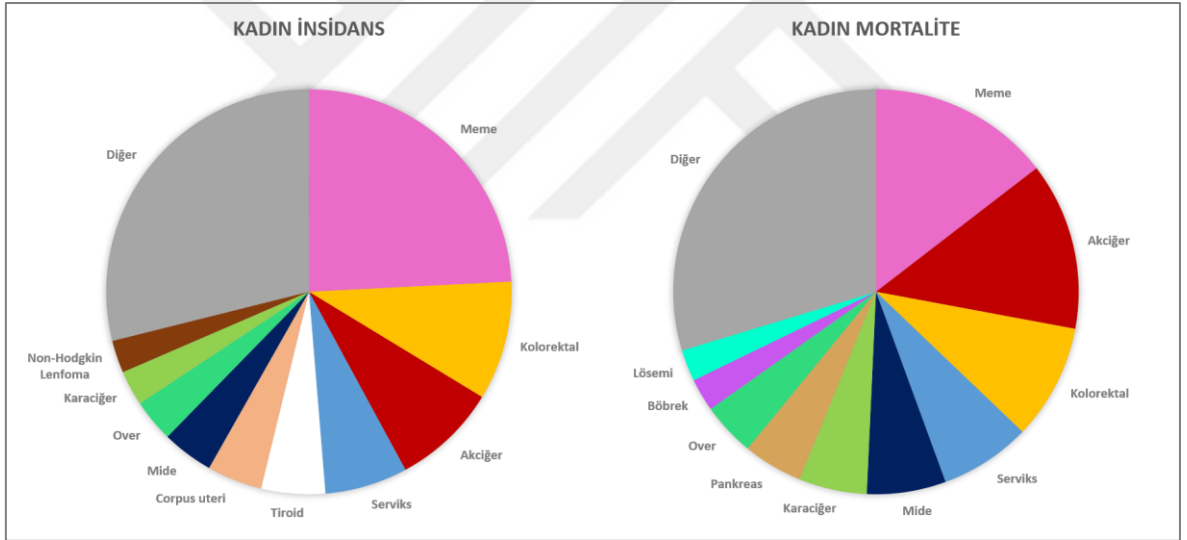
Şekil 2.3. Kanser türlerinin toplam insidans ve mortalite oranları dağılımı (55)

Kadınlarda en sık görülen üç kanser türü sırasıyla meme (%24,2), kolorektal (%9,5) ve akciğer kanseri (%8,4) iken (Şekil 2.5.), erkeklerde ise bu sıralama akciğer (%14,5), karaciğer (13,5) ve mide (%10,9) kanserleri (Şekil 2.4.) şeklindedir. Ölüm nedenlerinde de kadınlarda en sık ölüme sebep olan üç kanser türü sırasıyla meme (%15), akciğer (%13,1) ve kolorektal kanserler (%9,5) iken (Şekil 2.5.), erkeklerde ise akciğer (%22), karaciğer (10,2) ve mide (%9,5) kanserleridir (Şekil 2.4.). Bununla birlikte, en sık teşhis edilen kanser ve kanser ölümlerinin önde gelen nedenleri, ekonomik gelişme derecesine ve sosyal yaşam tarzı faktörlerine bağlı olarak ülkeler arasında ve her bölgede önemli ölçüde değişiklik göstermektedir (55). Örneğin; Dagenais ve arkadaşlarının beş kıtadan 21 ülkede orta yaşlı yetişkinlerde yaygın hastalık, hastane yatışları ve ölümlerdeki değişiklikler üzerine gerçekleştirdikleri prospektif bir kohort çalışmasında 35-70 yaşları arasındaki yetişkinlerde, kardiyovasküler hastalıklar global ölçekte başlıca ölüm nedeni olmuştur. Fakat yüksek gelire sahip veya bazı orta gelire sahip ülkelerde kanserden ölümler artık orta yaştaki ölümlerin önde gelen nedenlerinde kardiyovasküler hastalıklardan daha yaygındır. Birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklar azaldıkça, kanserden ölümlerin önde gelen ölüm

nedeni haline geleceği düşünülmektedir. Öte yandan yoksul ülkelerdeki yüksek ölüm oranlarının ise sağlık hizmetlerine daha az erişim ile ilgili olduğu tahmin edilmektedir (56).



Şekil 2.4. Erkeklerde kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları (55)



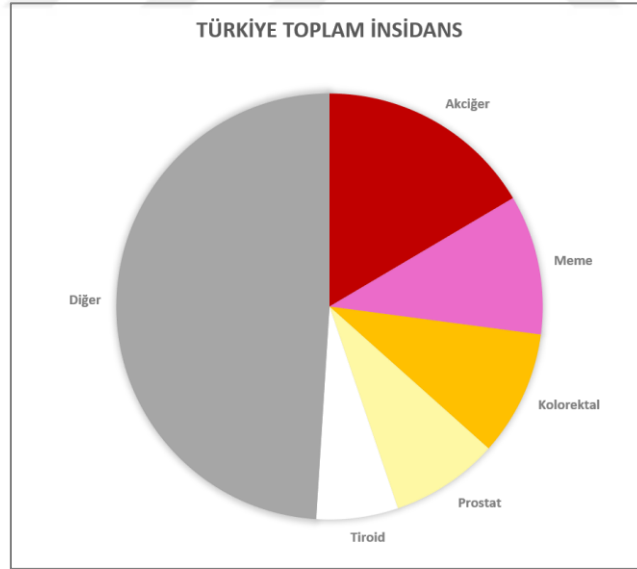
Şekil 2.5. Kadınlarda kanser türlerinin insidans ve mortalite oranları (55)

Amerika Birleşik Devletleri özelinde ise Amerikan Kanser Derneği'nin 2020 yılı kanser istatistikleri çalışmasına göre, her gün yaklaşık 4.950 yeni vakanın eşdeğeri olan yaklaşık 1.806.590 kanser vakası teşhis edilecektir. Prostat, akciğer ve kolorektal kanserler erkeklerde tüm vakaların %43'ünü oluşturmaktadır. Kadınlar arasında en yaygın 3 kanser ise meme, akciğer ve kolorektal kanserleridir. Yalnızca meme kanseri kadınlardaki kanserlerin %30'unu oluşturmaktadır. Erkeklerde konulan kanser tanılarının invazif olma oranı %40,1 iken kadınlarda bu oran %38,7'dir. Bu hafif farklılığın sebepleri bütün olarak

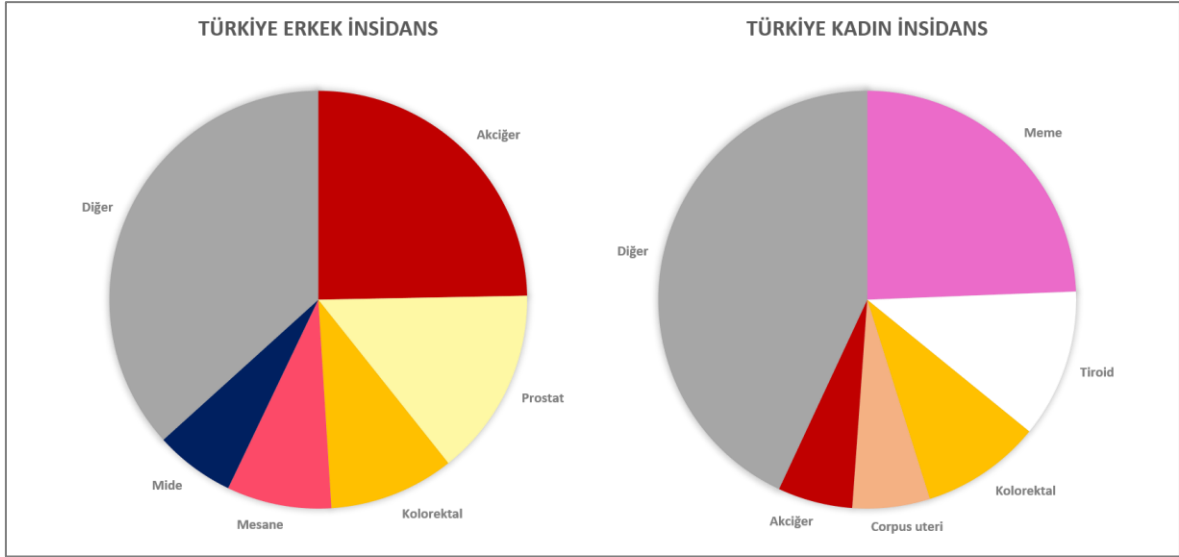
anlaşılamamıştır fakat çevresel maruziyetler ve endojen hormonlardaki değişimlerin bu etkiler arasındaki karmaşık etkileşimleri yansıttığı düşünülmektedir (57). Hastalıklara ait gözetim, takip ve veri kaydı gibi süreçleri objektif kurallara bağlı olarak yürüten ülkelerden elde edilen popülasyon bazlı veriler de yüksek çözünürlük içerdiği için en az küresel istatistikler kadar önem arz etmektedir.

2.1.2.2. Türkiye Kanser İstatistikleri

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı GLOBOCAN 2018 istatistiklerinde Türkiye için Ankara, Antalya, Bursa, Edirne, Erzurum, Eskişehir, İzmir, Samsun ve Trabzon Kanser Kayıt Merkezleri'ne ait verileri esas alarak hesaplamalar gerçekleştirmiştir. Buna göre Türkiye'de 2018 yılında 210.537 yeni kanser vakası görülürken, 116.710 kişi kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Türkiye'de de global ölçekte olduğu gibi toplamda en sık teşhis edilen kanser türü %16,5 (globalden %5,1 daha fazla) oranı ile akciğer kanseridir ve toplam kanser ölümlerinin %28,9'u (globalden %10,5 daha fazla) ile ilk sıradadır (Şekil 2.6.). Kadınlarda en sık görülen üç kanser türü sırasıyla meme (%24,4), tiroid (%9,5) ve kolorektal kanserler (%9,3) iken, erkeklerde ise akciğer (%24,7), prostat (14,6) ve kolorektal (%9,7) kanserleri şeklindedir (Şekil 2.7.) (58).



Şekil 2.6. Türkiye'de kanser türlerinin toplam insidans oranları (58)



Şekil 2.7. Türkiye'de kanser türlerinin kadın ve erkeklerdeki insidans oranları

Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye arasındaki farklılıklara bakıldığında, ülkelerde görülen kanser türleri, insidansları ve ölüm oranlarının doğrudan demografik ve coğrafi karakteristikler ile ilişkili olduğu açıkça görülmektedir. Bu durum kanserle mücadele her ülke için spesifik protokollerin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2.1.3. KANSERDE TEDAVİ PROTOKOLLERİ

Karsinogenez sürecinde tümörler oldukça heterojen fenotip sergileyerek farklı moleküler özellikler ve tedavilere çeşitli yanıtlar ile karakterize edilen karışık bir hücre popülasyonu oluştururlar. Bu nedenle, bu karmaşık olguların derinlemesine anlaşılması, kesin ve etkili tedaviler tasarlamak için temel öneme sahiptir (59). Kanser tedavi yöntemleri çeşitlidir ve farklı mekanizmalarla etkinlik gösterir. Tedavi seçimi ve süreci; tümörün büyüklüğü, derinliği ve evresi ile ilişkilidir. Onkoloji uzmanları, hastanın ve tümörün durumunu fizik ve biyolojiyi bağlantılı bir şekilde düşünerek tedavi stratejisini seçmekle sorumludur. Radyasyon onkoloğu, iyonizasyon tedavisini tek başına veya cerrahi, ilaçlar, oksijen ve ısı gibi diğer tedavi yöntemleriyle birlikte ele alır. Klinik uygulamadaki nihai çözüm ise multidisipliner bir yaklaşımla gerçekleştirilmektedir (60). Önceden, kanser sadece bulunduğu organlara veya basit histomorfolojik özelliklere göre sınıflandırılıyor ve tedavi protokolleri uygulanıyordu. Fakat insan genom projesinden elde edilen çıktılarla ve ileri düzeyde gelişme gösteren sekanslama teknolojileriyle birlikte son 15 yılda tedavi protokolleri daha akıllı ve hedefli hale gelmiştir. Bu teknolojilerin temel amacı; hızlı,

ekonomik ve doğruluk payı yüksek veri eldesiyle, bu verilerin biyoinformatik çözümlerle anlamlandırılması sonucu tümöre özgü moleküler anormalliklerin doğru, etkili ve potansiyel olarak daha az toksik tedavilerle hedeflenebilmesidir (61).

Tüm dünyada tıbbi tedavi çalışmalarının çoğunluğu kansere odaklanmış durumdadır. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemleri halen en yaygın kullanılan protokollerdir. Geleneksel kanser tedavi yöntemlerinin beraberinde getirdiği yan etkiler yeni nesil tedavi arayışlarına neden olmuştur. Hormon bazlı tedaviler, hedefli ilaç tedavileri, immünoterapi ve bunların çeşitli konjugatları bazı modern tedavi seçeneklerini oluşturmaktadır (18).

2.1.3.1. Cerrahi

Cerrahi, kanserin en eski tedavi şeklidir. Zaman içerisinde gelişen teknolojilerle cerrahi müdahale yöntemleri de değişiklik göstermiştir. Esas olarak uygulama dönemi 19. yüzyılın başlarına dayanmaktadır. Radikal mastektomi 1891 ile 1981 yılları arasında yaklaşık 90 yıl boyunca meme kanserini tedavi etmek için kullanılmıştır. 1980'li yıllara kadar radikal cerrahi kullanımı yaygınken, 1980 ve sonrasında geliştirilen kemoterapötiklerle daha az invazif ve hastanın yaşam kalitesini daha az etkileyen lokal cerrahi uygulamalarına geçilmiştir (62,63). Cerrahideki kritik nokta; başarılı bir tümör rezeksiyonu için geride negatif bir kanser hücre marjı elde etmek hayati önem taşır, çünkü ameliyat sonrası bölgede kanser hücrelerinin varlığı tümör nüksünün önemli bir nedenidir ve kötü prognoza yol açar. Bu nedenle tümör lokasyonunun keskin bir şekilde belirlenerek optimal bir bölgesel müdahale için bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve pozitron emisyon tomografisi gibi görüntüleme tekniklerinin ameliyat öncesi kullanımı başarı oranlarını artırmıştır. Halen bu alandaki biyomedikal teknolojiler gelişmeye devam etmektedir. Günümüzde floresan tabanlı, gerçek zamanlı tümör görüntüleme sistemleri gibi teknolojiler kullanıma girmiştir (64). Her geçen gün daha da gelişen robotik ve görüntüleme sistemlerinin entegrasyonu ile minimal invazif cerrahi teknikleri de (laparoskopik cerrahi) artan bir ivme ile pek çok kanser türünde başarı ile sonuç vermektedir (65).

2.1.3.2. Radyoterapi

Kanserlerde radyoterapi ile tedavi, lokalizasyonu belirlenmiş bir tümör hacmine lethal dozlarda uygulanan iyonizasyon radyasyonundan oluşur. Radyasyon kanser hücre DNA'sına çevredeki normal dokulara mümkün olan en az hasarla zarar vererek hücre ölümüne yol açar. Bunu doğrudan DNA zincirine hasar vererek veya dolaylı yoldan vücutta çeşitli serbest radikallerin gelişimi yoluyla gerçekleştirir. Radyoterapi, tüm kanser vakalarının neredeyse %50-60'ının tedavi süreçleri için gerekli bir protokoldür. Özellikle cerrahi girişimden sonra yukarıda bahsedilen muhtemel olarak bölgede kalan kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması için gereklidir. Ayrıca kemoterapötikler veya diğer hedefli tedavi ilaçlarının uygulaması süreçlerinde de destekleyici tedavi şeklinde uygulanmaktadır. Radyoterapi uygulama şekli ise hastanın genel durumu, kanser derecesi ve yayılımı, tedavi basamağı gibi koşullara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Radyoterapi de, Üç Boyutlu Konformal Radyoterapi, Yoğunluk Modülasyonlu Radyoterapi ve Görüntü Rehberli Radyoterapi gibi gelişen cihaz teknolojileriyle bağlantılı olarak günümüzde yaygın olarak kullanımı sürdürülen köklü bir kanser tedavi protokolüdür (60,66,67).

2.1.3.3. Kemoterapi

Kemoterapi tedavileri, kanser hücrelerini çoğalmasını kimyasal temelli antikanser ajanlarla inhibe etmek için kullanılır. Tedavide kullanılan kemoterapötik ajanların çoğu hücre bölünmesini veya DNA sentezini durdurma yoluyla işlev görür. Bu ajanlar sitostatik veya sitotoksik etki göstermek suretiyle farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Etki mekanizmalarına dayanarak, kemoterapötik ajanlar; alkilleyici ajanlar, anti-metabolitler, antrasiklinler, topoizomeras inhibitörleri ve mitotik inhibitörler olarak sınıflandırılabilirler (68,69).

Alkilleyici ajanlar, kanser tedavisinde en çok kullanılan kemoterapötiklerdir. Bu bileşikler hücrelere hem nükleer hem de mitokondriyal DNA'ya alkil gruplarının eklenmesiyle zarar verir. Alkilleyici ajanların oluşturduğu DNA hasarı, kanser hücrelerinin bölünmesini durdurur. Bu sebeple çok geniş spektrumda klinik kullanıma sahiptirler. Cyclophosphamide, Mechlorethamine, Melphalan, Cyclophosphamide, Cisplatin, Carboplatin ve Oxaliplatin alkilleyici kemoterapötik ajanlara örneklerdir (69–72).

Anti-metabolitler, nükleik asitlerin analoglarıdır. Bir pürine karşı mimik görevi görürler, bu da DNA veya RNA'ya bağlanmalarına olanak sağlayarak DNA replikasyonu ve hücre bölünmesine müdahale ile sonuçlanır. En bilinen ve yaygın kullanılan anti-metabolitler; 5-fluorouracil, Gemcitabine, Methotrexate olarak sayılabilir (69–72).

Antrasiklinler, daunosamin ve tetrahidronaftaliniyon bazlı olup, DNA veya RNA dizisinin baz çiftleri arasına girerek DNA ve RNA sentezini inhibe ederler. Serbest radikal oluşumu yoluyla DNA ve hücre zarına zarar veren türleri de vardır. Ayrıca DNA replikasyon enzimlerini (topoizomerez II gibi) hedefleyerek de işlev görürler. Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin ve Mitoxantrone bilinen antrasiklin kemoterapötiklerdir (69–72).

Topoizomerez inhibitörleri; topoizomerez I veya II'yi hedef alarak etki gösterirler. Her iki sınıf da DNA süper sarımını (DNA supercoiling) önlemek için DNA transkripsiyonunu bloke ederek çalışır. Topotecan, Irinotecan ve Etoposide topoizomerez inhibitörleridir (69–72).

Mitotik inhibitörler; doğal ürünlerden elde edilen kemoterapötiklerdir. Geneli doğal bitki alkaloidleridir. Hücre bölünmesi için gerekli moleküllerin sentezini, hücre döngüsünün mitotik fazında mikrotübüllere etki ederek durdururlar. Vinblastin, Paclitaxel ve Docetaxel bu gruba örnek kemoterapötiklerdir (69–72).

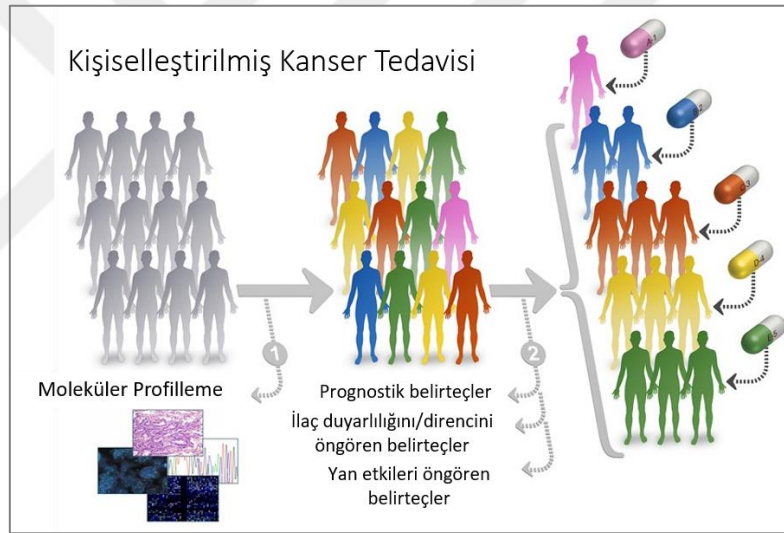
Kemoterapötik ilaçlar kanser hücreleri yanında normal hücreleri de hedef alır. Bu sebeple sindirim sistemi iltihapları, saç ve tırnak dökülmeleri ve immün sistemin baskılanması gibi yan etkilere sebep olurlar (68). Etkinlik düzeylerinin yüksek olması, sistemik uygulanaşı ve ulaşılabilirlikleri sebebiyle keşiflerinden bu yana klinikte yoğun olarak kullanımlarına devam edilmektedir. Fakat yukarıda belirtilen yan etkiler sebebiyle hedefli ve daha az yan etkili ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve halen sürdürölmektedir.

2.1.3.4. Hedefli Tedaviler

Kanser tedavi protokollerinin ana dayanak noktaları cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi olsa da klinikte etkinliklerini sınırlayan çeşitli dezavantajlara sahiptir. Cerrahinin hücresel düzeyde hassasiyeti düşüktür ayrıca metastaz durumlarında çözüm sağlayamayabilir. Radyoterapi sıklıkla çevre dokularında dolaylı hasara neden olur, bu da çeşitli yara komplikasyonları ve geç iyileşmelerle sonuçlanmaktadır. Kemoterapi ise genellikle

sistemik toksisitelere ve çeşitli ilaç dirençlerinin gelişmesine neden olur. Bu nedenle, dezavantajları ve yan etkileri daha az öte yandan daha fazla hedefe yönelik klinik ajanların geliştirilmesi çalışmaları doğmuştur (73).

Hedefli tedavilerin amacı, kanser hücrelerinin moleküler mimarisini, tümör gelişimin farklı aşamalarında belirlemek ve terapötik müdahaleye uygun özellikleri tanımlamaktır (Şekil 2.8.). Araştırmalar, kanserdeki spesifik moleküler hedeflerin fizyolojisini ve özelliklerini anlayarak, tümör büyümesini ve ilerlemesini inhibe etmek için potansiyel moleküler stratejileri belirlemek üzerine yoğunlaşmıştır. Bu süreçlerin temelini genomik analiz çalışmaları oluşturmaktadır. Sekanslama teknolojileri sayesinde normal ve malign hücrelerin genleri ve protein ekspresyonlarının karşılaştırması ile bu hücreler arasındaki genetik heterojenlik belirlenerek spesifik hedeflere yönelik ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları yürütülmektedir. (74).



Şekil 2.8. Kişiselleştirilmiş kanser tedavisi yaklaşımları (75)

Yukarıda bahsedilen hedefli tedavi süreçlerinin gelişmesinde; moleküler genetik, moleküler hücre biyolojisi, immünoloji ve biyoinformatik gibi bilim dallarının ortak katkılarıyla pek çok strateji ve terapötik ajanlar ortaya çıkmıştır. Günümüzde hedefli tedaviler kavramı artık genel bir başlığı yansıtmakta olup farklı mekanizmalara sahip pek çok alt bileşeni bulunmaktadır. Bu bileşenler dört ana başlık altında toplanmıştır:

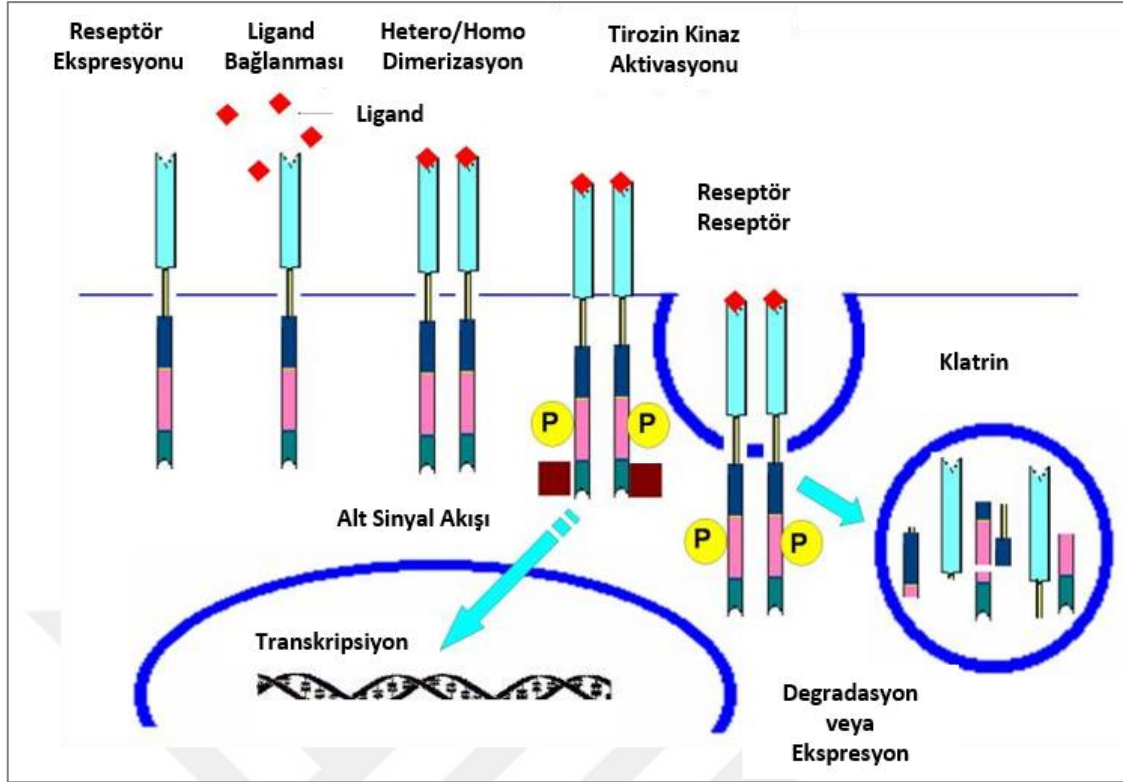
- i. Küçük moleküller
- ii. Gen terapi

- iii. Nanotaşıyıcı sistemler
- iv. İmmünoterapi

2.1.3.4.1. Küçük Moleküller

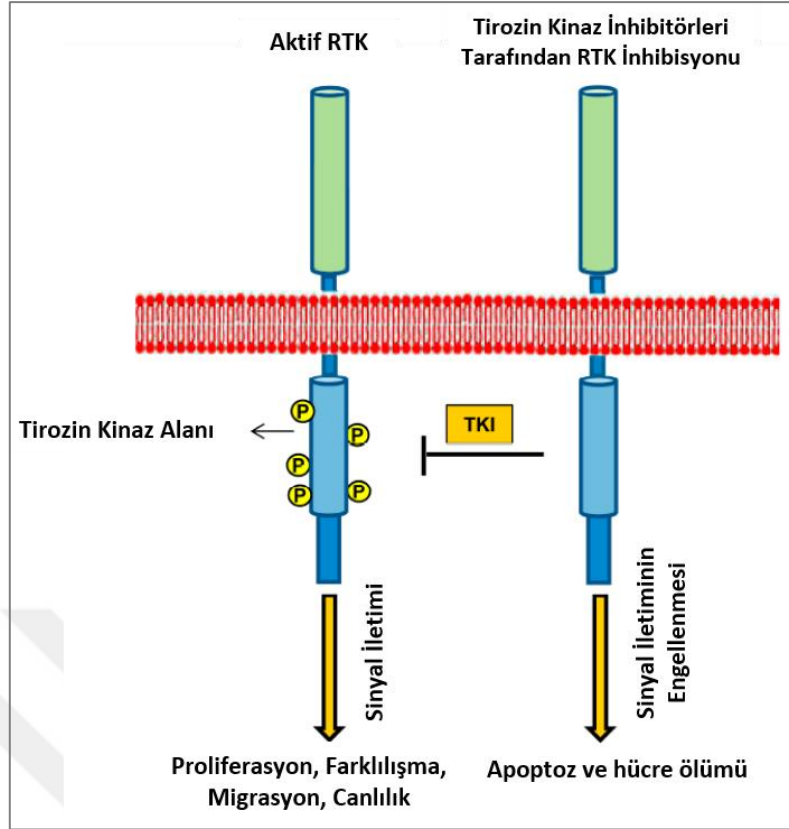
Küçük moleküller, düşük molekül ağırlığına sahip (genellikle 500-900 dalton arası), hücre membranından girerek hücre içi sinyal moleküllerini hedefleyen bileşiklerdir. Bilinen pek çok küçük moleküller özellikle reseptör tirozin kinazlar olmak üzere enzimlere müdahale edecek şekilde tasarlanmıştır. Ek olarak, hücre döngüsü kontrol noktasını etkinleştirmek, apoptozu tetiklemek ve DNA onarımını koordine etmek için proteazomları, sikline bağlı kinazları ve poli ADP-riboz polimeraz inhibitörlerini hedeflemek için de küçük moleküller tasarlanmıştır (73,74).

Protein kinazlar, ATP'den bir fosfat grubunun tirozin, serin veya treonin rezidülerine fosforilasyon ve transferinde yer alan enzimlerdir. Protein fosforilasyonu, hücre aktivitelerinin düzenlenmesindeki en önemli olaylardan biridir. Farklı protein kinazlar arasında, reseptör tirozin kinazlar ise hücre içi kinaz alanına bağlı bir transmembran reseptörden oluşur (76). Tirozin kinazlar, protein kinazların bir alt sınıfıdır ve proteinin konformasyonel değişikliğine yol açarak fonksiyonunu etkileyen katalizörlerdir. Reseptör tirozin kinazlara ligand bağlanmasıyla indüklenen dimerizasyon, oto inhibitör elementlerin transotofosforilasyonuna neden olarak tirozin kinaz alanı içinde yapısal transformasyona yol açar. Fosforile tirozin yan zincirleri, fosfotirozin tanıma alanları içeren proteinler için bağlanma yerleri olarak işlev görür. Tirozin kinazlar da protein fosforilasyonu sonrası hücre büyümesini, farklılaşmasını, ölümünü ve bir dizi fizyolojik ve biyokimyasal süreci düzenlemek için sinyal aktarırlar (Şekil 2.9.). Literatürdeki pek çok çalışma proto-onkogen ve onkogen ürünlerinin %50'sinden fazlasının tirozin kinaz aktivitelerine sahip olduğunu göstermiştir. Bu durum doğrudan tümörogeneze yol açmaktadır. Ayrıca çeşitli büyüme faktörlerine, sitokinlere ve hormonlara hücre sel yanıtta görev alırlar (77–79). Bu şekilde pek çok tümör büyüme mekanizmalarından sorumlu olan tirozin kinazlar kanserde ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarının odak noktası haline gelmiştir.



Şekil 2.9. Protein kinazların etki mekanizması (80)

Tirozin kinaz inhibitörleri, kanser hücrelerinin büyüme faktörü sinyal yollarını çeşitli mekanizmalarla inhibe ederek işlev görürler. Dimerizasyon için ATP veya substrat ile rekabet ederler ve aynı zamanda allosterik olarak da hareket edebilirler. Tirozin kinaz inhibitörleri özellikle seçici olarak malign değişime uğramış hücrelere özgün olarak ATP'nin veya substratlarının bağlanmasına müdahale ederek tirozin kinaz alanının katalitik aktivitesini inhibe etme yoluyla karsinogenezi durdururlar (Şekil 2.10.) (76,81).



Şekil 2.10. Tirozin kinaz inhibitörlerinin etki mekanizması (76)

İmatinib; Bcr-abl tirozin kinazına karşı geliştirilen ve FDA tarafından klinik kullanımına 2001 yılında onay verilen ilk tirozin kinaz inhibitörüdür. Tirozin kinaz inhibitörleri; tirozin kinazın katalitik bağlanma sahasında rekabetçi ATP inhibisyonu sağlayarak aynı etki mekanizmasını paylaşıyor olsalar da hedeflenen kinazların spektrumunda, farmakokinetiğinin yanı sıra bileşiğe özgün yan etkiler bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler (82). Tirozin kinaz inhibitörleri geliştirildikleri hedeflere ve jenerasyonlara göre kategorize edilmektedir. Majör tirozin kinaz hedefleri arasında Bcr-Abl, EGFR, VEGFR, PDGFR gibi onkogenik fonksiyona sahip hedefler bulunmaktadır. Bu hedeflere karşı geliştirilen bazı inhibitörler;

Bcr-Abl tirozin kinaz inhibitörleri; İmatinib, Nilotinib, Dasatinib, Ponatinib, Bafetinib

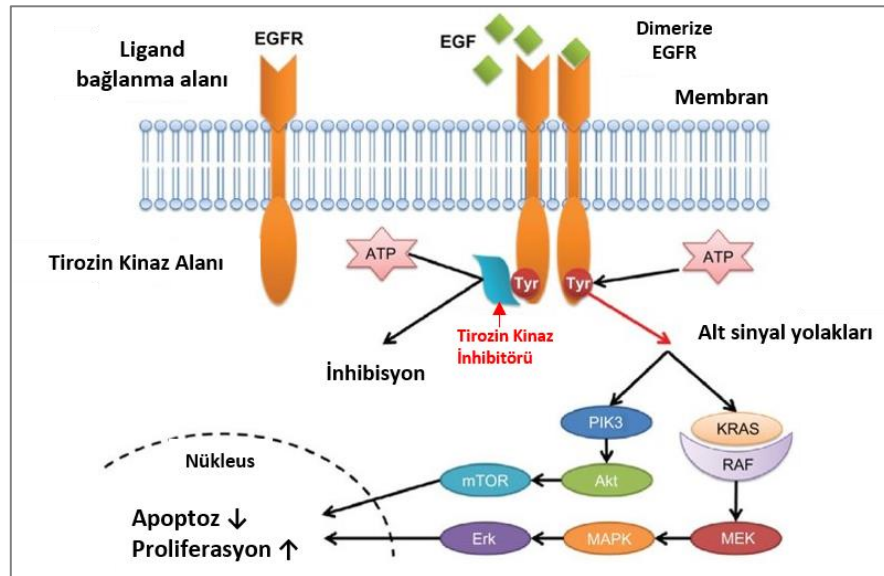
EGFR tirozin kinaz inhibitörleri; Gefitinib, Erlotinib, Afatinib, Neratinib, İcotinib hydrochloride, Lapatinib, Canertinib, Dacomitinib, Osmertinib

VEGFR tirozin kinaz inhibitörleri; Vatalanib, Tivozanib, Cediranib, Pazopanib

PDGFR tirozin kinaz inhibitörleri; CP-673451, Crenolanib şeklindedir.

İmatinib ve Gefitinib gibi birinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri geri dönüşümlü, yarışmalı ve çoğunlukla tek hedefli inhibitörlerdir. Afatinib ve Dasatinib gibi ikinci nesil inhibitörler ve Osimertinib gibi üçüncü nesil olanlar çoğunlukla geri dönüşümsüz, kovalent ve çoklu hedeflidir (81). Her bir inhibitör farklı biyolojik, farmakolojik ve farmakokinetik özelliklere sahiptir.

Örneğin; Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörleri karsinogenezde önemli işlevlere sahip en önemli reseptör tirozin kinazlardan birini temsil eder. EGFR, ERBB reseptörü tirozin kinaz süper ailesinin bir transmembran glikoproteinidir. Tirozin kinazlar aracılığıyla PI3K-PTEN-AKT, MAPK, ERK ve JAK/STAT yollarında bir fosforilasyon akışına aracılık eder (79). Gefitinib, epitelyal hücre tipi kanserlerde eksprese edilen seçici bir EGFR tirozin kinaz inhibitörüdür. EGFR tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu; tümör büyümesini, metastazı ve anjiyogenezi önleyerek anti-kanser etkinlik sağlamada önemli bir stratejidir (77). Oral olarak uygulanan Gefitinib, kanser hücreleri tarafından alınır ve ATP'nin EGFR'nün hücre içi alanındaki ATP bağlama bölgesinin fosfat bağlama döngüsüne bağlanmasını geri dönüşümlü ve yarışmalı bir şekilde inhibe eder. Böylelikle ATP'nin EGFR'ne bağlanmasını inhibe ederek otofosforilasyon ve aşağı sinyal yollarının aktivasyonunu baskılar. Sonuç olarak hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ve kanser hücrelerinde apoptozun indüklenmesine yol açar (Şekil 2.11.) (83).



Şekil 2.11. Bir tirozin kinaz inhibitörü olarak Gefitinib'in etki mekanizması (83)

Bu şekilde farklı hedeflere karşı farklı mekanizmalara sahip tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir ve yoğun bir şekilde daha efektif ve daha az yan etkili bileşikler üzerinde çalışılmaya devam edilmektedir. Bu tip küçük moleküller klinikte hem birincil tedavi olarak hem de diğer terapötiklerle kombine edilerek kullanılmaktadır.

2.1.3.4.2. Gen Terapi

Gen terapi, uygun genetik materyali hedef hücrelere veya dokuya iletmeyi ve eksprese etmeyi amaçlayan terapötik protokolleri içerir. Kansere için insan genom çözünürlüğünün artması ve ileri düzey ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesiyle birlikte pek çok çeşit gen terapi seçenekleri ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında; gen kusurlarının düzeltilmesi, gen terapisine dayalı bağışıklık modülasyonu, anti-angiyojenik gen terapisine, onkolitik viroterapi, anti-sens terapi, RNA interferans, apoptotik/onkogen/tümör baskılayıcı gen manipülasyonları, intihar gen terapisine ve CRISPR-Cas9 sayılabilir (84).

Gen terapi, bir hedef hücrede anormal gen veya genleri düzenlemeyi, değiştirmeyi veya silmeyi amaçlayan bir yaklaşım gerektirmektedir. Bu hedef hücreler, primer veya metastatik kanser hücreleri, dolaşımdaki tümör hücreleri veya dorman kök hücreler ve T hücre lenfositleri veya dendritik hücreler gibi spesifik hücreler olabilir. Genetik materyallerin hedef hücrelere girişi için ise viral veya viral olmayan (fizyolojik, kimyasal veya bakteriyel) taşıma sistemleri geliştirilmiştir. Genetik materyaller hedef hücrelere aktarıldıktan ve hücrenin DNA'sına dahil edildikten sonra, hedef hücre genlerinin susturulmasını, aşağı regülasyonunu, modifikasyonunu veya onarımını indükleyebilirler. Gen ekspresyonunun yoğunluğuna bağlı olarak, hücre ölümüne ve buna bağlı olarak tümör regresyonuna neden olurlar. Ayrıca hedef gende meydana gelen modifikasyon, kemoterapi, radyoterapi veya immünoterapi gibi sonraki kanser terapilerinden gelen yanıtı iyileştirebilir. Hedef genin onarımı, sonraki malignite veya kansere bağlı komplikasyonların önlenmesine yardımcı olabilir (85).

İlk ticarileştirilmiş gen terapi ürünü Gendicine; Rous sarkom virüsü promotörü altında yabancı tip p53'ü eksprese etmek üzere tasarlanmış bir rekombinant adenovirüstür. Öncelikli olarak baş boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılmıştır. Faz III klinik denemelerinde hastaların %64'ünde virüs radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanıldığında tümörün tamamen gerilediği gözlemlenmiştir. Kanser, devam etmekte olan

tüm gen terapi klinik denemelerinin %60'ından fazlasını oluşturmalarına rağmen, kanser gen terapisinin başarısı, monogenetik hastalıkların tedavisinde elde edilenin gerisinde kalmaktadır. Buradaki başlıca zorluklar arasında; değişimlerin genellikle poligenik olması, hastalar arasında ve hatta aynı hastanın farklı tümörlerinde dahi genetik varyasyonların bulunmasıdır. Öte yandan taşıma sistemlerinin farklı kanser türlerinde değişken etkinlikler göstermesi de diğer bir zorluktur (86).

2.1.3.4.3. Nanotaşıyıcı Sistemler

Nanotıp, kanser teşhis ve tedavisinde hızla gelişen bir alandır. Nanotaşıyıcılar; fiziksel özellikleri bakımından benzersiz biyolojik özelliklere sahiptir. Makromolekül veya küçük molekül yapıdaki anti-kanser ajanları taşıyabilen kolloidal nano ölçekli sistemlerdir. Böylece hedefli tedavinin dolaylı bir yaklaşımı olarak, bu anti-kanser ajanların normal dokulardan kaçınmasına ve tümörlerde birikmesini sağlarlar. Sonuç olarak direk hedefli tedavi ajanları gibi toksisitesi azaltılmış ve tümör bölgesinde birkaç kat daha yüksek bir sitotoksik konsantrasyona ulaşmaya aracılık ederler. Ek olarak; ilaçları bozunmaya karşı korurlar, kan dolaşımındaki yarı ömürlerini artırırlar, salım kinetiği kontrolünü sağlarlar ve çözünürlüğü artırırlar. Nanotaşıyıcılar esas olarak ilacın bir polimerik yapıya kovalent olarak bağlandığı veya konjüge edildiği polimer terapötiklerini ve partikül ilaç yapılarını içerir. Polimer-ilac/protein konjugatları, polimerik miseller, dendrimerler, polimerik nanopartiküller, lipozomlar ve karbon nanotüpler bilinen nanotaşıyıcı sistemlerdir (87).

Her ne kadar çoğu kanserin tedavisinde mevcut ilaç dağıtım sistemleri tarafından büyük ilerlemeler kaydedilmiş olsa da bu sistemlerin gelişimi temel bilimler noktasında kalmıştır. Taşıyıcıların çoğu küçük hayvan modellerinde tasarlanmış ve test edilmiş, buradan mükemmel terapötik sonuçlar elde edilmiştir fakat hayvan deneylerinin kliniğe translasyonu noktasında yetersiz kalmıştır. Bu araçların avantaj ve dezavantajlarını tam olarak anlamak için daha fazla klinik veriye ihtiyaç vardır (88).

2.1.3.4.4. İmmünoterapi

Sağlıklı bireylerde immün sistem ile kanser hücrelerinin dinamik bir dengede oldukları çok uzun zamandır bilinmektedir. Bu dengenin sürekliliğindeki karmaşık etkileşim tümörögenезin seyrini belirlemektedir. İmmün sistem anormal değişim fenotipi gösteren hücreleri yakalayıp elemine etmek üzere çalışırken, kanser hücrelerinin proliferasyonu,

invazyonu ve metastaz kabiliyetlerinin gelişimi immün sistemden kaçış yeteneklerine bağlıdır (89). Kanser hücreleri hastanın kendi hücrelerinden türevlenmiş olsa da normal hücreler tarafından anormal veya daha düşük seviyelerde eksprese edilen tümörle ilişkili antijenler tarafından yabancı olarak tanınır ve hedeflenirler. Bu özellik kanser hastalarında büyük ölçüde immün-tolerans ve immün-baskılayıcı tümör mikroçevresi nedeniyle bozulmaktadır. Bu mekanizma artık kanserin temel özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir. Kanser immünoterapisi pek çok farklı mekanizma ile bağışıklık sistemini doğrudan veya dolaylı olarak kanseri hedeflemek için kullanan kanser tedavi protokolleri içerir. İmmüno-onkoloji olarak da adlandırılan bu yaklaşım, hastanın kendi bağışıklık sistemini indükleyerek kanser tedavisi için bağışıklık sisteminin gücünü ve seçiciliğini kullanır (89,90). İmmünoterapi’de genel olarak beş farklı ana yaklaşım uygulanmaktadır. Bunlar; bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, adaptif T hücre tedavisi, sitokinler, kanser aşılıları, onkolitik virüsler ve monoklonal antikordur.

Bağışıklık kontrol noktaları, bağışıklık tepkisini azaltmak ve otoimmüniteyi önlemek için vücudun doğal frenleridir. Bu noktaların primer rolü, bağışıklık sistemi patojenlere yanıt verirken dokuları hasardan korumak ve kendi antijenlerine karşı toleransı devam ettirmektir. Bu olay T-hücresi aktivasyonu veya efektör fonksiyonlarının aşağı regülasyonu ile elde edilir. Tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçtığı birincil mekanizmanın bağışıklık kontrol noktalarını aşmak olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu bağışıklık kontrol noktaları veya diğer yardımcı uyarıcı reseptörler terapötik hedefler oluşturur. Bir immünoterapi olarak başarıyla hedeflenen ilk kontrol noktası reseptörü CTLA-4 (CD152)'tür. Aktive edilmiş T hücrelerinde eksprese edilir ve birincil işlevi, CD28 tarafından iletilen ko-stimülatör sinyale karşı koyarak (CD28 ile ligand bağlanması için rekabet eder ve afinitesi daha yüksektir) T hücresi aktivasyonunu inhibe etmektir. Bir anti-CTLA-4 monoklonal antikoru olan Ipilimumab, ileri melanom tedavisi için FDA onayı alan ilk bağışıklık kontrol noktası inhibitörüdür. Ipilimumab uygulaması sonucu T hücreleri çoğalmaya, sitokin üretmeye ve sitotoksik efektör fonksiyonlarını tümör mikroçevresinde uygulamaya devam edebilirler. Başka bir bağışıklık kontrol noktası reseptörü olan PD-1 ve bunların ligandları, PD-L1 ve PD-L2'nin hedeflenmesi diğer bir immünoterapötik yöntemdir. CTLA-4'e benzer şekilde PD-1, T hücresi aktivasyonu ve bağışıklık toleransı arasındaki dengenin düzenlenmesinde ve korunmasında kilit bir rol oynar. Bununla birlikte, CTLA-4'ün aksine PD-1 geniş bir şekilde eksprese edilir ve T hücrelerine ek olarak B hücreleri ve

NK hücreleri üzerinde de bulunabilir. Pembrolizumab ve Nivolumab, PD-1 ve ligandları PD-L1 ve PD-L2 arasındaki etkileşimi engelleyen monoklonal antikorlardır (89–92). Nitekim 2018 Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü, Dr. James Allison ve Dr. Tasuku Honjo'ya kanserde bağışıklık kontrol noktaları hakkındaki çalışmaları ve geliştirdikleri anti-CTLA-4 ve anti-PD-1 monoklonal antikorları sebebiyle verilmiştir (93).

Adaptif T hücre tedavisi, çoğunlukla tümöre özgü T hücrelerinin izolasyonunu ve *in vitro* olarak çoğaltılmasını ve ardından kanser hastasına aktarımını içeren başka bir immünoterapi türüdür. Birçok adaptif T hücre tedavi protokolü bulunmaktadır. Bunlar arasında; doğrudan tümörden elde edilen ve tümörü infiltre eden lenfositlerin kültürü, belirli bir T hücresi veya klonunun izole edilmesi ve çoğaltılması, tümörleri güçlü bir şekilde tanımak ve saldırmak için *in vitro* olarak tasarlanmış T-hücrelerinin kullanılması (kimerik antijen reseptörü T-hücresi (CAR T-hücresi) tedavisi) bulunmaktadır. Adaptif T hücre tedavisi melanom ve hematolojik malignitelerin yanı sıra solid tümörlerde yapılan klinik denemelerde dikkate değer sonuçlar vermesine rağmen, ciddi sitokin fırtınası ve serebral ödemler nedeniyle ölümlere sebep olmuştur. Yine de adaptif T hücre tedavisi son yıllarda hızla gelişen kişiselleştirilmiş bir immünoterapi yaklaşımını temsil etmektedir. Bununla birlikte, bu umut verici tedavi yönteminin daha fazla optimizasyonu, etkinliğini artırmak ve beraberinde getirdiği toksisiteyi azaltmak için elzemdir (94,95).

Sitokinler, moleküler ağırlıkları 30 kDa'nın altında olan, çeşitli hücrelere sinyaller sağlayan polipeptitlerdir. Sitokin hedef hücreleri, hücre zarlarında yüksek afiniteli reseptörleri eksprese eder. Sitokin bağlanmasını takiben bu reseptörler, gen transkripsiyonunda değişikliklere yol açan hücre içi sinyalleri tetikler. Sitokinler böylece çoğalmayı, farklılaşmayı ve belirli hücre fonksiyonlarını uyarır veya değiştirir. Terapötik olarak ise, bazı sitokinler, doğrudan anti-proliferatif veya pro-apoptotik aktivite ile ya da dolaylı olarak bağışıklık hücrelerinin tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini uyararak tümör hücresi büyümesini sınırlarlar. IFN- α ve IL-2 en bilinen anti-kanser sitokinlerdir (96). Pro-inflamatuar sitokinler, efektör T hücresi proliferasyonunu ve aktivasyonunu teşvik ederler. Klinik kullanım alanında tedavi için iki sitokin FDA tarafından onaylanmıştır. Bunlardan IL-2 böbrek hücre karsinomunda ve metastatik melanoma tedavisinde kullanım onayı alırken, IFN- α ise, bazı lösemi ve lenfoma hastalıkları için onaylanmıştır. İmmünoterapötik aktivite olarak IFN- α , MHC-I'in kanser

hücreleri üzerinde ekspresyonunu indükler ve dendritik hücrelerin olgunlaşmasını teşvik eder. Ayrıca efektör T hücrelerini, NK hücrelerini ve makrofajları aktive eder, böylelikle doğrudan tümör hücresi apoptozunu indükler ve tümör neovaskülatürünü değiştirir. IL-2 ile stimülasyon ise, NK ve T hücrelerinin çoğalmasını ve sitotoksitesini indükler ve B hücrelerinin farklılaşmasını teşvik eder. Bunların dışında klinik araştırma aşamasında olan IL-10, IL-12, IL-15, IL-21 gibi interleokinler bulunmaktadır (97).

Kanser aşıları, bir anti-kanser tepki ortaya çıkarmak için tümör antijenleri kullanılarak bağışıklık sisteminin spesifik olarak uyarılmasını sağlayan ajanlardır. Hastanın kendi bağışıklık sistemini kullanarak özellikle ileri evre kanserleri tedavi etmeyi amaçlayan immünoterapi türüdür. Profilaktik veya terapötik olarak iki ana kategoriye ayrılırlar. Profilaktik aşılar dolaylı yoldan anti-kanser fenotip gösterirler. En iyi örnekleri; karaciğer ve serviks kanserinin nedenlerinden olan hepatit B virüsüne ve insan papillomavirüsüne karşı profilaktik aşının üretilmesidir. Terapötik kanser aşıları konusunda ise; hücre aşıları (Tüm tümör hücresi, tümör hücresi lizatları, modifiye edilmiş tümör hücreleri), protein veya peptit bazlı aşılar, genetik aşılar (RNA, DNA veya viral), DC-tabanlı aşılar dahil olmak üzere farklı kanser aşı stratejileri geliştirilmiştir (98–100). Hücre aşıları otolog ve allojenik kanser aşıları olmak üzere iki farklı yaklaşım üzerinedir. Otolog aşılar için periferik kan hücreleri hastadan izole edilir ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör ile konjuge edilmiş bir prostat antijen prostatik asit fosfataz içeren rekombinant füzyon proteini ile *ex vivo* olarak aktive edilir ve hücreler tekrar PAP'a özgü T hücrelerini aktive etmek için hastaya infüze edilir. Bu hücreler kanserli hücreleri tanıyıp bağışıklık tepkisini tetiklerler. Allojenik aşılar ise, laboratuvar da yetiştirilen hücreler ile sağlanır. Bu tip bir aşının geliştirilmesi daha zordur, ancak daha endüstriyeldir (101,102).

Protein/peptid temelli rekombinant aşılar, belirlenen tümörle ilişkili antijenlere (TAA) dayalıdır ve genellikle bir adjuvan veya bir bağışıklık modülatörü ile birlikte uygulanır. Antijen veya antijen fragmanlarını uygulamanın bir başka stratejisi, ekspresyon kasetlerini taşıyan viral veya plazmid DNA vektörlerini kullanmaktır. Otolog tümör dokularından alınan RNA'lar spesifik bir sitotoksik T lenfosit tepkisi oluşturmak için kullanılabilir (98). Kanser aşılarını geliştirmek için yapılan önemli çabalara rağmen az sayıda kanser aşısı onaylı tedavi ürünü olarak kullanılmaktadır. Bunun temel sebebi

diğer immünoterapi yaklaşımlarına kıyasla daha zayıf klinik yanıtlar alınması olarak gösterilmektedir (99).

Onkolitik virüs tedavisi, kanser hücrelerinde virüslerin seçici olarak kopyalanmasına ve daha sonra normal dokuya zarar vermeden bir tümör içine yayılmasına dayanır. Mevcut onkolitik virüslerin çoğu, kanser hücrelerine yönelimi arttırmak ve sağlıklı konakçı hücreler için virülansı azaltmak üzere genetik olarak modifiye edilmiştir. Diğer immünoterapi yaklaşımlarına benzer şekilde onkolitik virüsler, kanser hücreleri üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak toksik, vasküler yapılanmaya karşı inhibitör ve diğer yardımcı anti-kanser tedavilerini güçlendirici gibi çok yönlü bir etki mekanizmasına sahiptir. Onkolitik virüsler aynı anda birden fazla onkogenik yolağı farklı sitotoksikite mekanizmalarıyla hedeflediği için ilaç direnci gelişimi olasılığı çok düşüktür. Kanser hücrelerine karşı selektif bir etkinlik gösterirler. Genel toksisite düzeyleri çok düşüktür. İlaç ve immün duyarlılık özellikleri modifiye edilebilir. Bunların yanında etkili onkoviral tedavi için en büyük zorluklardan biri yeterli ilaç taşınımı olmuştur. Sistemik intravenöz uygulama, intratümöral enjeksiyondan daha basit olup birden fazla tümörü aynı anda hedefleyebilse de düşük biyoyararlanım problemleri bulunmaktadır. Bunun üstesinden gelmek için antikor konjugasyonu veya nanopartiküller ile kaplama gibi sistemler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Şu anda tek FDA onaylı onkolitik virüs tedavisi, metastatik melanomada kullanım için Talimogene laherparepvec (T-Vec) olmakla birlikte, klinik öncesi ve klinik sürecinde birçok başka virüs geliştirilmektedir (103–107).

Monoklonal antikorlar, immünoterapi yaklaşımlarının en köklü ve klinik onkolojiye en başarılı transforme olan türüdür. Ayrı bir ana başlık altında detaylandırılmıştır.

2.2. MONOKLONAL ANTİKORLAR

Antikorlar, yabancı organizmaları veya antijenleri tanımlamak ve etkisiz hale getirmek için B hücreleri tarafından salgılanan immünoglobülin süper ailesine (IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM) ait glikoproteinlerdir. Terapötik monoklonal antikorlar ise tipik olarak immünoglobülin-g (IgG) izotipidir (108). Monoklonal antikorların laboratuvar ortamında üretimi ve karakterizasyonu ise tarihsel süreçte biyoteknolojik olarak kademeli bir esasa dayanır. Serum tedavisinin mucitleri Emil von Behring ve Shibasaburo Kitasato, 1890 yılında aşılamanın insanlarda serumlarında bazı yapılar keşfetmişlerdir. 1900 yılında Paul

Ehrlich canlı hücrelerin immün cevaplarını side-chain teorisi ile açıklamıştır. Ehrlich'in teorisi terapötik monoklonal antikorların geliştirilmesi sürecinde çok önemli bir zemin oluşturmuş ve halen geçerliliğini korumaktadır. 1955'li yıllara gelindiğinde Rodney Porter ve Gerald Edelman fare γ -globülinlerinden Fab (antijen bağlanma fragmenti) ve Fc (kristalleşebilir fragman) bölgelerini izole ederek, antikorların temel kimyasal yapılarını açıklamışlardır. Bu bulgu, antikorların işlevsel mekanizmalarını açıklayabilmek için en kritik basamak olmuştur. Antikorların varlığı ve özellikleri belirlendikten sonra araştırmacılar bu moleküllerin laboratuvar ortamında ne şartlarda üretilebileceğine yoğunlaşmışlar ve 1964 yılında Littlefield mutant hücreler kullanarak hibrit hücreler elde etmek için HAT (hipoksantin, aminopterin, timidin) seleksiyon besiyerinin ilk açıklamalarını yapmıştır. 1975 yılında Cesar Milstein ve Georges Köhler, immünize fare dalak hücreleri ile fare miyelom hücrelerinin füzyonu sonucu antikor üreten hibritler elde ederek hibridoma yöntemini tanımlamışlardır. 1980'lerin sonunda ise ilk monoklonal antikor olan Muromonab (anti-OCT4) FDA tarafından onaylanmıştır (109–111).

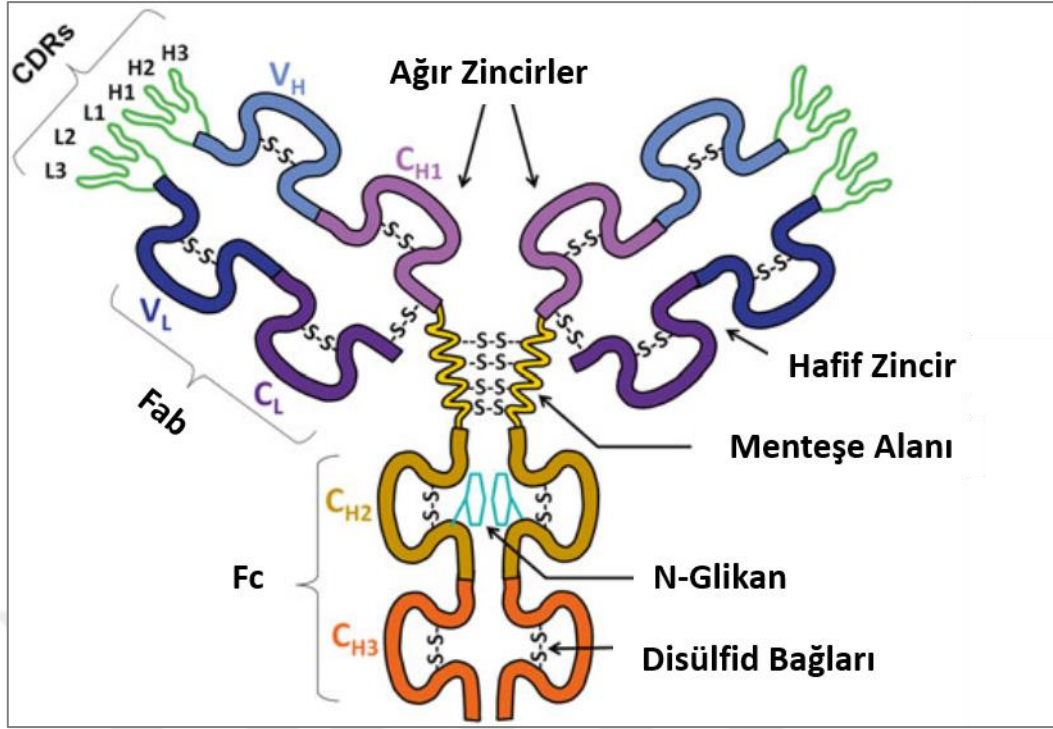
1980'den 2020'ye gelindiğinde ise toplam 79 farklı monoklonal antikor FDA tarafından onaylanmış, 570'den fazla terapötik monoklonal antikorun ise klinik faz çalışmaları devam etmektedir. 2008'den bu yana 48 yeni monoklonal antikor FDA tarafından onaylanmıştır ve 2017 sonunda klinik kullanımda toplam 61 monoklonal antikora ulaşılmıştır. 2018'den 2019'a kadarki bir yıllık süreçte FDA tarafından toplam 18 yeni terapötik antikor onaylanmıştır (112).

Monoklonal antikorlar, tüm klonların tek bir ata hücreden geldiği, tek tip immün hücreden üretilen ve her bir monoklonalin tek bir epitopa özgün olduğu antikorlardır. Hibridoma tekniği ile monoklonal antikorların laboratuvar ortamında üretilebileceğinin keşfinden sonra, bu ajanların pratikte kullanımı için çeşitli yollar geliştirilmiştir (109,110). Tıpta tanı ve tedavide oldukça spesifik moleküller olan monoklonal antikorların biyoteknolojik ürünlere dönüştürülmesi süreci artan bir ivme kazanmıştır. Monoklonal antikor aracılı tedaviler; başta kanser olmak üzere bulaşıcı hastalıklar, transplantasyon, alerji, astım ve bazı otoimmün hastalıkları kapsamaktadır. Bugün için tanıda da kullanılan çokça monoklonal bulunmaktadır. Hamileliğin 14. gününde çok düşük HCG seviyelerini tespit edebilen monoklonal antikorlar 1980'li yıllarda geliştirilmiştir. Bunun yanı sıra hepatit, grip, bakteriyel ve virütik birçok enfeksiyon da monoklonal antikorlar ile teşhis edilebilir

hale gelmiştir. Monoklonal antikorlar özellikle kanser tedavisi için önemli bir yöntemdir ve geniş spektrumda maligniteler için antitümör aktivite sergilemektedirler (113,114). Monoklonal antikorların kullanımındaki bir diğer avantaj da; farklı tipte moleküler biyolojik araçlarla kullanılabilir olmasıdır. Bir monoklonal antikor; ELISA, immünblotlama, immüno floresans boyama, akım sitometri ve immünpresipitasyon teknikleriyle aynı anda farklı verimler ve nitelikte sonuçlar verebilmektedir (115).

2.2.1. MONOKLONAL ANTİKORLARIN YAPISI

Monoklonal antikorlar, tek bir hücre sel klondan üretilen hedefe yönelik glikoprotein yapısındaki immünoglobulinlerdir. Monoklonal antikorların ağır zincirlerinin sabit bölgelerinde yer alan aminoasit dizilerindeki farklılıklar bunların sınıflandırmalarını sağlamaktadır. Bu sınıflar; IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE izotipleri olarak belirlenmiştir. Bu sınıflardaki yapısal farklılıklar ise antikorun fonksiyonlarını belirlemede rol oynamaktadır. Genellikle aynı sınıf içindeki immünoglobulinler benzer ağır zincirlere sahipken, hafif zincirler kapp (κ) ve lambda (λ) olmak üzere iki tipte sınıflandırılabilir (116). Şu anda klinik olarak kullanılan terapötik antikorların tümü immünoglobulin G (IgG) monoklonal antikorlarıdır ve aynı temel yapıya sahiptir. Tipik bir IgG antikorun toplam moleküler ağırlığı yaklaşık 150 kDa'dur. Şekil 2.12.'de şematize edildiği üzere disülfid bağları ile birarada tutulan ve sırasıyla her biri yaklaşık 50 kDa olan iki eş ağır zincirden ve her biri yaklaşık 25 kDa olan iki eş hafif zincirden oluşan simetrik Y şeklinde bir moleküldür. Ağır zincirler ayrıca bir değişken (variable region, V_H) ve üç sabit (constant region, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) alandan, hafif zincirler ise bir değişken (V_L) ve bir sabit alandan (C_L) oluşur. Değişken alanlar, tamamlayıcılığı belirleyen bölgeler (CDR'ler) adı verilen üç küçük peptid bölümünden oluşur. CDR'ler, spesifik antikor bağlanmasını belirleyen hiperdeğişken bölgelerdir (117–119). Ağır zincirin V_H ve C_{H1}, hafif zincirin ise V_L ve C_L bölgeleri antikorun kolu olarak da adlandırılan, Fab bölgesini (antijen bağlanma fragmanını) oluşturur. Ağır zincirin C_{H2} ve C_{H3} alanları, antikorun tabanı olarak da adlandırılan Fc (kristalleşebilir fragman) bölgesini oluşturur. Fab bölgelerindeki amino asit dizileri her monoklonal antikorda farklıdır. Bu özellik her antikor için özel bağlanma spesifitesini sağlar. Fc bölgeleri ise bir antikorun efektör fonksiyonlarını belirler (116).



Şekil 2.12. Monoklonal antikor yapısının şematik gösterimi (116)

C_{H1} ve C_{H2} bölgelerini bağlayan dizi, menteşe bölgesini (hinge region) oluşturur. IgG sınıfı ayrıca menteşe bölgesinin yapısına bağlı olarak IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 alt sınıflarına ayrılmaktadır. IgG1 daha güçlü efektör fonksiyonu, antikora bağlı sitotoksite aktivitesi ve diğer yapısal özelliklerinden dolayı ilaç üretimi için en yaygın kullanılan alt tiptir (116,118,120).

2.2.2. MONOKLONAL ANTİKORLARIN ETKİ MEKANİZMALARI

Terapötik monoklonal antikorların gelişimi keşiflerinden bu yana çok hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Mevcut antikor bazlı terapötikler; konjuge olmayan antikorları, antikor ilaç konjugatlarını, antikor bazlı radyokonjugatları, iki farklı antijeni tanıyan bispesifik antikorları, antikor fragmanlarını ve Fc füzyon proteinlerini içerir. Monoklonal antikorlar geleneksel olarak fare ve sıçan gibi kaynaklardan türetilir. Son zamanlardaki araştırmalar deve veya köpekbalığı gibi kaynaklardan da yalnızca ağır zincirlerden oluşan IgG antikorları (nanobody) üretilebileceğini göstermiştir. Bu doğal tek zincirli antikorlar farklı efektif özellikleriyle öne çıkmaktadır (121).

Terapötik IgG antikorları, bir antijene Fab zincirlerinin aktivitesi yoluyla bağlanan çok fonksiyonlu proteinlerdir, aynı zamanda kompleman bileşenlere ve Fcγ reseptörlerine Fc

ve menteşe bölgelerinin aktivitesi yoluyla bağlanırlar. IgG antikorları bu işlevlerini farklı etki mekanizması gerçekleştirerek hedefleri ve bağışıklık sistemi ile etkileşime girebilirler (122).

Bu mekanizmaların başlıcaları;

- i. Apoptoz indüksiyonu ile hücre ölümü
- ii. Ligand-reseptör etkileşiminin bozulması
- iii. Antikora bağımlı hücresel sitotoksosite ve fagositoz
- iv. Kompleman bağımlı sitotoksosite
- v. Reseptör internalizasyonu veya degradasyonudur.

In vitro çalışmalar, bazı monoklonal antikorların yüzey reseptörlerine bağlanarak ölüm sinyaline yol açan bir sinyalleme kaskadını başlatıp apoptoza aracılık ettiğini göstermektedir. Monoklonal antikorların bu etkinliği keskin olsa da sonuçlar yanıltıcı olabilir. Seçilen hücre hattının doğruluğu ve antikora duyarlılığı önemli etkenlerdendir. Aynı kanser türüne ait farklı hücre hatlarında çok değişken yanıtlar alınabilmektedir. Bu tür çalışmalarda hipotezi destekleyen çoklu mekanistik testlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir (122).

Ligand-reseptör etkileşimi, hücre proliferasyonu, adhezyonu ve migrasyonu dahil olmak üzere bir dizi hücresel olay için sinyalizasyonun transdüksiyonundaki ilk adımdır. Monoklonal antikorlar ligand ile yarışarak, liganda müdahale ederek, reseptör üzerinde etkinlik göstererek veya reseptör dimerizasyonuna müdahale ederek kanser üzerinde etkinlik gösterirler. Örneğin; bilinen anti-EGFR monoklonal antikorları, EGFR'nün hücre dışı bağlanma alanına, doğal ligandından daha büyük bir afinite ile bağlanan yarışmacı antagonistler olarak işlev görürler. Ligand ile yarışarak bağlanmasını bloke ederler ve EGFR ekspresyonunu aşağı regüle ederler. Anti-HER-2 monoklonal antikorları da benzer mekanizmayla çalışmaktadır. Ek olarak, bu antikorlar, HER-2 reseptörünün kendisiyle dimerizasyonunu (homodimerizasyon) ve ErbB ailesinin diğer üyelerine bağlanmasını (heterodimerizasyon) bloke ederler (123,124).

Monoklonal antikorların bir diğer terapötik aktivitesi, antikorum Fc bölgesinin Fc reseptörlerine ve komplementine bağlanan efektör fonksiyonlarından kaynaklanır. Bilinen üç farklı efektör fonksiyon mekanizması bulunmaktadır. Bunlar i. antikora bağımlı

hücrel sitotoksiste, ii. antikora bağımlı hücrel fagositoz ve iii. kompleman bağımlı sitotoksistedir. Benzer biyogeneze sahip bu üç mekanizma arasında, klinik çalışmalar birçok monoklonal antikorun kısmen antikora bağımlı hücrel sitotoksiste sağlayarak işlev gördüğünü gösterdiğinden ötürü klinik bağlamda daha ilgili hale gelmiştir. Monoklonal antikorlar, Fab kısımları vasıtasıyla hedef hücre yüzeyi üzerindeki spesifik antijenlerine bağlanabilir ve Fc kısımlarıyla efektör hücrelerle etkileşime girebilirler ve böylece efektörü bir hedefe bağlayan köprüler görevi görürler. Antikora bağımlı hücrel sitotoksiste mekanizması IgG, IgA ve IgE dahil olmak üzere çeşitli insan antikor sınıflarına aracılık edebilirken, IgG1 kanser terapötik antikorları için en çok kullanılan alt sınıftır. NK hücreleri, monositler, makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller ve dendritik hücreler en etkili efektör hücrelerdir. Bu efektör hücreler aktive edildikten sonra, üç temel mekanizma yoluyla hedef hücre ölümüne aracılık ederler; sitotoksik granül salımı, Fas sinyali ve reaktif oksijen türlerinin salınması. Terapötik antikorlardan rituximab, cetuximab, trastuzumab gibi pek çoğunun NK hücrelerinde FcγRIIIa aktivasyonu ile antikora bağımlı hücrel sitotoksiste başlattıkları belirlenmiştir (124–126).

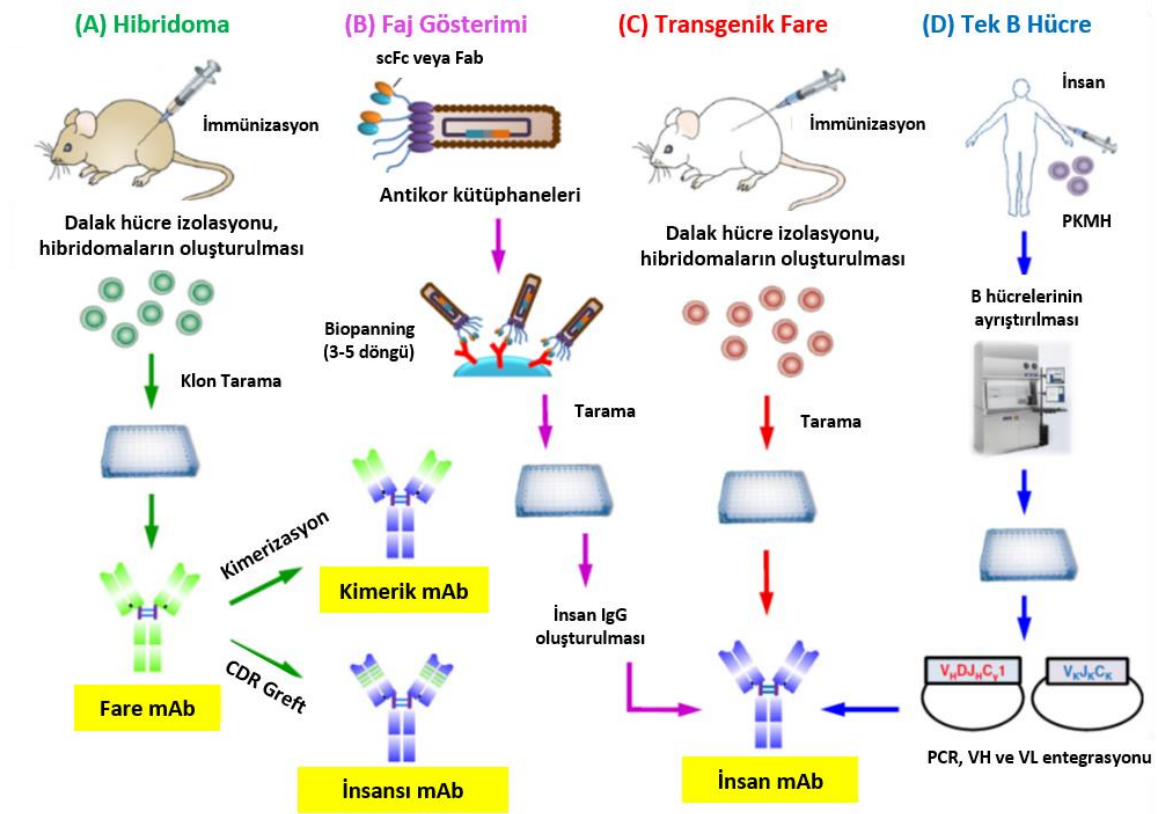
Bir antijene yüksek afinite ve spesifite ile bağlanmanın yanı sıra, hücre yüzeyindeki hedeflerin internalizasyonu genellikle bir antikorun fonksiyonel potansiyelini tanımlayan kritik özelliklerden biridir. Spesifik bağlanmayı takiben, bir antikor-reseptör kompleksinin etkili bir şekilde internalizasyonu terapötik etkinin önemli bir mekanizması olabilmektedir. Aşağı modülasyon ve daha sonra hücre yüzeyi üzerindeki reseptörlerin degradasyonu, tümör büyümesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilen reseptöre bağımlı sinyal inhibisyonu ile sonuçlanabilir. Tümöre özgü antikorlar ayrıca bir antikora konjüge edilmiş çeşitli sitotoksik ajanların hedef hücrelerin sitozolik bölümlerine aktarımı için bir araç sağlar. Tekli tedavilerin düşük etkinliklerinin artırılmasında da kombine tedaviler bu sisteme hizmet eder. Örneğin; EGFR hedeflemesinde cetuximab'ın %11, panitumumab'ın ise %8 oranında klinik yanıt verdikleri düşünüldüğünde, epitoplara örtüşmeyen antikorların kombine edilmesiyle daha etkin yanıtlar alınabilmektedir. Bu şekilde reseptör tirozin kinazların sinerjistik bir azalmış regülasyonu gözlenmiştir. Güçlü sinerjiyi artıran reseptör internalizasyonu ve azalmış regülasyonu elde etmek için, sadece farklı epitoplara bağlanmak üzere tasarlanmış iki monoklonal antikor, aynı zamanda optimum epitoplara için de konfigüre edilebilirler (124,127–129).

2.2.3. MONOKLONAL ANTİKOR GELİŞTİRME YÖNTEMLERİ

Monoklonal antikorlar, yüksek spesifisiteye sahip, çok çeşitli hücre dışı hedeflere başarılı bir şekilde bağlanma stratejisinin bir yolu olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanser, otoimmün hastalıklar, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisinde uygulamalara sahiptir. İlk monoklonal antikorlar hibridoma teknolojisi kullanılarak üretilmiştir ve günümüzde çoğunlukla bu hücrelerin kullanımıyla üretilmeye devam etmektedir. Ayrıca, ticari ölçekte monoklonal antikor üretimi için tasarlanmış bir dizi hücre ve mikroorganizmayı kullanan çalışmalar da vardır. Bu yeni metodolojiler, yeni üretim süreçleriyle birlikte gelişerek, yüksek ölçekte üretim olanakları sağlamaktadırlar (130).

Monoklonal antikorların geliştirme yöntemleri günümüzde dört ana başlıkta (Şekil 2.13.) yer almaktadır. Bunlar;

- i. Hibridoma,
- ii. Faj gösterim tekniği,
- iii. Transgenik farelerin kullanımı,
- iv. İnsan B hücrelerinin modifikasyonu yoluyla gerçekleştirilmektedir (112).



Şekil 2.13. Monoklonal antikor geliştirme yöntemleri (112)

Hibridoma teknolojisi, monoklonal antikor üretimi için özelleşmiş hücrelerin geliştirilmesi sürecidir. Hibridoma tekniğinde, laboratuvar hayvanları öncelikle üretimi hedeflenen antikora karşı tassarlanmış antijen ile immünize edilir. İmmünizasyon sonrası hayvandan dalak izole edildikten sonra B hücreleri ile polietilen glikol veya Sendai virüsü kullanılarak HGPRT geninden yoksun ve ölümsüzleştirilmiş miyelom hücrelerinin füzyonu gerçekleştirilir. Füzyon hücreleri HAT (Hipoksantin Aminopetrin Timidin) reaktifi içeren seçici besiyeri ortamında kültür edilir. Aminopterin nükleotid sentez yolağını bloke ederek HGPRT negatif hücrelere karşı selektif sitotoksikite gösterir. Seleksiyon sonrası füzyona girmemiş HGPRT'den yoksun miyelom hücreleri *de novo* ve yan (salvage) yollarıyla nükleotid üretmedikleri için ölür. Füzyona girmeyen B hücreleri de primer hücreler oldukları için birkaç gün içerisinde ölürlür. B hücrelerinden gelen HGPRT geni işlevsel olduğu için sadece B hücresi-miyelom hibridleri hayatta kalırlar. Bu hücreler antikor (B hücrelerinin özelliği) üretirler ve ölümsüzlerdir (miyelom hücrelerinin özelliği). Seleksiyon sonrası sağlıklı bir şekilde hayatta kalan hibridoma hücreleri alt klonlamalara tabi tutularak çoklu plakalarda kuyu başına tek hücre düşecek şekilde seyreltilir. Daha sonra bu hücreler üzerindeki süpernatantlar spesifik antijene karşı test edilerek antikor salgılama durumları

kontrol edilir. Bu testleri de geçen hücreler ilgili hedefe yönelik monoklonal antikor üreten hibridoma hücreleri olarak kabul edilir (131). Bu hücreler ana hücre hattı (master cell line) olarak adlandırılır. Erken dönemde çok sayıda stok alınarak uygun şartlarda saklanır. Bu hibridoma hücrelerinin büyük kültürü ile monoklonal antikor içeren hücre kültür besiyerleri toplanır ve bu besiyerlerinden monoklonal antikor saflaştırması yapılır. Monoklonal antikorların geliştirilmesinde kullanılan ilk teknik olmakla birlikte, halen en yağın kullanılan yaklaşımdır. Son zamanlarda mekanistiği aynı kalmak suretiyle daha etkili, hızlı ve güvenilir seçimler için yeni nesil hibridoma yöntemleri de ortaya çıkmaktadır. Örneğin; Tomita ve Tsumoto, B lenfositlerin hedef antijenler ile önceden seçimini ve hibridoma sürecinde füzyon hücrelerinin elektriksel uyarımlarla seleksiyonunu içeren yeni bir hibridoma teknolojisi geliştirmişlerdir (132). Listek ve arkadaşları ise, transgenik miyelom hücre dizisine dayanan antijene özgü hibridoma hücrelerinin seçimi için yeni bir yaklaşım belirlemişlerdir. Bu transgenik miyelom hücreleri üretilen antikorların izotip ve antijene spesifik bağlanması için yapay bir hücre yüzeyi belirteci taşıyarak antijene spesifik hibridomalar için etkili bir seçim ve doğrulama işlemi sağlamaktadır (133).

Faj gösterim tekniği, George Smith tarafından, lizojenik filamentöz bakteriyofajların yüzeyinde polipeptitlerin ifadesi için bir yöntem olarak 1985 yılında oluşturulmuştur. Gregory P. Winter ise bu tekniğin monoklonal antikor üretiminde kullanımını göstermiştir. O zamandan beri, bu yöntem büyük miktarlarda peptit, protein ve antikor üretmenin en etkili yollarından biri haline gelmiştir (134). Faj gösterimi ile monoklonal antikor üretimi B-lenfositlerin insanların kanından izole edilmesini, mRNA izolasyonunu ve tüm V_H ve V_L segmentlerini amplifiye etmek için cDNA'ya dönüştürülmesi ile başlar. Bu segmentler, kütüphaneye ek bir yardımcı faj aşılmasıyla yaklaşık 10^6 - 10^{11} hücre içeren bir kütüphane oluşturmak amacıyla *E. coli*'yi enfekte etmek için kullanılmadan önce bir bakteriyofajın PIII proteininin yanındaki bir vektöre (genellikle scFv olarak) klonlanır. Ardından V_H ve V_L segmentlerini içeren bakteriyofajlar *E. Coli* hücreleri tarafından salgılanır. Antijene karşı spesifik V_H ve V_L segmentleri biopanning denen ve tekrarlanan inkübasyon, yıkama, amplifikasyon ve bağlı fajın yeniden seçilme döngülerine dayanan bir afinite bazlı yöntem ile seçilir. Elde edilen monoklonal faj antikorlarının istenen bağlanma aktivitesini elde etmek için birkaç tur seçim döngüsü gereklidir. Plazmid içeren hücreler daha sonra izole edilir ve sekanslanır. Faj gösterim tekniği kullanımının pek çok avantajı bulunmaktadır.

Kütüphane oluşturulduktan sonra aynı kütüphane yeni antikörler oluşturmak için tekrar kullanılabilir, yeniden yapılması gerekmez. Deney hayvan gereksinimi yoktur ve geleneksel yöntemlerden daha hızlıdır. Ayrıca hayvan immünizasyonlarında toksisite yaratacak antijenlere karşı antikör geliştirme için kullanılabilir (134,135). Faj gösterim tekniği ile ilk üretilen anti-TNF α monoklonal antikoru Adalimumab, 2002 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Bugün için ise bu teknikle üretilen onaylı toplam 9 monoklonal antikör bulunmaktadır (112).

Transgenik hayvanlardan terapötik insan antikörleri üretimi bir diğer yöntemdir. İmmünizasyondan sonrası transgenik hayvanlardan çeşitli yüksek afiniteli insan monoklonal antikörleri elde edilebilirken, transkromozomik sığır gibi büyük hayvanlardan ise yüksek miktarlarda spesifik insan antikörleri üretilebilmektedir. İnsan antikör segmentlerini ifade eden hayvanları türetmek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (136). Transgenik ve knock-out fareler geliştirildikten sonra, farklı özelliklere sahip hayvanları elde etmek için çeşitli çaprazlamalar gereklidir. Özetle,

- i. İnsan Ig ağır zincirlerini taşıyan bir transgenik fare, endojen fare Ig ağır zincirlerinden yoksun bir fare ile çaprazlanır.
- ii. İnsan κ taşıyan bir transgenik fare, endojen fare κ 'lardan yoksun bir fare ile çaprazlanır.
- iii. İnsan λ taşıyan bir transgenik fare, endojen fare λ 'lardan yoksun bir fare ile çaprazlanır.

Bu çaprazlamalardan elde edilen fareler, endojen fare antikör segmentlerini içermeyen ve tamamen insan antikör parçalarından oluşan immunglobulinler elde etmek amacıyla birbirleriyle çaprazlanır. Elde edilen transgenler, geliştirilmek istenen hedefe karşı antijenle immünize edilerek hibridoma süreçleri devam ettirilir ve sonucunda tamamen insan monoklonal antikörleri elde edilir. Transgenik fare aracılı antikör geliştirilmesi daha çok özel şirketler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu süreçte kullanılan fare soylarının çok maliyetli olması, çaprazlamalar, farelerin bakım hassasiyeti araştırma laboratuvarlarındaki kullanım yolunu kısıtlamıştır (137). Transgenik bir fareden üretilen ilk terapötik insan monoklonal antikoru anti-EGFR Panitumumab, 2006 yılında FDA

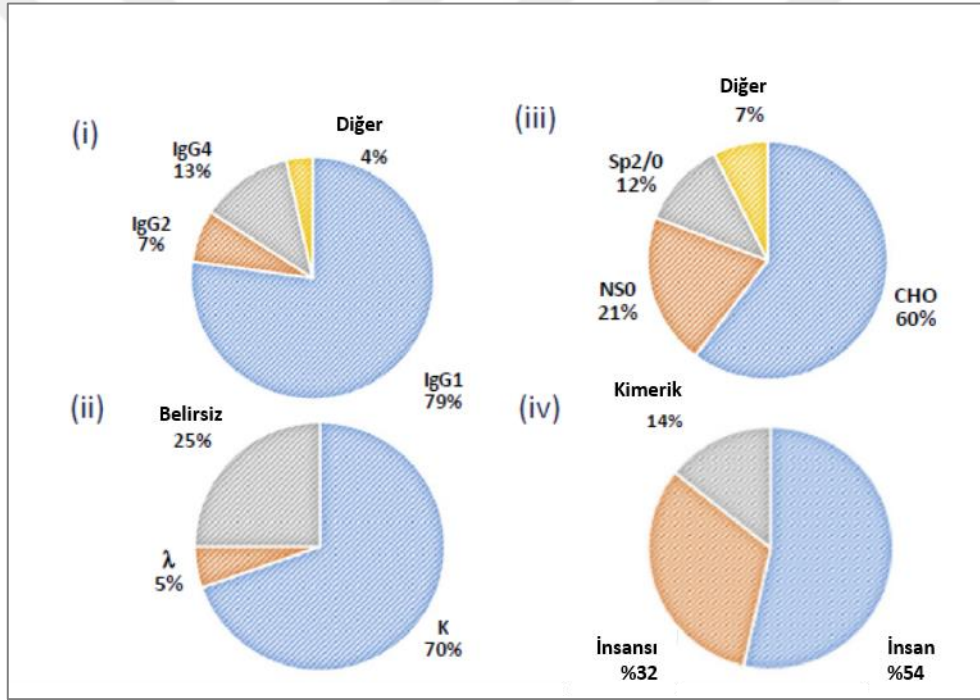
tarafından onaylanmıştır. 2020 yılına gelindiğinde ise onaylanmış ilaçların sayısı 19'dur (112).

Tek B hücresinden monoklonal antikor geliştirilmesi, insan B hücrelerinde bulunan V_H ve V_L bölgelerinin doğrudan amplifikasyonu ve hücre kültürü sistemlerinde ekspresyonu yoluyla gerçekleşen bir strateji olmuştur. Tek B hücresi izolasyonu, periferik kandan veya lenfoid dokulardan rastgele veya antijene seçici bir şekilde gerçekleştirilebilir. Primer B hücrelerinin büyük popülasyonlarından antikorları salgılayan tek hücrelerin hızlı bir şekilde taranması ve istenen reaktivite profillerinin saptanması için farklı teknikler kullanılmaktadır. Bunun için, mikromanipülasyon ile hücre toplama, lazer destekli mikrodiseksiyon ve akım sitometri gibi yöntemler kullanılmaktadır. Alternatif olarak antijene spesifik B hücrelerinin seçimi, antijen kaplı manyetik boncuklar, çok parametrelili akım sitometri, hemolitik plak deneyi ve bir floresan odak yöntemi yoluyla florokrom etiketli antijenler kullanılarak gösterilmiştir. Ayrıca, tek hücreler tarafından salgılanan monoklonal antikorların yüksek verimli taranması için hücre bazlı mikrodizin çip sistemleri oluşturulmuştur. Tek B hücresi antikoru yaklaşımları, *in vivo* olarak mevcut olan ve *in vitro* taklit edilmesi zor olan konformasyonel faktörlere karşı fonksiyonel monoklonal antikorları izole etme potansiyeline sahiptir. Stratejilerin basitliği, nispeten az sayıda hücre gerekliliği ve spesifik antikorların hızlı bir şekilde elde edilmesindeki yüksek verimlilik, yeterli insan donörü ihtiyacı ve belirli hedef moleküllere olan sınırlama gibi dezavantajlarla dengelenir (138).

2.2.4. MONOKLONAL ANTİKORLARIN ENDÜSTRİYEL PAZAR ANALİZİ

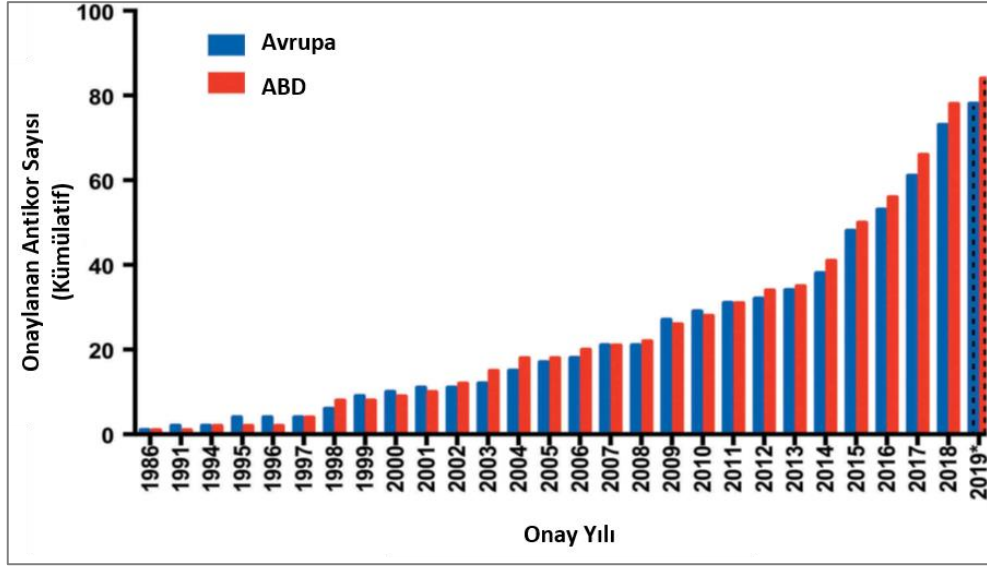
Terapötik monoklonal antikorların ticari gelişimi 1980'lerin başında başlamıştır ve 1986'da ilk terapötik monoklonal antikor Orthoclone (anti-OKT3), böbrek nakli reddinin önlenmesi için onaylanmıştır. Anti-OKT3'ün onaylanması sonrasında, terapötik monoklonal antikorlar ve ürünleri biyofarmasötik pazarda baskın ürün sınıfı haline gelecek şekilde büyümüştür. Monoklonal antikorların satış hacmi ve yeni ürünlerin onaylanması, ilk kimerik monoklonal antikorların onaylandığı 1990'ların sonlarına kadar yavaş ilerlemiştir. İnsansılaştırılmış ve tamamen insan monoklonal antikorlarının geliştirilmeleriyle pazardaki monoklonal antikor payı önemli ölçüde artmıştır (139).

Şekil 2.14.'te monoklonal antikorların molekül yapıları bakımından pazar dağılımları görülmektedir. Molekül yapısı bakımından bispesifik ilaçların ve monoklonal antikor fragmanlarının son onaylarına rağmen, bir epitopu tanıyan tam uzunlukta (full-length) monoklonal antikorlar onaylananların büyük çoğunluğu temsil etmektedir. (57'de 53). Ayrıca, piyasadaki monoklonal antikorların tamamı IgG alt sınıflarından birine aittir. Bunların %79'unu IgG1 alt sınıfı oluşturur. %70'i ise hafif zincirlerinde kappa tipine sahiptir. Sadece insan genetik dizilerini içeren tamamen insan (fully-human) monoklonal antikorlar pazarın %54'ünü oluşturur, geri kalan %32'si insansılaştırılmış (humanized) ve %14'ü kimeriktir. İnsansılaştırılmış (%5-10 arası fare içeriği) ve kimerik (%34 fare içeriği) monoklonal antikorlar; fare antikorları ile tedavi edilen hastalarda HAMA tepkisini önlemek için geliştirilmiştir (140).

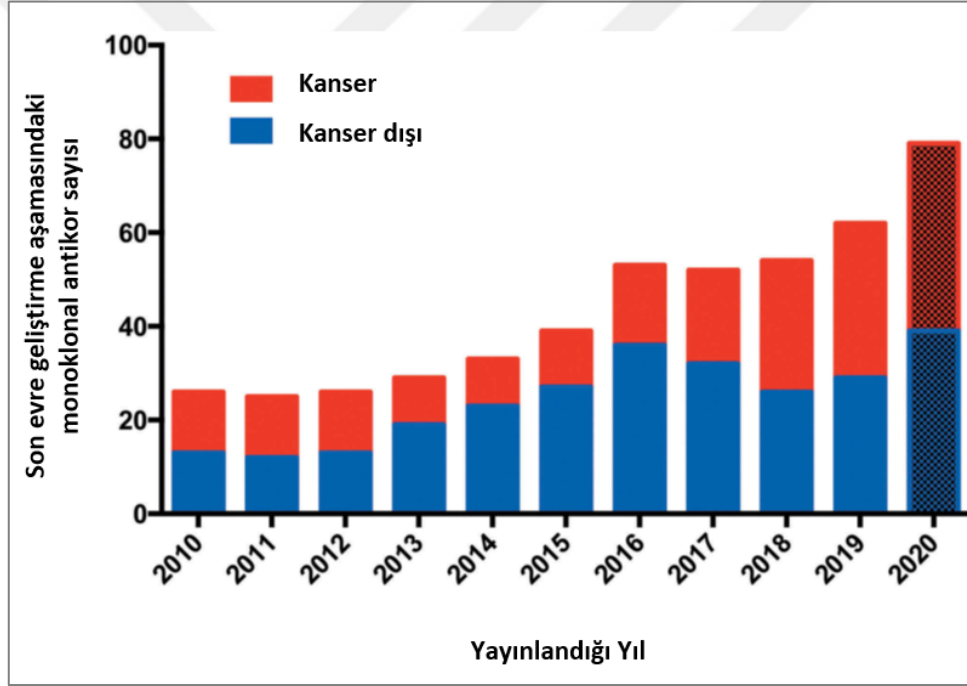


Şekil 2.14. Monoklonal antikorların molekül yapıları bakımından pazar payları (140)

ABD veya Avrupa'daki onaylanan antikor sayılarına bakıldığında, veriler biyofarmasötik endüstrisinin 2010–19 döneminde pazardaki antikor terapötiklerinin sayısının üç katına çıktığını göstermektedir (Şekil 2.15.). Öte yandan 2010-2020 yılları arasında onaylanan antikorlar da rakamsal olarak üç katlık bir artış göstermiş ve bunların her yıl neredeyse yarısı onkolojik hedeflere karşı geliştirilmiştir (Şekil 2.16.). Son üç yılda bu fark daha bariz bir şekilde açılmıştır (141).



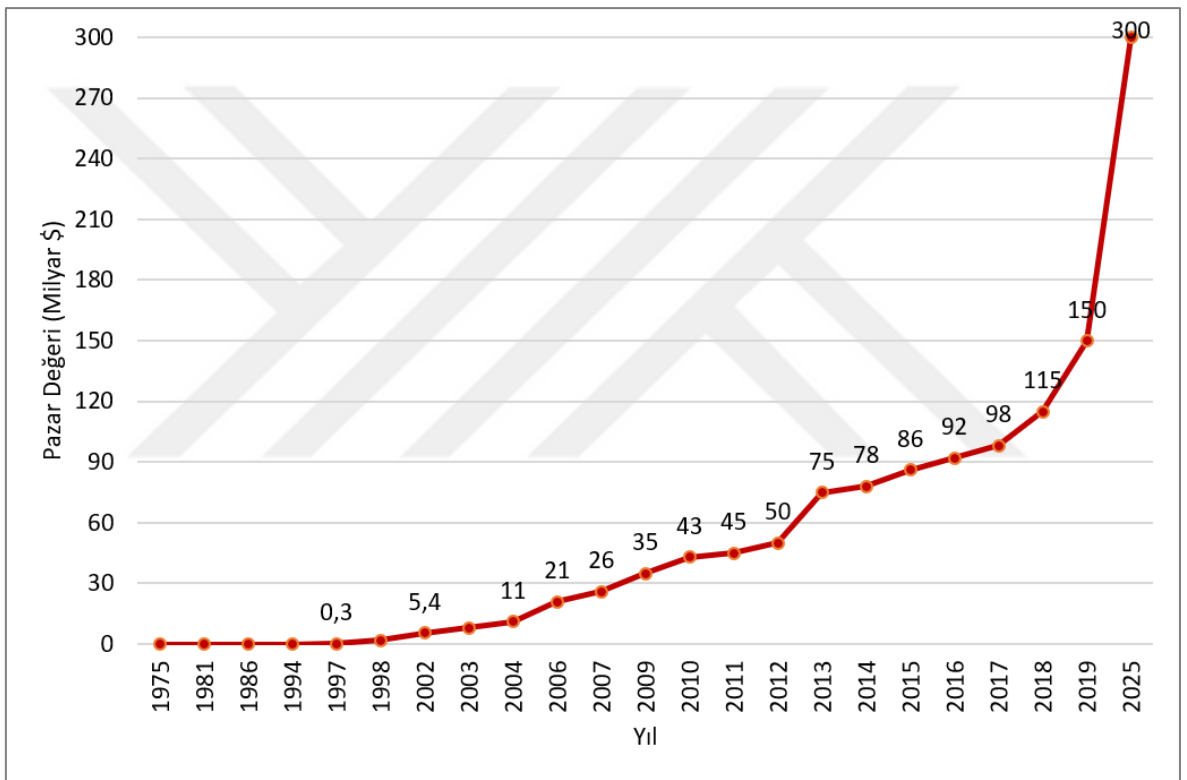
Şekil 2.15. Yıllara göre onaylanan monoklonal antikor sayısı (141)



Şekil 2.16. Yıllara göre kanser ve kanser dışı hedeflere karşı mAb geliştirme sayısı (141)

Market büyüklüğü bakımından ise ilk monoklonal antikorun geliştirildiği 1975 yılından bugüne gelindiğinde 2019 yılı için tüm monoklonal antikor ürünlerinin küresel satış geliri 150 milyar \$ 'dır. Mevcut artış oranları bu rakamın 2025 yılına gelindiğinde 300 milyar \$ dolaylarına ulaşacağını göstermektedir (Şekil 2.17.) (112). 2020 yılında global farmasötik ilaç pazarının 1,25 trilyon \$ rakamına ulaştığı göz önüne alındığında, monoklonal antikorlar %10'luk global ilaç pazar payıyla ekonomik olarak da en önemli terapötikler

sınıfına girmektedir. 2013 yılından bu yana, monoklonal antikor pazarı her yıl %7,2 ile %18,3 arasında büyümüştür. Monoklonal antikor pazarında şu an için 22 şirket aktiftir ve bunların 7'si pazarın %87'sini domine etmektedir. Genentech %31 satış payı ve 11 onaylı ürün ile pazarda lider konumdadır. Gelişmekte olan ekonomilerin monoklonal antikor pazarına giderek daha fazla katkıda bulunduğu da gözlenmektedir. “2014 yılında Çin, Brezilya, Rusya, Türkiye, Meksika, Güney Kore, Hindistan ve Suudi Arabistan'daki en çok satılan ilk altı monoklonal antikorların satışları yaklaşık 2,5 milyar \$ seviyelerine ulaşmıştır. 2015 yılında, sadece Çin'de monoklonal antikor satışları 12,6 milyar \$'ı aşmıştır” (140).



Şekil 2.17. Monoklonal antikorların yıllara göre pazar büyüklüğü (112)

Monoklonal antikor ürünlerinin önümüzdeki yıllarda devam eden büyümesinin, genel biyofarmasötik ürün satışlarının önemli bir parçası olması beklenmektedir (112).

2.3. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR), ErbB tirozin kinaz reseptörleri ailesinin dört üyesinden birini oluşturan transmembran bir glikoproteindir. EGFR'nün ligandlarına bağlanması, reseptör tirozin kinazın otofosforilasyonuna ve ardından hücrel

proliferasyon ve farklılaşma gibi fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynayan sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar. Bu reseptörler güçlü mitojenik yanıtlar ortaya çıkarır ve bu reseptörlerdeki genetik anormallikler kanser hücrelerinin karakteristiklerindendir. Sağlıklı hücrelerde temel ekspresyonu olan EGFR, çeşitli tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilir. EGFR, bir onkogen olarak tanımlanan ilk hücre yüzeyi reseptörüdür. Meme kanserlerinin %30'undan fazlası, küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin %60'ı ve glioblastomaların %40'ı EGFR ailesi üyelerini aşırı eksprese eder veya aktive edici mutasyonlar içerir. EGFR aktivasyonu, tümör hücrelerinde uygulanan tedavilere karşı dirençte de rol oynar. Son yirmi yılda EGFR'ne karşı anti-kanser ajanların geliştirilmesi için çok çaba sarf edilmiştir (7,142).

2.3.1. ERBB AİLESİ, YAPI VE ÖZELLİKLERİ

ErbB'ler ilk olarak 1980'lerin başlarında, kuşlara ait eritroblastoz tümör virüsünün insan EGFR veya ErbB1'in anormal bir formunu kodladığı tespit edildiğinde kanser ile ilişkilendirilmiştir. İlerleyen yıllarda, ErbB reseptör ailesinin dört üyesi tanımlanmıştır ve bu reseptörlerin ve ligandlarının fizyolojik fonksiyonu, hücre-hücre etkileşimleri, ErbB düzensizliğinin sonuçları ve karsinogenez süreçleriyle ilişkileri ortaya çıkarılmıştır (143). ErbB ailesinin dört üyesi;

- i. EGFR/ErbB1/HER1,
- ii. ErbB2/HER2/Neu,
- iii. ErbB3/HER3 ve
- iv. ErbB4/HER4'tür.

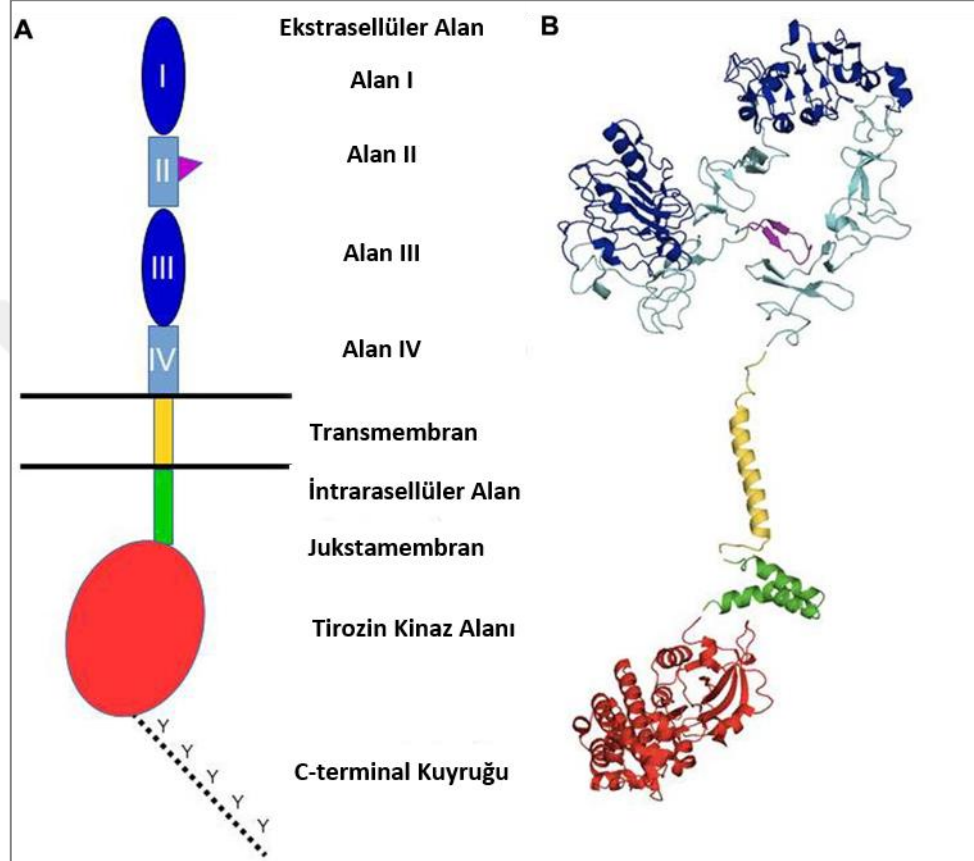
ErbB reseptör ailesinin üyeleri, epitelyal, mezenkimal ve nöronal pek çok hücre soyunda ifade edilir ve bu hücreler üzerinde gelişim, proliferasyon ve farklılaşmada çeşitli rollere sahiptir. ErbB ailesinin dört üyeside, hücre dışı bir ligand bağlanma alanı, tek bir hidrofobik transmembran bölgesi ve korunmuş bir tirozin kinaz alanı içeren bir hücre içi segmentten oluşan yapıya sahip reseptör tirozin kinazlardır (144).

Reseptörlerin hücre dışı kısmı şekil 2.18.'de görüldüğü üzere dört alandan oluşur:

I ve III = ligand bağlanma alanı (koyu mavi);

II ve IV = sistein bakımından zengin alanlardır (açık mavi).

Alan II, dimerizasyon kolunu (mor) içerir. Bunu hidrofobik transmembran alanı (sarı), bir jukstamembran alanı (yeşil), tirozin kinaz alanı (kırmızı) ve reseptör aktivasyonu üzerinde fosforile edilen ana tirozinleri içeren bir C-terminal kuyruğu takip eder (kesik çizgili hat). Şekil 2.18. B panelinde ise X-ışını kristalografisi veya RMN çözeltisi ile oluşturulmuş insan EGFR'nün farklı alanlarının yapıları görülmektedir (145).



Şekil 2.18. ErbB reseptörlerinin yapısı (145)

EGFR/ErbB1/HER1 normal hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesi için gereklidir ve düzensizliği hücre regülasyonunun bozularak kanser fenotiplerinin gelişmesine sebep olur. Özellikle EGF veya TGF- α 'nın bağlanması üzerine büyüme düzenleyici sinyaller iletir. Neuregulin'ler hariç, tüm EGF ligandları ErbB1 reseptörüne bağlanabilir ve EGF'e duyarlı hücreler üzerinde mitojenik etkiler üretebilirler. ErbB1 ekspresyonu, aşırı ekspresyonu veya düzensizliği, MAPK ve PI3K sinyal yolları gibi hücre içi sinyalleri değiştirebilirler. ErbB reseptör ailesinin ikinci üyesi, ErbB1'e önemli bir oranda homoloji gösteren ErbB2/HER2/Neu'dur. ErbB2, ErbB ailesinin diğer üyelerinden daha güçlü bir onkoproteindir ve bilinen herhangi bir liganda bağlanamaz. Aktivasyonunu

diğer ErbB reseptörleri ile heterodimerik kompleksler oluşturarak gösterir. ErbB3 ve ErbB4 aileleri yapısal olarak ilişkilidir. ErbB3 tirozin kinaz aktivitesinden yoksundur ve tirozin kinazlar tarafından diğer reseptörler üzerinde aktive edilir. Neuregulin1 ve neuregulin2 ErbB3'e, HB-EGF, betacellulin, epireguin ve neuregulin ailesi 1-4 ErbB4'e bağlanan ligandlardır. ErbB3 ve ErbB4 üzerinde PI3K'nin düzenleyici alt birimi için çoklu bağlanma yerleri bulunmaktadır. Bu nedenle her iki reseptörde PI3K'nın en etkili aktivatörleridir (143). ErbB reseptör ailesi üyelerine bağlanan ilgili ligandlar Çizelge 2.1.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri ve ligandları

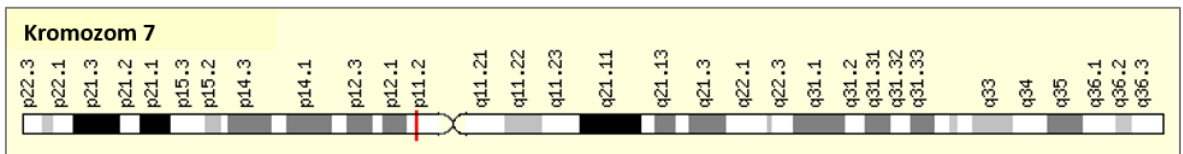
Ligand	Reseptör			
	EGFR/ErbB1/HER1	ErbB2/HER2/Neu	ErbB3/HER3	ErbB4/HER4
EGF	+	-	-	-
TGF- α	+	-	-	-
HB-EGF	+	-	-	+
Amphiregulin	+	-	-	-
Betacellulin	+	-	-	+
Epigen	+	-	-	-
Epiregulin	+	-	-	+
Neuregulin1	-	-	+	+
Neuregulin2	-	-	+	+
Neuregulin3	-	-	-	+
Neuregulin4	-	-	-	+

Dört ErbB ailesi üyesi toplamda 28 homo ve heterodimer oluşturabilir. 11 büyüme faktörü ve 28 olası dimer ile 614 olası reseptör kombinasyonu oluşabilir. ErbB2/ErbB2 ve ErbB3/ErbB3 homodimerleri işlevsel değildir ve böylelikle aktif kombinasyon sayısını 611'e düşmektedir. ErbB2, herhangi bir büyüme faktörüne bağlanamadığı için ligand ile indüklenen homodimer oluşumu olası değildir. Bununla birlikte, ErbB2'nin fizyolojik olmayan aşırı ekspresyonu, fonksiyonel bir homodimerin oluşumuna yol açabilir. ErbB3 tirozin kinaz bölgesi bozuktur, bu yüzden uyarılan homodimer oluşumu protein kinaz aktivitesini ve aşağı sinyal yollarını modüle edememektedir (146).

Birçok farklı kanser hücresi tipinde, ErbB yolağı; ligandların aşırı üretimi, reseptörlerin aşırı üretimi veya reseptörlerin sıralı aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar tarafından aktif veya düzensiz hale gelir. ErbB ailesi üyelerinin anormal tirozin kinaz aktivitesi; meme, akciğer, beyin, baş boyun ve kolon gibi çeşitli kanser tiplerinde düzensiz büyüme uyarımı ve tümör oluşumu ile sonuçlanabilir. Özellikle EGFR ve ErbB2'nin kanserde uygun olmayan aktivasyonu; aşırı ekspresyon, nokta mutasyonları, delesyonlar veya otokrin ligand-reseptör stimülasyonu dahil olmak üzere bir dizi mekanizma yoluyla ortaya çıkabilir (143,144). Bu tez çalışmasında ErbB ailesinin ilk üyesi olan EGFR/ErbB1/HER1'e odaklanılmıştır ve ilerleyen bölümlerde detaylandırılmıştır.

2.3.2. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜNÜN YAPISI

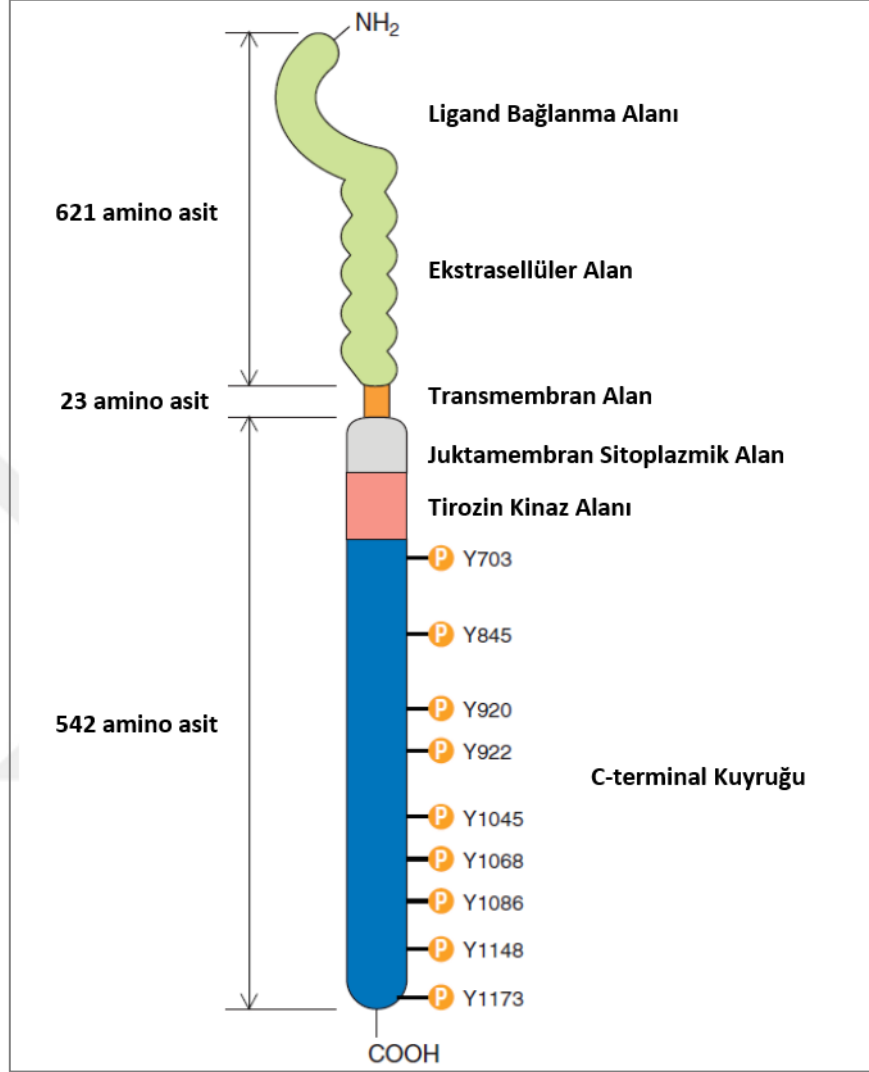
EGFR, kromozom 7p11.2 üzerinde (55,019,017-55,211,628 (GRCh38/hg38)) bulunan, TATA motifi içermeyen bir promotöre sahip gen tarafından kodlanan 1,186 amino asit uzunluğunda transmembran bir glikoproteindir (147).



Şekil 2.19. Epidermal büyüme faktörü reseptörü kromozomal lokasyonu (148).

Ligand bağlanma bölgesini içeren bir 621 amino asitlik hücre dışı alan, 23 amino asitlik tek alfa sarmal transmembran alan ve 542 amino asitlik sitoplazmik alandan oluşur. Sitoplazmik alan ayrıca bir jukstamembran sitoplazmik alan, bir SH1 tirozin kinaz alanı ve bir SH2 alanı veya PTB (fosfotirozin bağlanma bölgesi) içeren karboksi terminal kuyruğu bölgelerini içerir. Karboksi terminal kuyruğunda çeşitli fosforilasyon rezidüleri yer

almaktadır (Şekil 2.20.) (147). Farklı moleküler veritabanlarında GeneCardID: GC07P055019, HGNC: 3236, Entrez Gene: 1956, Ensembl: ENSG00000146648, OMIM: 131550, UniProtKB: P00533 kimlik numaralarıyla temsil edilmektedir.



Şekil 2.20. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün yapısı (147)

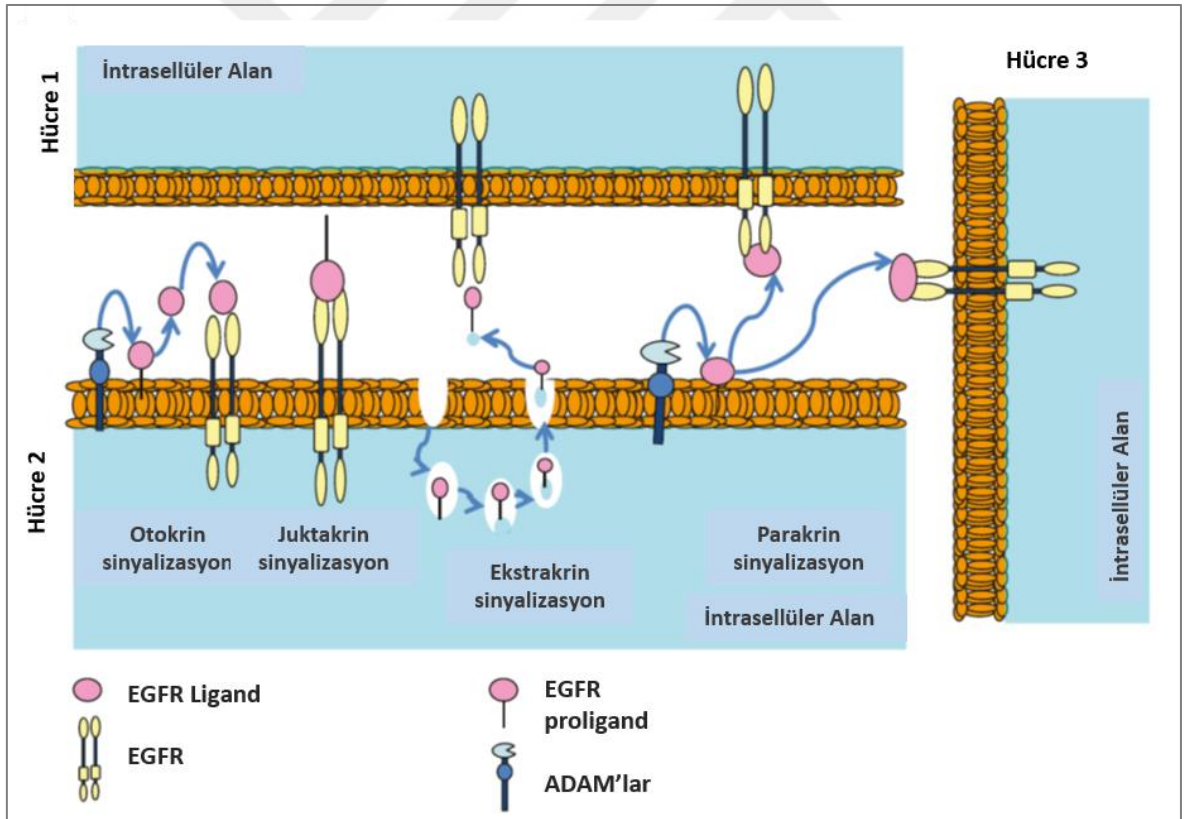
EGFR hücre dışı alanının kristalografik çalışmaları ligand kaynaklı dimerizasyon mekanizmasını büyük ölçüde açıklamıştır. Bir başka önemli keşif, EGFR kinaz çekirdeğinin kristal yapısı, tirozin kinaz regülasyonunun EGFR'ne özgü olduğunu ortaya koymuştur. Çoğu reseptör protein tirozin kinazlar, katalitik aktif bölgede yer alan aktivasyon döngüsü (A-loop) fosforile hale gelene kadar düşük kinaz aktivitesine sahipken, EGFR kinazın A-döngüsü, A-döngü fosforilasyonu yokluğunda diğer reseptörler tirozin kinazların aktif durumuna benzeyen bir konformasyon gösterir. Bu bağlamda, EGFR kinazın ligand kaynaklı reseptör aktivasyonunun yanı sıra bağımsız katalitik yeterliliğe

sahip olduğu da görölmektedir ve bu nedenle kinaz aktivitesini modöle etmek için alternatif araçlar önerilmiştir (149).

2.3.3. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜNÜN AKTİVASYONU

Doğrudan EGFR aktivasyonunun ilk adımı, spesifik ligandların reseptöre bağlanması ile başlar. EGFR ligandları bu yolağı Şekil 2.21.'de görüldüğü üzere farklı yollarla aktive ederler:

- Çözünür ligandlar tarafından doğrudan aktivasyon,
- Ligand hücre zarına bağlandığında juktakrin modu,
- EGFR aktivasyonunun aynı hücrede meydana geldiği otokrin sinyali,
- Komşu bir hücreye etki ediyorsa parakrin formu ve
- EGFR ve AREG, insan plazma eksozomlarında tespit edilebildiğinden, otokrin, parakrin, juktakrin ve endokrin sinyallerinin kombinasyonu olan ekstrakrin formu şekillerindedir (150).

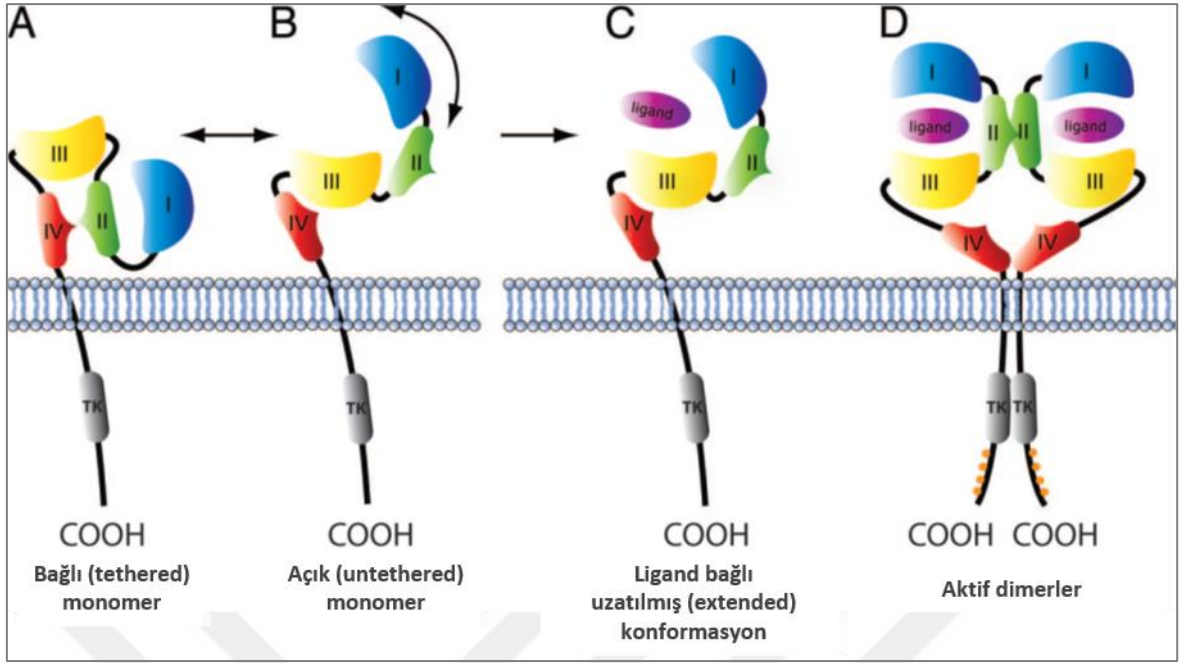


Şekil 2.21. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ligandlarının sinyalizasyon türleri (150)

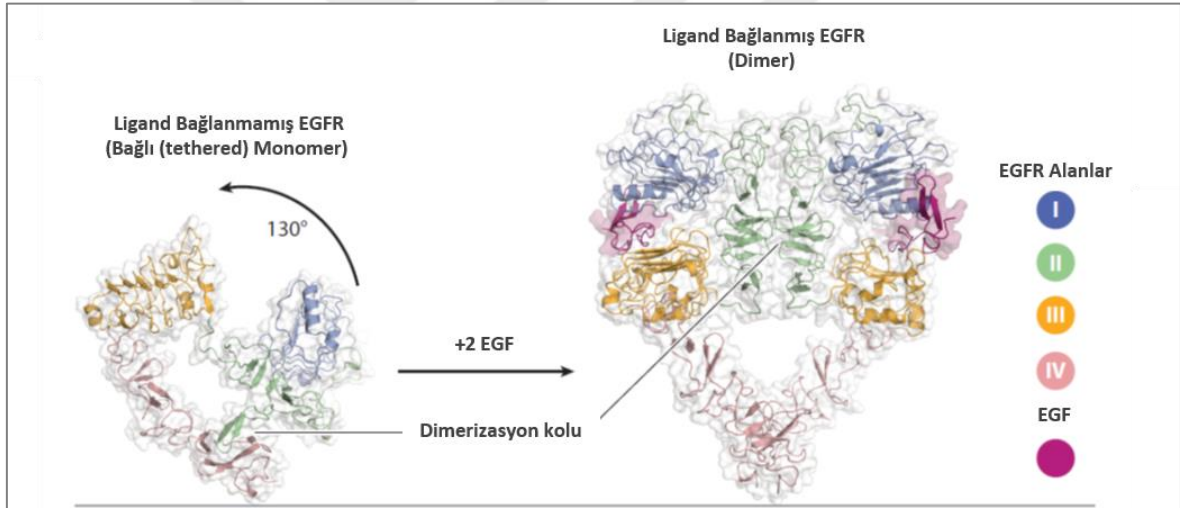
Tüm EGFR ligandları çözünür formda transmembran proteinlerdir, ancak HBEGF, TGFA, AR ve BTC'ler plazma zarına sabitlenmiş biyolojik olarak aktif öncüler olarak da bulunur.

EGFR ligandlarının hücrel zarıdan salınması, EGFR transaktivasyon sürecinde önemli bir noktadır. EGFR transaktivasyonu fizyolojik ve fizyolojik olmayan uyaranlarla sağlanabilir. Bu etkiyi yaratabilecek fizyolojik uyaranlar arasında hormonlar, kemokinler, adezyon molekülleri ve büyüme faktörleri bulunur. Oksidatif stres, mekanik stres, UV ve γ radyasyon gibi fizyolojik olmayan işlemlerle EGFR transaktivasyonuna, reseptörün intrinsik kinaz aktivitesini antagonize eden belirli fosfatazların etkisizleştirilmesi aracılık eder ve böylece EGFR otofosforilasyonu gerçekleşir (150).

EGFR ligand etkileşimi sonrasında ilave bir EGFR molekülü (homodimerizasyon) veya ErbB ailesinin başka bir üyesi (heterodimerizasyon) ile dimerleşmeye yol açan konformasyonel bir değişikliğe uğrar. Şekil 2.22.'de EGFR aktivasyonunun moleküler mekanizma modeli EGFR alanları farklı renklerle (alan I, mavi; alan II, yeşil; alan III, sarı; alan IV, kırmızı; hücre içi tirozin kinaz alanı, gri) kategorize edilerek gösterilmiştir. Bu süreçte EGFR'nin hücre dışı bölgesinin inaktif ve aktif olmak üzere iki farklı konformasyonel değişime uğradığı bilinmektedir. İnaktif konformasyon: ligand yokluğunda, EGFR, hücre dışı bölgenin II ve IV. alanları arasında moleküller arası bir bağ sunan monomerik, kompakt, bağlı (tethered) bir konformasyon benimser. Alan II'nin alan IV'e doğru katlandığı bu otoinhibisyon durumu, hücre dışı alanı kapalı bir konformasyonda tutarak ligandın bağlanması için gerekli I ve III alanları arasındaki etkileşimi önler. Aktif konformasyonda ise, ligandın I ve III alanlarını köprülediği, böylece yapıyı açtığı dimerik, genişletilmiş (extended) bir konformasyon ortaya çıkar. Alan I ve III'teki EGFR monomerlerine ligand bağlanması, alan II'deki dimerizasyon kolunu açığa çıkarmak için uzatılmış (extended) konformasyona yol açan düzenlemeye neden olur. Bu düzenleme Şekil 2.23'te kristal yapılar şeklinde de görülmektedir. Alan II'nin dimerizasyonunu, transmembran alanda yeniden düzenlemeler izler ve bu da jukstamembran segmentinde yeniden düzenlemelere yol açar. Hücre içi jukstamembran segmenti daha sonra EGFR dimerinin oluşumu ve stabilitesi için önemli olan kinaz alanı ile etkileşime girer. EGFR dimeri, aktive edici kinazın C-terminalinin kinazın aktif bölgesine sokulduğu, böylece bu allosterik etkileşimin kinazı aktive edebildiği ve transotofosforilasyona yol açtığı asimetrik bir dimer çiftidir (145,151,152).



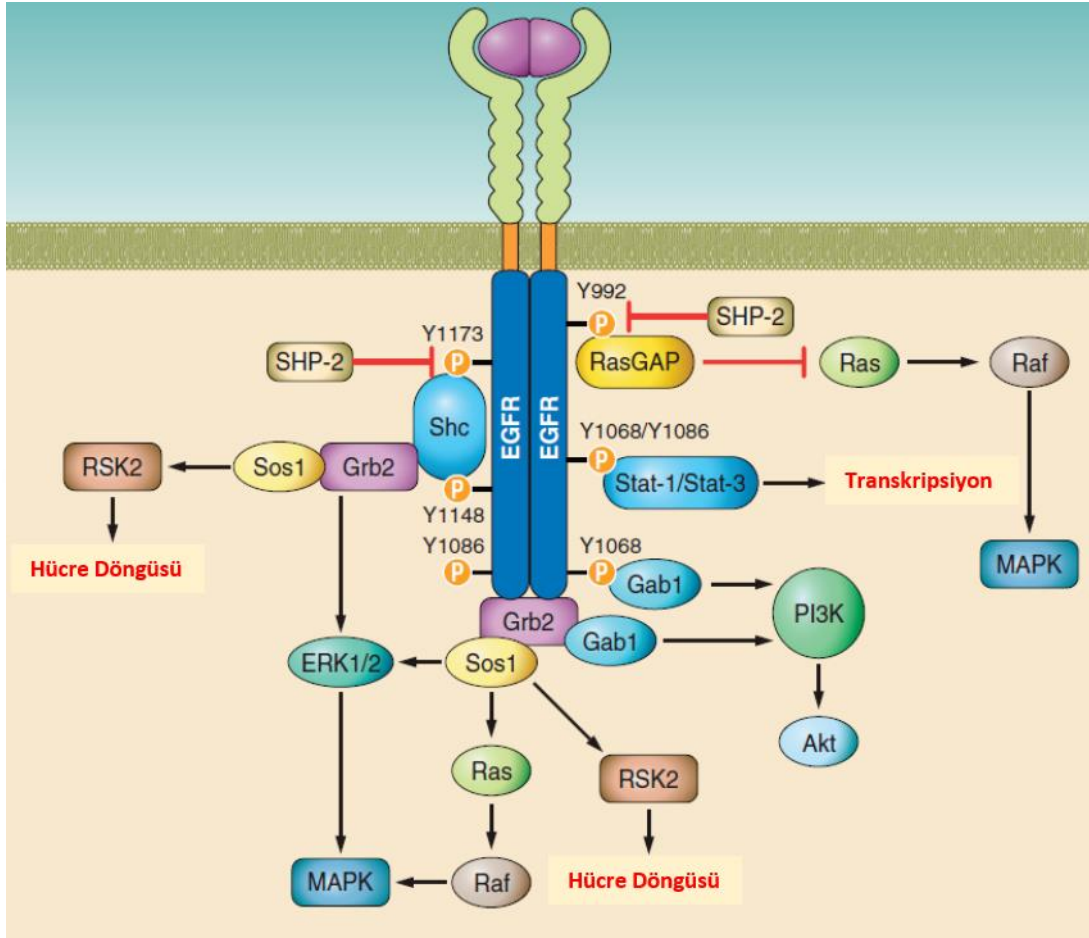
Şekil 2.22. Ligand aracılı EGFR aktivasyonunun moleküler mekanizma modeli (152)



Şekil 2.23. Ligand aracılı dimerizasyon mekanizmasının kristal yapı modeli (142)

Bu fosforile edilmiş rezidüler daha sonra Shc, Grb2, Grb7, Crk PLC-, SRC, PI-3K, protein fosfatazlar-SHP1 ve SHP2 ve E3 ubitkuitin ligaz Cbl için gibi protein komplekslerini sinyalizasyonu için yerleşme yerleri (docking sites) olarak işlev görürler. Bazı Stat proteinleri ve PLD gibi proteinler doğrudan EGFR'ne bağlanmazlar. Sinyal ağına katılırlar. EGFR tarafından etkinleştirilen onkogenik sinyal yolları; ras/raf/MEK/ERK, PI3K-Akt, p38, JNK, JAK-Stat, Src, Rho ve Rac gibi küçük GTPazlar, PLC-/Ca2/PKC ve PKD'yi içerir (Şekil 2.24.). Bu yollar birbirine bağlı olduğundan, EGFR'nin aktivasyonu aslında

hücre proliferasyonu, büyüme, farklılaşma, migrasyon ve apoptozun inhibisyonu gibi çok sayıda sonuçla ilişkili komple bir sinyal ağını uyarır (151,153).



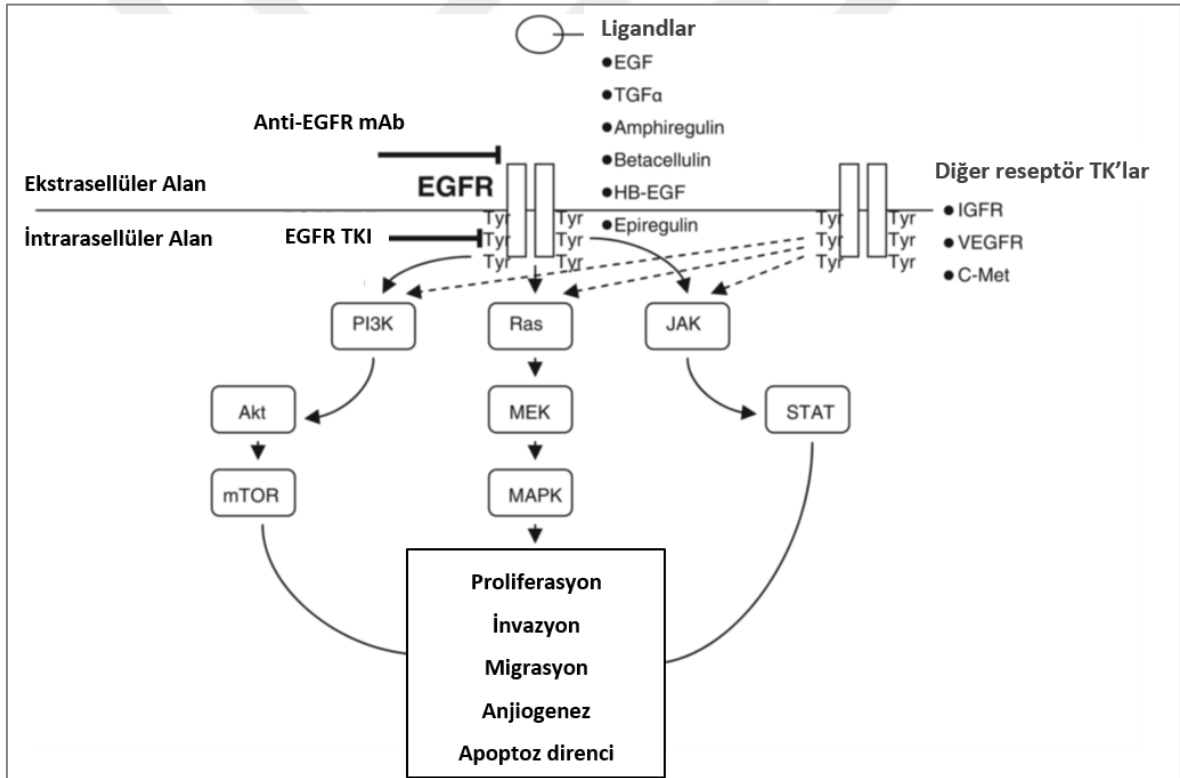
Şekil 2.24. Ligand bağlanması ile aktive olan EGFR'ne bağlı alt sinyal yolları (147)

2.3.4. EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ HEDEFLİ AJANLAR

Son otuz yılda, çeşitli insan epitelyal tümörlerinde EGFR aktivitesinin ve deregülasyonunun (aşırı ekspresyon, artan aktivite, EGFR mutasyonları) insan epitelyal kanserlerinin etiolojisinde temel bir faktör olabileceği ortaya konmuştur. Düzensiz EGFR aktivitesi, baş boyun, akciğer, kolorektal, meme, yumurtalık, servikal, mesane, pankreas, gastrik, endometriyal ve beyin kanserinin gelişimi, ilerlemesi ve metastatik yayılması ile bağlantılıdır. Bu kanserlerin çoğunda, EGFR ekspresyonu düşük sağkalım oranları ile doğrudan ilişkilidir. Düzensiz EGFR aktivitesi, ligand bağlanması yoluyla EGFR'nün artan

uyarılmasını, reseptör içindeki nokta mutasyonlarını, EGFR ekzon mutasyonlarını ve EGFR lokuslarının gen amplifikasyonunu içerir (154).

EGFR aktivitesini inhibe etmek için küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler) ve monoklonal antikorlardır (mAb) olmak üzere iki ana inhibitör grubu geliştirilmiştir. EGFR TKI'leri etkilerini hücre içinde uygulayarak EGFR'nün ATP cebine rekabetçi bir şekilde bağlanarak, EGFR otofosforilasyonunu ve alt sinyal iletimini engellerler. Anti EGFR mAb'ler hücre dışı alanda aktivite göstererek ligand-reseptör bağlanmasını antagonize ederler. Bu aktivite ile reseptör dimerizasyonu, otofosforilasyonu ve sinyal iletimi önlenir (Şekil 2.25.). Anti-EGFR terapötikleri olarak TKI'ler ve mAb'ler, kanser hücreleri üzerindeki etkinlikleri göz önüne alındığında genellikle sitostatik etki sağlamaktadır (155).



Şekil 2.25. EGFR hedefli ajanların etki mekanizmaları (155)

Bu iki ilaç sınıfının biyolojik etkisi benzer olmakla birlikte, Çizelge 2.2.'de belirtildiği üzere bazı fonksiyonel ve klinik farklılıkları bulunmaktadır (155).

Çizelge 2.2. Tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar arasındaki uygulama farklılıkları

	Tirozin Kinaz İnhibitörleri	Monoklonal Antikorlar
Etki yolu	Intraselüler	Ekstraselüler
Etki mekanizması	Tirozin kinaz fonksiyonunun inhibisyonu	Ligand-reseptör bağlanma antagonizması, reseptör internalizasyonu, reseptör degradasyonu, bağışıklık fonksiyonlarının modülasyonu
Moleküler ağırlık	400–500 dalton	150,000 dalton
Uygulama yolu	Oral	Intravenöz
Yarı ömür	1-2 gün	5 gün
İlaç interaksiyonları	Çoklu	Minimal

EGFR sinyalizasyonunun bloke edilmesine ek olarak, anti-EGFR mAb'lar reseptör internalizasyonuna, degradasyonuna ve uzun süreli azalmış regülasyonuna yol açar. Bu işlem, geri dönüşümlü olarak bağlanan EGFR TKI'lerde gerçekleşmez. Ek olarak anti-EGFR mAb'lar hedeflenen kanser hücrelerine saldırmak için konakçı bağışıklık fonksiyonlarını modüle edebilirler. Bunlar, antikora bağlı hücrel sitotoksiteyi ve komplemente bağlı sitotoksiteyi içermektedir (155).

2.3.4.1. Anti-EGFR Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Kanser tedavisinde hedefli terapötiklerin keşfinden bu yana, yüzlerce küçük molekül sentezlenmiş ve farklı nesil EGFR TKI'leri ortaya çıkmıştır.

Birinci nesil inhibitörler, Erlotinib (FDA onaylı), Gefitinib (FDA onaylı) ve İcotininib (Yalnızca Çin'de onaylı)'dir. Bu TKI'leri ATP bağlanma bölgesine rekabetçi ve geri dönüşümlü bir şekilde bağlanarak otofosforilasyon ve aşağı akış sinyalini önler, böylece

EGFR'ye bağlı hücre çoğalmasını inhibe ederler. EGFR'nin kinaz alanındaki onkogenik mutasyonların aktive edilmesi mevcut TKI'lerine karşı dirençten sorumludur. EGFR'n n kinaz alanı ekzon 18 ile 24 tarafından kodlanmaktadır. Kinaz aktive edici mutasyonların %90'ından fazlası ATP bağlayıcı cep çevresinde yer almaktadır. Birinci nesil TKI'leri (Gefitinib ve Erlotinib) ekzon 21 L858R nokta mutasyonu ve ekzon 19'da meydana gelen bir delesyon (delE746-A750) kaynaklı küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında), %50 ile %80 arasında pozitif klinik yanıtlar vermektedir. Fakat EGFR T790M mutasyonuna kaynaklı EGFR TKI'lerinin birinci nesillerine karşı gelişen direnç mekanizması, yeni nesil TKI'leri olarak çeşitli yapıların keşfedilmesine ve geliştirilmesine yol açmıştır (156–159).

 kinci nesil inhibitörler; Afatinib (FDA onaylı), Dacomitinib, Neratinib, Canertinib ve Pelitinib, T790M mutasyonu direncinin üstesinden gelmek üzere ve birinci nesil inhibitör tedavilerinin devamında kullanılması amacıyla tasarlanmıştır.  kinci nesil EGFR TKI'leri kovalent ve geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanır. Bu ilaçlar ayrıca ErbB2 (HER2) dahil diğer HER ailesi proteinlerini inhibe ederek daha az seçici aktiviteye sahip olma eğilimindedir.  kinci nesil inhibitörlerin çoğu, klinik kullanımını büyük ölçüde sınırlayan düşük maksimum tolere edilen doz (MTD) ve doz sınırlayıcı toksisite etkisi gösterirler. Bu nedenlerle, EGFR ekzon 19 delesyonu veya ekzon 21 mutasyonuna sahip metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastaları için sadece Afatinib ilk basamak tedavisi olarak onaylanmıştır (156–159).

   nc  nesil inhibitörler; Osimertinib (FDA onaylı), Rociletinib, Olmutinib (Yalnızca Kore'de onaylı), Nazartinib, Avitinib (Yalnızca Çin'de onaylı) ve PF-06747775'tir. Bunlara mutant-seçici inhibitörler de denir ve birinci ve ikinci nesil inhibitörlere karşı direnç geliştiren hastalar için etkinlik göstermektedir. Bu inhibitör kategorisi, seçici ve geri dönüşümsüz bir şekilde EGFR T790M mutasyonunu hedeflemektedir. Tek FDA onaylı üçüncü nesil inhibitör Osimertinib; ekzon 19 delesyonlarına, ekzon 21 mutasyonlarına ve ayrıca ekzon 20 T790M mutasyonlarına karşı seçicidir. Seçici etkinlik gösterdiklerinden ötürü toksisite diğer nesil ajanlara göre daha düşüktür. Etkinliklerinin yüksek olmasına karşın çeşitli mutasyonlar ve direnç mekanizmaları kullanımlarını kısıtlamaktadır (156–159).

Son zamanlarda ise, EGFR TKI'lerinin dördüncü nesil türevleri klinik değerlendirmelere dahil edilmiştir. Farklı tasarım yöntemleriyle, mutasyonlara özgü yeni EGFR TKI bileşikler bulma çalışmaları devam etmektedir. Örneğin; Tiazol amid türevi 57 2,5 milyon bileşiklik bir kütüphaneden ileri düzey tarama yöntemleri kullanılarak elde edilmiş dördüncü nesil EGFR inhibitörüdür. Bu seçici bileşik mutant EGFR'nü yabani tipe göre çok daha düşük dozda inhibe edebilmektedir. Etkinlik çalışmaları devam etmektedir (157).

2.3.4.2. Anti-EGFR Monoklonal Antikorlar

İlk anti-EGFR monoklonal antikorları, farelerden türetilmiştir. Ancak bunlar hastalarda çeşitli yan etkilere neden olmuş ve düşük etkinlik göstermiştir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için antikorların insansılaştırılması çalışmaları öne çıkmıştır. Cetuximab gibi kimerik antikorlar, antijenik aktiviteye sahip değişken bir fare bölgesinden ve yan etki reaksiyonlarının insidanslarını azaltan sabit bir insan bölgesinden oluşur. Daha sonra transgenik fareler başta olmak üzere farklı teknolojilerle tamamen insansılaştırılmış anti-EGFR monoklonal antikorlar (Panitumumab) üretilmiştir. Terapötik anti-EGFR monoklonal antikorlar arasında, Cetuximab ve Panitumumab klinik kullanım için onaylanmışken, diğer mAb'ler hala klinik gelişmededir (153).

Cetuximab (IMC-225, Erbitux) insan EGFR'nün hücre dışı alanına (alan III) spesifik olarak bağlanan bir kimreik bir monoklonal antikordur. IgG1 izotipindedir. Endojen ligandlardan daha yüksek bir afinite ile (2-log daha yüksek) reseptör bağlanması için ligandlarla rekabet eder, reseptör fosforilasyonunu uyarmadan reseptör internalizasyonuna neden olur ve ligand aracılı reseptör tirozin kinaz fosforilasyonunu önler. Cetuximab'ın anti-kanser etkinliği, hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonu, apoptozun desteklenmesi, anti-anjiyogenez ve immünolojik aktivitenin artırılmasını içeren çoklu mekanizmalardan kaynaklanır. Cetuximab'ın EGFR'ne bağlanması, hücre döngüsünün G0/G1 fazında ilerlemesini engeller, hücre döngüsü düzenleyicisi p27KIP1'in ekspresyonunu artırır. Pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak veya anti-apoptotik proteinlerin inaktivasyonu ile apoptozu indükler. Cetuximab; çeşitli anjiyogenik faktörlerin üretimini azaltır. Bu etki mikrodamar yoğunluğunda azalma ve endotelial hücrelerin apoptozunda artış sağlar. Ayrıca tümör hücresi adhezyonunda önemli bir rol oynayan matris metalloproteinazların ekspresyonunu modüle ederek metastaz oluşumunu azaltmaktadır. Pre-klinik çalışmalar Cetuximab'ın EGFR eksprese eden bazı kanser hücrelerinin

proliferasyonunu durdurduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar *in vivo* fare tümör modelleriyle de desteklenmiştir (15,160).

Cetuximab 2006 yılında baş boyun kanserlerinin tedavisinde;

-baş ve boynun lokal veya bölgesel olarak gelişmiş yassı epitel hücreli karsinomunun ilk tedavisi için radyasyon terapisi ile kombinasyon halinde,

-tekrarlayan lokal veya metastatik yassı epitel hücreli karsinom hastaların birinci basamak tedavisi için fluorourasil ile platin bazlı tedavi ile kombinasyon halinde,

-önceki platin bazlı tedavi başarısız olan tekrarlayan veya metastatik yassı epitel hücreli karsinom hastalarının tedavisi için tek bir ajan olarak kullanım şekillerinde onaylanmıştır (161).

2009 yılında da K-Ras(-) EGFR eksprese eden metastatik kolorektal kanser tedavisi için;

-birinci basamak tedavi için FOLFIRI (irinotekan, fluorourasil, lökovorin) ile kombinasyon halinde,

-irinotekan bazlı kemoterapiye dirençli hastalarda irinotekan ile kombinasyon halinde,

-oxaliplatin ve irinotekanbazlı kemoterapide başarısız olan veya irinotekana karşı toleranssız olan hastalarda tek bir ajan olarak kullanım şekillerinde onaylanmıştır (161).

Ticari terapötik bir anti-EGFR monoklonal antikoru olan Cetuximab, ilaç araştırma geliştirme çalışmaları için de altın bir standart ve pozitif kontrol değeri taşımaktadır.

Panitumumab (ABX-EGF, Vectibix), transgenik fare teknolojisi ile geliştirilen tamamen insan yapısında monoklonal bir antikordur. IgG2 izotipindedir. Fare protein dizileri içermez. Klinik veriler Panitumumab'ın iyi tolere edildiğini, premedikasyon gerektirmediğini ve çok düşük HAMA insidansı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. EGFR'ne yüksek afinite ($K_d = 5 \times 10^{-11}$ M) ile bağlanır ve ligandların bağlanmasını bloke ederek EGF'ne bağlı tümör hücresi aktivasyonunu ve proliferasyonunu inhibe eder. Panitumumab, kanser hücre döngüsünün G0/G1 interfazında durmasına neden olur. Ksenograft modelleri

kullanılarak, Panitumumab'ın farklı dokulardan türetilen çoklu insan katı tümörlerine karşı etkili olduğu gösterilmiştir (160).

Panitumumab FDA tarafından 2006 yılında,

- metastatik kolorektal karsinom tedavisi için tek bir ajan olarak veya fluoropyrimidine, oxaliplatin ve irinotecan kemoterapi tedavileri sonrasında kullanım için onaylanmıştır. 2009 yılında K-Ras(-) EGFR eksprese eden metastatik kolorektal kanser tedavisi için kullanılabileceği yönünde güncellenmiştir (162). Cetuximab ve Panitumumab dışında da yeni özgün anti-EGFR monoklonal antikör geliştirme çalışmaları devam etmektedir.

Necitumumab (IMC-11F8, PORTRAZZA), daha az cilt toksisitesi ve şiddetli aşırı duyarlılık reaksiyonlarının potansiyel avantajına sahip olan tamamen insan, IgG1, anti-EGFR monoklonal antikördür. Necitumumab, EGFR'nü yüksek potens ile bloke eder (IC50=1-2 nM) ve klinik öncesi modellerde Cetuximab ile karşılaştırılabilir anti-tümör etkinlik sergilemektedir. FDA tarafından 2015 yılında metastatik skuamöz küçük hücreli dışı akciğer kanseri olan hastaların birinci basamak tedavisi için gemcitabin ve cisplatin ile kombinasyon halinde kullanım için onaylanmıştır (163,164).

Zalutumumab (HuMax-EGFR) tamamen insan yapısında anti-EGFR monoklonal antikördür. Pre-klinik çalışmalar, Zalutumumab'ın EGFR'ne ligand bağlanmasını rekabetçi olarak inhibe edip hemen ardından reseptör dimerizasyonunu ve aktivasyonunu engelleyerek ve ayrıca antikora bağımlı hücrel sitotoksite yoluyla anti-tümör etkinliğini ortaya koymuştur. Klinik faz çalışmaları pek çok hastada (>%90) cilt reaksiyonları geliştiğini göstermiştir. Bu nedenle geliştirici firma tarafından çalışmaları durdurulmuştur (163).

Nimotuzumab, şu anda ABD dışında bazı ülkelerde kullanım için onaylanmış insansı bir IgG1 monoklonal antikördür. Cetuximab veya Panitumumab'dan daha az cilt toksisitesi sergilediği gösterilmiştir. Pre-klinik çalışmalar, Nimotuzumab'ın EGFR'ne yüksek afinite ile bağlandığını, hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, fare ksenograft modelinde anti-tümör aktivite gösterdiğini ve radyasyonun anti-tümör etkinliğini arttırdığını göstermiştir. Klinik faz çalışmaları faz III evresinde durdurulmuştur (163,165).

Matuzumab (EMD 72000), insansı bir IgG1 monoklonal antikordur. Matuzumab, hem ligand bağlanma bölgesinden hem de bu alandaki Cetuximab epitopundan farklı olan EGFR alan III'deki bir epitopa bağlanır. Ligandın alan III'e bağlanmasını doğrudan rekabetçi bir şekilde engellemeye yönelik çalışmadığı için Cetuximab ile aynı mekanizmayı paylaşmaz. Bunun yerine, Matuzumab'ın alan III'e bağlanması, yüksek afiniteli ligand bağlanması ve reseptör dimerizasyonu için gerekli olan konformasyonel düzenlemeyi sterik olarak bloke eder. Pre-klinik çalışmalar Matuzumab etkinliği için umut verici olsa da klinik faz çalışmalarının faz II aşamasında alınan olumsuz sonuçların ardından geliştirici firmalar tarafından çalışmaları durdurmuştur (166).



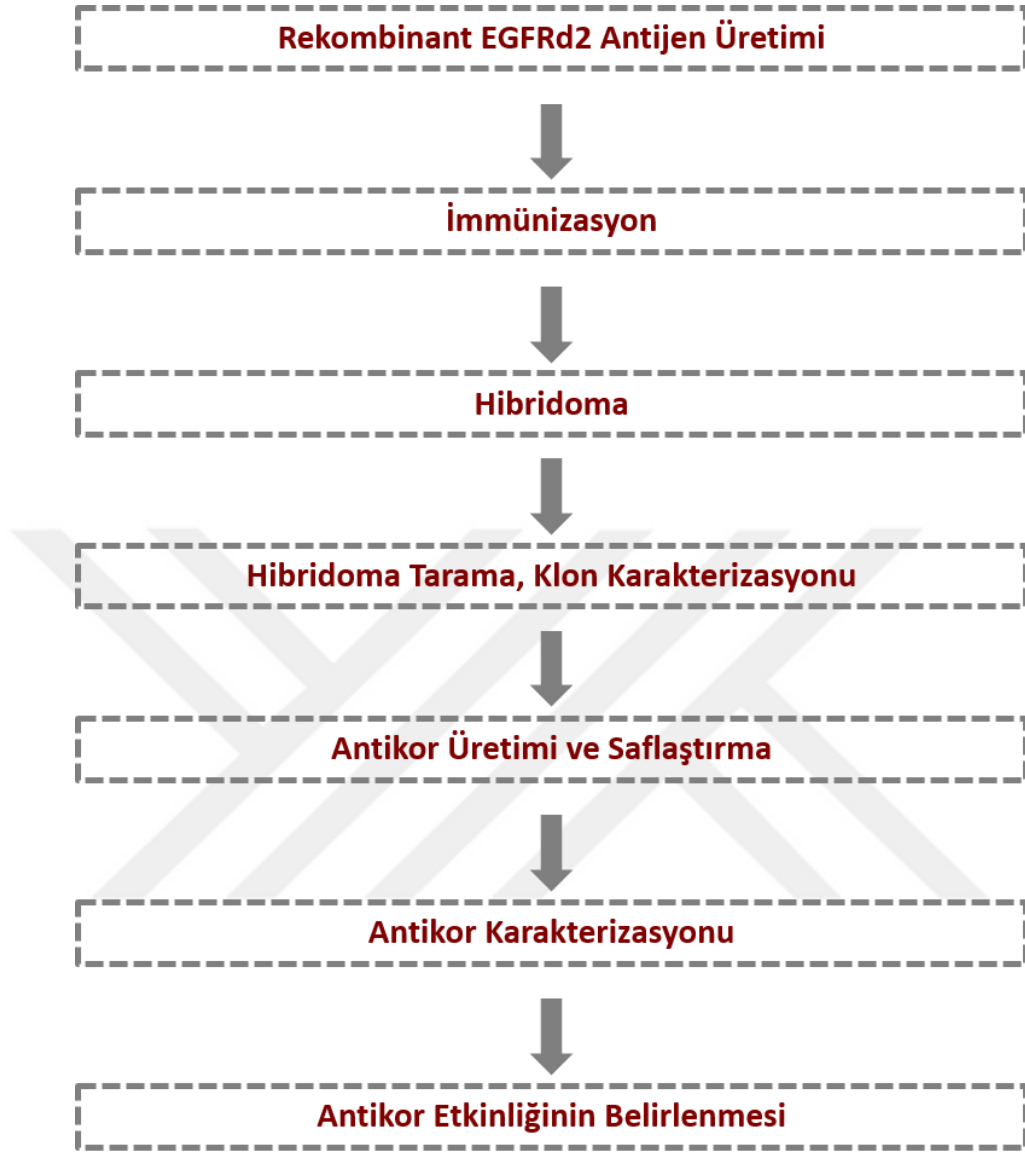
3. GEREKÇE VE AMAÇ

EGFR, anormal amplifikasyonu ve meydana getirdiği mutasyonlar sonucu gelişen ilaç direnç mekanizmalarıyla, güçlü bir terapötik ajan geliştirilmesi zorunlu olan kritik bir hedeftir. Mevcut kemoterapötik ve küçük moleküllere ek olarak, daha etkin ve hedefli tedaviler için anti-EGFR monoklonal antikoları 2000’li yılların başında onaylanarak klinikte kullanıma başlanmıştır. Cetuximab ve Panitumumab kanser tedavisinde en çok tercih edilen anti-EGFR antikolarıdır ve çok ciddi maliyetlerle tedarik edilebilmektedir. Klinik kullanımının yanı sıra biyoteknoloji endüstrisi de her yıl monoklonal antikoların araştırma geliştirme çalışmaları için milyarlarca dolar harcamaktadır. 2020 yılında dünya çapında pazar payının 150 milyar dolar civarında olduğu bilinmektedir. Klinikte terapötik amaçla kullanımlarının yanı sıra, kanser tanısında da çok yaygın kullanılan ajanlardır. Öte yandan -özellikle ilaç geliştirme ve tarama temelli araştırma laboratuvarlarında- ilgili deneysel bileşiklerin EGFR protein ifadesine etkisinin belirlenmesi ve mekanistik fonksiyonel analizler amacıyla, etki değeri yüksek çalışmaların temel materyallerinden biridir. İmmünblotlama, immünohistokimyasal boyama, immünofloresans boyama, immünpresipitasyon, ELISA ve akım sitometri analizlerinin primer bileşenidir.

Son on yılda süregelen gelişmeler EGFR molekülüne karşı monoklonal antikor geliştirme çalışmalarının devam ettiğini göstermektedir. Monoklonal antikoların beraberinde getirdiği immünojenite, zayıf efektör fonksiyonları ve farmokokinetik problemlerinin aşılması için farklı bölgelerin seçimiyle daha efektif anti-EGFR hedef çalışmaları devam etmektedir (15,17). Mühendisleştirilmiş EGFR antikoları, bi- ve multi-spesifik EGFR antikoları ve EGFR antikor-ilac konjugatları gibi biyo-superior anti-EGFR antikoları için devam eden klinik faz çalışmaları bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında mevcut terapötik antikolardan farklı olarak EGFR dimerizasyon bölgesine karşı yeni ve özgün bir anti-EGFR monoklonal antikor geliştirilmesi, karakterizasyonu ve etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. EGFR alan II’nin tamamını hedefleyecek şekilde tasarlanan antijen sayesinde geliştirilen anti-EGFR antikor, mevcutlardan farklı olarak doğrudan EGFR dimerizasyonunu engellemeye yönelik işlev görecektir. Nihai olarak, pek çok alanda kullanım potansiyeline sahip yerli ve uluslararası rekabete açık biyoteknolojik bir ürün geliştirilmiş olacaktır.

Bu amaçla hedeflenen çalışmanın akış şeması Şekil 3.1.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Epidermal büyüme faktörü reseptörü dimerizasyon bölgesine özgün monoklonal Anti-EGFR antikor geliştirilmesi için planlanan iş akış şeması

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HÜCRE HATLARI

Çalışmada kullanılan hücre hatları ATCC'den temin edilmiştir. Hücrelere ait bilgiler Çizelge 4.1.'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan hücre hatları

Hücre Hattı Adı	ATCC Katalog Numarası	Organizma	Hastalık Türü	Hücre Tipi	Biyogüvenlik Seviyesi
FO	CRL-1646	<i>Mus musculus</i> , fare	Plazmasitom, miyelom	B lenfoblast	1
MCF-7	HTB-22	<i>Homo sapiens</i> , insan	Meme kanseri, adenokarsinom	Epitel	1
MDA-MB-468	HTB-132	<i>Homo sapiens</i> , insan	Meme kanseri, adenokarsinom	Epitel	1
Caco-2	HTB-37	<i>Homo sapiens</i> , insan	Kolorektal kanser, adenokarsinom	Epitel	1
HeLa	CCL-2	<i>Homo sapiens</i> , insan	Serviks kanseri, adenokarsinom	Epitel	2 (HPV içerir)

4.1.2. BAKTERİ SUŞLARI, PLAZMİTLER VE TRANSFORMANTLAR

Tez danışmanı tarafından, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda EGFR alan 2'yi kodlayan 824-1251. nükleotidlerin pET-30a(+) (Novagen, 69909) ifade plazmidi içerisine klonlanmış ve BL21(DE3) (Novagen, 69450) ve Rosetta-gami™ 2(DE3)pLysS (Novagen, 71352) suşlarında 6xHis tag ile konjuge halde rekombinant ifade için transforme edilmiştir. Bu transformasyon ürünleri çalışmada

rekombinant EGFRd2 ifade ettirme ve saflaştırma işlemleri için başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

4.1.3. FARELER

Çalışmada 6-8 haftalık, sağlıklı ve dişi BALB/c fareler kullanılmıştır. Fare çalışmaları Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26/08/2015 tarih ve 2015-13-150 sayılı kararı ile onaylanarak gerçekleştirilmiştir. Etik kurul karar örneği EKLER bölümünde yer almaktadır.

4.1.4. REAKTİF VE KİMYASALLAR

<u>Reaktif/Kimyasal Adı</u>	<u>Markası, Katalog Numarası</u>
2X Örnek Yükleme Tamponu	Invitrogen, NP0004
Anti His-Tag Antibody	Cell signaling 2365S
Aquaguard-2	Biological Industries, 01-916-1E
Asetik asit	Riedel-de Haën, 27225
Bromo	Merck, L59076322 936
BSA	VWR, 0332
ClonaCell™-HY Medium A	Stem Cell, 03801
ClonaCell™-HY Medium B	Stem Cell, 03802
ClonaCell™-HY Medium C	Stem Cell, 03803
ClonaCell™-HY Medium D	Stem Cell, 03804
ClonaCell™-HY Medium E	Stem Cell, 03805
ClonaCell™-HY PEG	Stem Cell, 03806
Complete Freund's Adjuvant	Sigma, F5881
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma, B7920
Derdevice P Yüzey Dezenfektanı	Deren İlaç, 58894
DMEM High Glucose	Lonza, 12-614F
DMSO	Sigma, D8418
DTT	Applchem, A2948
EDTA	Sigma, E5134
EDTA'sız proteaz inhibitör kokteyli	Roche, 11873580001
Ethanol	Applchem, A3678

FBS	Biowest, S1810
Gliserol	Sigma, G5516
Glisin	Amresco, 0167
Goat Anti Mouse HRP	Biorad, 170-5047
Goat Anti Rabbit HRP	BioRad 170-5046
HT	Sigma, H0137
Incomplete Freund's Adjuvant	Sigma, F5506
IPTG	Applichem, A4773
İmidazol	Applichem, A1378.0010
Kanamisin	Applichem, A1493.0010
Kloramfenikol	Applichem, A1806.0025
L-Glutamine (200 mM)	Biological Industries, 03-020-1B
Lizozim	Applichem, A4972
Luria Broth	Sigma, L3522
MEM NEAA (100X)	Biological Industries, 01-340-1B
MEM-Eagle, Earle's salts	Biological Industries, 01-025-1A
Methanol	Merck, 1.06009.2511
NaCl	Sigma, S3014
N-Lauroylsarcosine	Applichem, A1163.0025
PBS	Biological Industries, 02-023-1A
Penicillin-Streptomycin Solution	Biological Industries, 03-031-1B
Plasmocin	Invivogen, ant-mpp
SDS	Sigma, L4390
Streptomisin	Applichem, A1852.0100
Sülfirik asit	Merck, 1.60315.1000
Tetrasiklin	Applichem, A2228.0025
TMB/E Solüsyonu	Merck, ES001
Tris	Amresco, 0826
Trypan Blue Boyası	Thermo Scientific, J110131
Trypsin-EDTA Solution B	Biological Industries, 03-052-1B
Tween-20	Sigma, P9416
Üre	Amresco, 0378

β -mercaptoethanol

Merck, 8.05740.0250

4.1.5. TAMPONLAR

1X STE Tamponu: 1 ml 0.5M Tris, 1,5 ml 5M NaCl, 0,1 ml 0,5M EDTA, 47,4 ml ddH₂O

6X Laemmli Tamponu: 375 mM Tris-HCl pH:6.8, %9 SDS, %50 Gliserol, %0.03 Bromophenol blue, %9 β -mercaptoethanol

10X İmmünblotlama Koşturma Tamponu pH:8,3: 30,2 gr Tris, 144 gr Glisin, 10 gr SDS

10X İmmünblotlama Islak Transfer Tamponu: 30,2 gr Tris, 144 gr Glisin, 10 gr SDS, %20 Methanol

Sodyum Fosfat Tamponu pH:6,5: 68,5 ml 1M NaH₂PO₄, 31,5 ml 1M Na₂HPO₄, 100 ml 5M NaCl, 1800 ml ddH₂O

10X TBS pH:7,6: 24 gr Tris, 88 gr NaCl

4.1.6. KİTLER

Kit Adı

Markası, Katalog Numarası

ClonaCell™-HY Hybridoma Kit

Stem Cell, 03800

cOmplete™ lysis-M

Roche, 04 719 956 001

cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets

Roche, 11 697 498 001

HisPure ni-NTA Purification Kit

Thermo Scientific, 88229

Human EGFR Phosphorylation Antibody Array

Abcam, ab134005

Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit

Roche, 11 493 027 001

Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, 23225
Pierce Protein Concentrators, 3K MWCO	Thermo Scientific, 88512
Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System	Takara Biosciences, MK400
Slide-A-Lyzer™ Dialysis Cassette Kit, 7K MWCO	Thermo Scientific, 66372
WesternBright Sirius Chemiluminescent Detection Kit	Advansta, K-12043-D10

4.2. YÖNTEM

4.2.1. REKOMBİNANT ANTİJEN ÜRETİMİ

Tez danışmanı tarafından, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda EGFR alan 2'yi kodlayan 824-1251. nükleotidlerin pET-30a ifade plazmidi içerisine klonlanmış ve BL21(DE3) ve RosettaGami(DE3)pLysS suşlarında 6xHis tag ile konjuge halde ifade ettirilmek üzere transforme edilmiştir.

İfade edilen protein dizisi şu şekildedir:

(LTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDTC
PPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYE
MEEDGVRKCKKCGPCRK).

Transformantlar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.2.1.1. Bakteriyel Kültür Şartları

+4 °C'de muhafaza edilen stok koloni petrilerinden BL21, BL21 pET-30a, BL21 pET-30a.EGFRd2, RosettaGami pET-30a.EGFRd2 çalışma alanına getirildi. Kültürler küçük ve büyük ölçekli olmak üzere iki farklı hacimde gerçekleştirildi. Küçük ölçekli indüklemelerin gece boyu kültürü için 15 ml falkon tüpler, büyük ölçekli indüklemelerin gece boyu kültürü için 50 ml falkon tüpler aseptik şartlarda etiketlenerek hazırlandı. Hazırlanan tüpler içerisine uygun stok kolonilerden steril öze ile tek koloni alınarak Çizelge 4.2.'deki kombinasyonlara göre eklendi. Kolonilerin eklendiği tüpler

vortekslendikten sonra ısıtmalı-çalkalamalı inkübatöre yerleştirilerek, 37 °C 180 rpm’de gece boyu kültüre bırakıldı.

Çizelge 4.2. Küçük ve büyük ölçekli gece boyu kültür şartları

Gece Boyu Kültür Şekli	Eklenen Koloni	Hacim	Antibiyotik
Küçük Ölçekli	BL21	3 ml LB	Yok
Küçük Ölçekli	BL21 pET-30a	3 ml LB	25 µg/ml Kanamisin
Küçük Ölçekli	BL21 pET-30a.EGFRd2	3 ml LB	25 µg/ml Kanamisin
Büyük Ölçekli	BL21 pET-30a.EGFRd2	10 ml LB	25 µg/ml Kanamisin
Büyük Ölçekli	RosettaGami pET-30a.EGFRd2	10 ml LB	25 µg/ml Kanamisin, 12,5 µg/ml Tetrasiklin, 10 µg/ml Streptomisin, 34 µg/ml Kloramfenikol

4.2.1.2. Rekombinant EGFRd2 İfadesi

14-16 saat arası gece boyu kültürden sonra, tüpler inkübatörden alınarak buza gömüldü. Küçük ölçekli indüklemeler için 50 ml falkon tüpler, büyük ölçekli indüklemeler için steril 500 ml cam flasklar aseptik şartlarda etiketlenerek hazırlandı. Rekombinant EGFRd2 ekspresyonu indükleme için IPTG ajanı kullanıldı. İndükleme kontrolü için küçük ölçekli (IPTG – ve +) indükleme, protein saflaştırma için büyük ölçekli indükleme işlemleri gerçekleştirildi. Bu amaçla hazırlanan tüpler/flasklar, içerisine uygun gece boyu kültürlerden Çizelge 4.3.’deki kombinasyonlara göre eklenerek hazırlandı.

Çizelge 4.3. Küçük ve büyük ölçekli EGFRd2 ekspresyonu indükleme şartları

Gece Boyu Kültür Şekli	Eklenen Kültür	Hacim	Antibiyotik
Küçük Ölçekli	BL21	10 ml LB	Yok
Küçük Ölçekli	BL21 pET-30a	10 ml LB	25 µg/ml Kanamisin
Küçük Ölçekli	BL21 pET-30a.EGFRd2	10 ml LB	25 µg/ml Kanamisin
Büyük Ölçekli	BL21 pET-30a.EGFRd2	500 ml LB	25 µg/ml Kanamisin
Büyük Ölçekli	RosettaGami pET-30a.EGFRd2	5000 ml LB	25 µg/ml Kanamisin, 12,5 µg/ml Tetrasiklin, 10 µg/ml Streptomisin, 34 µg/ml Kloramfenikol

Küçük ölçekli indükleme için hazırlanan 50 ml falkon tüplerde bulunan kültürler ile büyük ölçekli indükleme için hazırlanan ve 500 ml flasklarda bulunan kültürler Çizelge 4.2.'deki kombinasyonlara uygun olarak hazırlandıktan sonra ısıtmalı-çalkalamalı inkübatöre kaldırıldı ve 28 °C 180 rpm'de çalkalamaya bırakıldı. Bu aşamadaki inkübasyon başladıktan sonra 1, 2, 2,5 ve 3. saatlerde kültürlerden örnek alınarak OD₆₀₀ absorbans değerleri mikropilaya okuyucuda (VICTOR3V, PerkinElmer) ölçüldü. BL21 kültürleri için 2,5-3. Saat aralığında, RosettaGami pET-30a.EGFRd2 kültürü için ise 6. Saatte OD₆₀₀ absorbans değerlerinin 0,4-0,5 aralığına ulaştığı gözlemlendi. Kültürlerin OD₆₀₀ absorbans değerleri 0,4-0,5 aralığına ulaştığında küçük ölçekli indükleme örneklerinin birer tüpü ve büyük ölçekli indükleme örnekleri üzerine son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde IPTG reaktifi eklendi. IPTG uygulaması sonrası örnekler 28 °C 180 rpm'de 3 saat inkübe edildi. 3 saat sonunda kültürler inkübatörden alındı. Her bir kültür örneğinden immün blotlama analizleri için örnekler ayrıldı. Sonrasında 500 ml flasklarda kültür edilen büyük ölçekli indükleme ürünleri buz üzerinde 50 ml falkon tüplere toplandı. Tüpler 4 °C 4750 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatantlar uzaklaştırılıp, pelletler buz üzerinde 1X STE tamponu ile yıkanarak tek bir tüpte toplandı. Tüpler 4 °C 4750 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant iyice uzaklaştırılıp, pelletler sıvı azotta dondurularak, daha sonra protein saflaştırması yapmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

4.2.1.3. Protein Çözünürlük Testi

1 mg lizozim, 10 ml 1X STE içerisinde hazırlanmış 5 mM imidazol ve 0,4 ml EDTA'sız proteaz inhibitör kokteyli karıştırıldı. Yukarıdaki karışımdan 500 µl alınarak 1,5 ml bakteriyel kültürden elde edilen pellet çözündürüldü. Çözülen pellet 15 dk buz üstünde inkübe edildi. 15 dk sonunda üzerine 2,5 µl 1M DTT ve 87,5 µl %10 N-Lauroylsarcosine eklendi. Tüp 3-6 kez 10'ar sn sonike edildi. 13.000 rpm 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni ve temiz bir ependorf tüpe aktarıldı ve etiketlendi (A-çözünür fraksiyon). Oluşan pellet 500 µl 8M üre içinde çözündürüldü. 1 saat 4 °C'de end-over rock platformunda inkübe edildi. 13.000 rpm 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni ve temiz bir ependorf tüpe aktarıldı ve etiketlendi (B-üre fraksiyonu). Oluşan pellet 500 µl 1X SDS-PAGE yükleme tamponunda (1X laemmlı tamponu) içinde çözündürüldü ve etiketlendi (C-çözünür olmayan fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri). Örneklerin SDS-PAGE ile analizi için her bir fraksiyon 20 µl örnek + 4 µl yükleme tamponu (6X laemmlı tamponu) ile karıştırıldı.

4.2.1.4. Nikel-Rezin Kit ile Protein Saflaştırma

30 ml 1X STE Buffer, 3 mg lizozim, 1,2 ml EDTA'sız proteaz inhibitör karıştırıldı. -80 °C'den indüklenmiş bakteriyel pellet buz üzerinde çalışma alanına getirildi. Pelletin yavaşça ve nazik bir biçimde çözünmesi sağlandı. İlk hazırlanan solüsyondan pellet üzerine 10 ml eklendi. Pellet bu solüsyon içinde pipetaj ile çözündürüldü. Çözülen pellet 15 dk buz üzerinde inkübe edildi. 15 dk sonunda pellet üzerine 50 µl 1M DTT eklendi. 1,75 ml %10'luk N-Lauroylsarcosine eklendi. Vortekslemeden pipetajla güzelce karıştırıldı. Tüp buz üzerine yerleştirildi. Sonikasyon cihazında 3 kez 30'ar saniye 3. seviye sonikasyon yapıldı. Tüp 10.000 rpm 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni 50 ml falkon tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine 2,75 ml %10'luk Triton-X 100 solüsyonu eklendi. Tüp vorteks ile karıştırıldı. Bu aşamada SDS-PAGE için örnek ayrıldı. 4 °C'den HisPure ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific) çalışma alanına getirildi. Kit içerisinde çıkan kolonların 15-20 dk oda ısısında bekleterek dengelenmesi sağlandı. Bir kolon için 10 ml equilibration buffer (1 ml 10X PBS, 50 µl 2M imidazol, 8,95 ml ddH₂O) ve 20 ml wash buffer (1 ml 10X PBS, 125 µl 2M imidazol, 8,875 ml ddH₂O) hazırlandı. Kolonun alt emzik kısmı açılarak 50 ml falkon tüpe oturtuldu. Kolon 700 g 4 °C'de 2 dk santrifüj edildi. Falkon tüp boşaltıldı. Üzerine 6 ml equilibration buffer eklendi.

Buffer eklendikten ve santrifüje koymadan önce kolon altından ilk damlanın geldiği gözlemlendi. Kolon 700 g 4 °C’de 2 dk santrifüj edildi. Bu esnada 13 ml protein örneği üzerine 50 µl 2 mM imidazol ve 100 µl 10X PBS eklendi. Santrifüj sonrası kolon alındı ve altları emzikle kapatıldı. Üzerine protein örnekleri eklendi. Kolon 4 °C soğuk odada end-over rock platforma yerleştirildi 45 dk dönerek inkübasyona bırakıldı. 45 dk sonunda kolon end-over rock platformdan alındı ve temiz 50 ml falkon tüpe oturtuldu. Kolon 700 g 4 °C’de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamada santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için örnek ayrıldı. Kalan eluat uzaklaştırıldı. Kolon üzerine yıkama için 6 ml wash buffer eklendi. Kolon 700 g 4 °C’de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşama 2 kez daha tekrar edildi. Bu aşamada (3. yıkamadan sonra) santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için örnek ayrıldı. Kalan eluat uzaklaştırıldı. Elüsyon aşamasına geçildi. Bir kolon için 10 ml elution buffer (1 ml 10X PBS, 1,25 ml 2M imidazol, 7,75 ml ddH₂O) hazırlandı. Kolon yeni ve temiz 50 ml falkon tüpe oturtuldu. Üzerine 3 ml elution buffer eklendi. Kolon 700 g 4 °C’de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamada (1. elüsyondan sonra) santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için ve BCA testi için örnek ayrıldı. Kalanı Elüsyon 1 protein örneği olarak etiketlenerek buza gömüldü. Kolon yeni ve temiz 50 ml falkona oturtuldu. Üzerine 3 ml elution buffer eklendi. Kolon 700 g 4 °C’de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamada (2. elüsyondan sonra) santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için ve BCA testi için örnek ayrıldı. Kalanı Elüsyon 2 protein örneği olarak etiketlenerek buza gömüldü. Kolon yeni ve temiz 50 ml falkona oturtuldu. Üzerine 3 ml elution buffer eklendi. Kolon 700 g 4 °C’de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamada (3. elüsyondan sonra) santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için ve BCA testi için örnek ayrıldı. Kalanı Elüsyon 3 protein örneği olarak etiketlenerek buza gömüldü.

4.2.1.5. Diyaliz

Saflaştırılan protein örneğinin pH dengesi ve tuzlardan arındırmak için diyaliz aşamasına geçildi. Diyaliz için Slide-A-Lyzer Diyaliz (MWKO 7K) kiti (Thermo Scientific) kasetleri kullanıldı. Elüsyon 1 ve elüsyon 2 örnekleri (3'er ml) kitin şırıngası yardımıyla kasetlere aktarıldı. Sonrasında kasetler hazırlanan fosfat tamponu pH:6,5 içerisine konularak soğuk odada gece boyu manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Bir gece sonra kasetler soğuk odadan alındı ve diyaliz kasetleri içerisindeki protein örnekleri 1,5 ml ependorf tüplere bölünerek etiketlendi ve -80 °C'ye kaldırıldı.

4.2.2. BCA TESTİ İLE TOTAL PROTEİN MİKTAR TAYİNİ

Standart olarak; rekombinant protein ve hücre lizatlarından elde edilen protein ölçümleri için BSA, antikor için BGG kullanıldı. BSA'dan veya BGG'den 2 mg/ml, 1mg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml'lik standart protein çözeltileri steril su ile hazırlandı. Konsantrasyonu ölçülecek protein örnekleri uygun konsantrasyonda dilüe edildi. Dilüsyonu yapılan örnekler 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 25 µl olacak şekilde üç tekrarlı olarak eklendi. Aynı şekilde standart protein çözeltileri de üç tekrarlı olarak her kuyuya 25 µl dağıtıldı. Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) içerisindeki A ve B reaktifleri 50/1 oranında karıştırılarak hazırlanan reaktiften her kuyuya 200 µl ilave edildi. Plaka 37 °C'de 30 dk karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 562 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Sonuçlar standart eğrilerle analiz edilerek protein konsantrasyonları belirlendi.

4.2.3. COOMASSİE BLUE BOYAMASI

SDS-PAGE ile yürütülen jel temiz ve boş cam kaba alındı. Jelin üzerine 20 ml fiksasyon solüsyonu (%40 ddH₂O, %10 asetik asit, %50 metanol) eklendi. 45 dk oda ısısında orbital çalkalayıcıda düşük devirde inkübe edildi. Ardından jel üzerinden fiksasyon solüsyonu uzaklaştırıldı. Jel üzerine 20 ml coomassie blue boya solüsyonu (%40 ddH₂O, %10 asetik asit, %50 metanol, %0,25 Coomassie Brilliant Blue R-250) eklendi. Kabin ağzı hava almayacak şekilde kapatılıp, +4 °C'de orbital çalkalayıcıda düşük devirde gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün boya jel üzerinden uzaklaştırıldı. Jel, oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde berraklaşana kadar boya giderici solüsyon (%67,5 ddH₂O, %7,5 asetik asit, %25 metanol) ile yıkandı. Bantlar belirginleşince jel fotoğraflandı.

4.2.4. İMMÜNBLOTLAMA

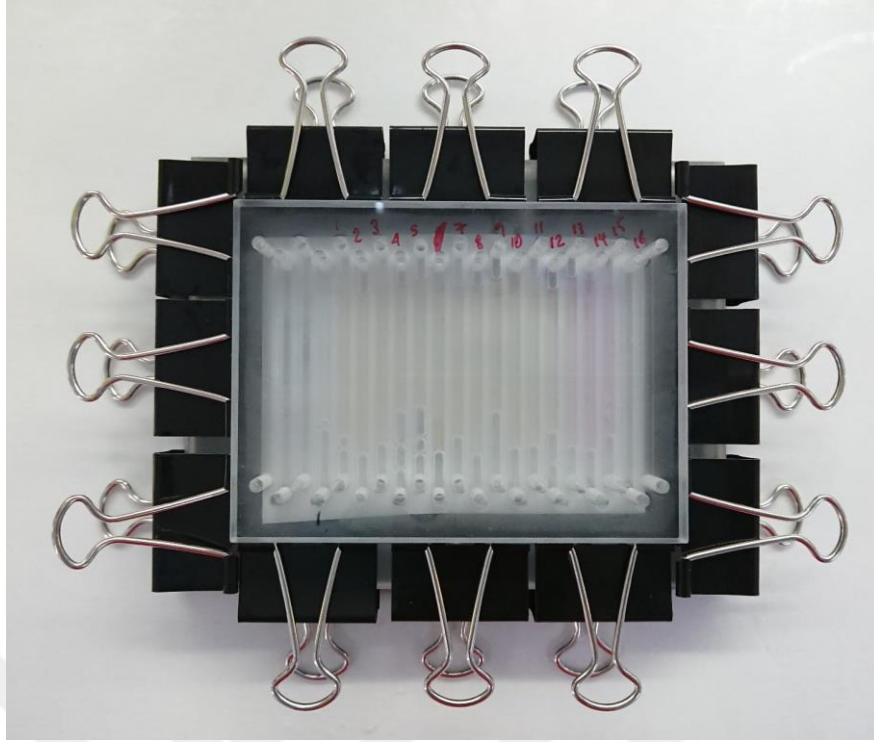
İmmünblotlama çalışmaları klasik immünblotlama ve surf immünblotlama olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirildi. Teknikler SDS-PAGE ve primer antikor ile işaretleme aşamalarında farklılık göstermektedir. Teknik detayları aşağıda verilmiştir.

4.2.4.1. Klasik İmmünblotlama

Klasik immünblotlama; protein örneklerinin jel kuyularına ayrı ayrı yüklenmesi, SDS-PAGE ile ayrılması, proteinlerin membrana transferi, membranı bloklama, primer antikor ile işaretleme, yıkamalar, sekonder antikor ile işaretleme, yıkamalar ve kemiluminesans görüntüleme şeklinde gerçekleştirilmektedir. Jel kuyu sayısı kapasitesi kadar örnek yüklenmekte ve hedef proteinler işaretlenerek seviyeleri analiz edilmektedir.

4.2.4.2. Surf İmmünblotlama

Surf immünblotlama için Surf-Blot Antibody Screening System (Idea Scientific, 5055) kullanılmıştır. Surf immünblotlamada marker hariç jel tek kuyulu olacak şekilde hazırlanır. Ardından tek bir protein örneği bu geniş kuyuya yüklenir. Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması, membrana transferi ve membranı bloklama işlemlerinden sonra membran surf blot aparatı altına yerleştirilir. Bunun için öncelikle surf blot metal plaka düz bir zemine konumlandırılır. Üzerine siyah ped ve pedin üzerine de plaka boyutunda esnememiş parafilm yerleştirilir. Parafilm üzerine membran dikkatlice konulur. Fazladan sıvı veya hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilir. Membran üzerine de surf blot kuyu konumlarına dikkat edilerek surf blot aparatı yerleştirilir. Aparat ile metal plaka etrafı ataçlarla (Binderclips, OM97008) sabitlenir. Membran ve kuyuların konumları kontrol edilerek kuyular numaralandırılır. Hazırlanmış bir surf blot sistemi fotoğraflanarak şekil 4.1.'de verilmiştir. Numaralanan kuyulara primer antikorlar/serumlar maksimum 150 µl olacak şekilde eklenir. Primer antikor işaretlemeleri devamındaki işlemler; yıkamalar, sekonder antikor ile işaretleme, yıkamalar ve kemiluminesans görüntüleme şeklinde gerçekleştirilmektedir. Böylelikle tek bir protein örneği üzerinde aynı anda pek çok antikorun işaretlemesi yapılarak analiz edilebilmektedir.



Şekil 4.1. Surf immüblotlama işlemi için hazırlanmış aparat görüntüsü

4.2.4.3. Proteinlerin SDS-PAGE ile Ayrılması

İmmün blotlama çalışmalarında hazır Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels (BioRad, 4568123) kullanıldı. Jel koşturma için ise Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, 1658005) kullanıldı. SDS-PAGE için öncelikle hazır jelin tarağı çıkarıldı ve jel altındaki güvenlik bandı söküldü. Jel SDS-PAGE aparatına oturtuldu. Üzerine kuyuları da yıkayarak 1X koşturma tamponu eklendi. Ardından örnekler jel kuyularına uygun miktarlarda yüklendi. Yüklemeden sonra jel 90 V'da 75 dk koşturuldu.

4.2.4.4. Proteinlerin Membrana Transferi

Islak transfer işlemleri için Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, 1703935) kullanıldı. SDS-PAGE sonrası jel bulunduğu kasetten dikkatlice ayrıldı. Ayrılan jel kurumaması için 1X ıslak transfer tamponu içerisine bırakıldı. Membran jel boyutlarında kesilip %100 metanol içerisinde 5 dk inkübe edildi. Ardından 1X ıslak transfer tamponundan geçirildi. Bu esnada transfer sandviçi hazırlandı. Siyah kısım altta olacak şekilde sırasıyla: sünger-filtre kağıdı-jel-membran-filtre kağıdı-sünger şeklinde sandviç oluşturuldu. Sandviç

üzerinden merdane ile geçilerek olası hava kabarcıkları giderildi. Ardından sandviç aparatı kapatılarak transfer sistemine oturtuldu. Transfer tankı soğuk 1X ıslak transfer tamponu ile dolduruldu ve -20 °C buz aküsü tank içine yerleştirildi. Sonrasında sistem 90 V'da transfer edilecek protein büyüklüğüne göre uygun sürede (20-100 kDa için 1 saat, 100 ve üzeri kDa için 2 saat) çalıştırıldı.

4.2.4.5. Bloklama

Transfer işlemi sonrasında membran temiz ve boş cam kaba alındı. Üzerine 30 ml %5 BSA (%0,025 Tween-20 içeren 1X TBS'de hazırlanmış) solüsyonu eklendi. Kap oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde yavaş devirde bir saat inkübe edildi. Sonunda bloklama solüsyonu membran üzerinden uzaklaştırıldı.

4.2.4.6. Primer Antikor ile İşaretleme

Klasik immüblotlamada bloklama sonrası membranı primer antikor ile işaretleme için, uygun primer antikor %5 BSA solüsyonu içerisinde gerekli dilüsyonda hazırlanarak toplam 10 ml hacimde membran üzerine eklendi. Kabın ağzı hava almayacak şekilde kapatılıp, +4 °C'de orbital çalkalayıcıda düşük devirde gece boyu inkübe edildi.

Surf immüblotlamada bloklama sonrası membranı primer antikorlarla ile işaretleme için, uygun primer antikorlar %5 BSA solüsyonu içerisinde gerekli dilüsyonda hazırlanarak toplam 150 µl hacimde surf blot kuyularına eklendi. Ekleme sonrası primer antikor dilüsyonunun kuyucuklar içerisinde hava kabarcığı oluşmadan hareket ettiği gözlemlendi. Ardından surf blot aparatı +4 °C'de orbital çalkalayıcıda düşük devirde gece boyu inkübe edildi.

4.2.4.7. Sekonder Antikor ile İşaretleme ve Görüntüleme

Gece boyu primer antikor ile işaretleme sonrası ertesi gün primer antikor membran üzerinden uzaklaştırıldı. Membran 3 kez 10'ar dk 1X TBS-T solüsyonu ile orbital çalkalayıcı üzerinde orta devirde çalkalanarak yıkandı. Sonrasında, uygun sekonder antikor %5 BSA içeren 1X TBS-T solüsyonu içerisinde gerekli dilüsyonda hazırlanarak toplam 10 ml hacimde membran üzerine eklendi. Kabın ağzı hava almayacak şekilde kapatılıp, oda ısısında ve karanlıkta orbital çalkalayıcıda düşük devirde bir saat inkübe edildi. İnkübasyon

sonrası membran 3 kez 10'ar dk 1X TBS-T solüsyonu ile orbital çalkalayıcı üzerinde orta devirde çalkalanarak yıkandı. Yıkama sonrası membran kemiluminesans solüsyon ile kaplandı ve Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) sisteminde Chemi 200 kanalında kemiluminesans görüntüleme yapıldı. Referans marker görüntülemeleri için 700 kanalı kullanıldı.

4.2.5. İNDİREK ELISA TESTİ

ELISA testinden bir gün önce 96 kuyulu ELISA plakası (Thermo Scientific F96 Maxisorp Nunc Immuno Plate, 442404) spesifik antijen ile kaplandı. Bunun için saf antijen deney tasarımına bağlı olarak 1X PBS ile 2 µg/ml veya 10 µg/ml konsantrasyona seyreltildi. Ardından her bir kuyuya 100 µl antijen eklendi. Plaka bir saat oda ısısında inkübe edildi. Sonrasında ağzı kapatılarak gece boyu +4 °C'de inkübasyona devam edildi. Ertesi gün proteinler kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Kuyucuklar PBS-T (PBS+ %0,1 Tween 20) ile 3 kez yıkandı. Bloklama için %5 BSA 1X PBS içerisinde hazırlandı. Kuyucuklar üzerine 200'er µl eklendi. 1 saat 37 °C'de, 30 dakika da oda ısısında inkübe edildi. Kuyulardan bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı. Primer antikör örnekleri (Seyreltilmiş edilmiş fare serumları, hücre kültürü süpernatantları veya antikör saflaştırma ürünleri) kuyucuklara 100'er µl dağıtıldı. 3 saat oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı üzerinde en hızlı devirde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklar PBS-T ile 3 kez yıkandı. HRP işaretli sekonder antikör uygun dilüsyonda PBS içinde (1/2000) hazırlandı. 100'er µl olarak kuyucuklara dağıtıldı. Yaklaşık 1 saat oda ısısında oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı üzerinde en hızlı devirde inkübe edildi. Sekonder antikör uygulama sonrası kuyucuklar PBS-T ile 3 kez yıkandı. HRP substratı TMB'den kuyucuklara 100'er µl dağıtıldı. 20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. 50 µl 2M sülfirik asit ile reaksiyon durduruldu. 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda (VICTOR3V, PerkinElmer) değerler elde edildi.

4.2.6. HÜCRE KÜLTÜRÜ

4.2.6.1. Hücre Kültürü Genel Çalışma Kuralları

Hücre kültürü özel olarak dizayn edilmiş bir çalışma alanında gerçekleştirildi. Bu alana girişlerde, alan dışarısına çıkarılmayan ve düzenli olarak yıkanan önlükler kullanıldı.

Hücre kültürü çalışma alanı haftalık ve aylık periyotlarda düzenli olarak temizlendi. Rutin dezenfektan olarak %70 EtOH kullanıldı. Temizlikler sırasında ise CO₂ inkübatörü, laminar kabin, su banyosu ve santrifüjler Derdevice P Yüzey Dezenfektanı ile temizlendi. Su banyosu içerisinde yer alan su aylık temizliklerde değiştirildi ve 15 günde bir kontaminasyon engelleyici Aquaguard-2 solüsyonu eklendi. Laminar kabin UV lambası her çalışmanın öncesinde ve sonrasında 45 dk süreyle çalıştırıldı. Hücre kültürü çalışma alanında ise oda tavanına monte edilen bir UV lambası her gece 3 saat süreyle otomatize olarak çalıştırıldı. Yerlerin temizliği çamaşır suyu ile yapıldı. Çalışma atıkları %10'luk çamaşır suyu ile muamele edildikten sonra tıbbi atık poşetlerinde toplanarak atıldı. Çalışma alanına dışarıdan getirilen her sarf malzeme alana girişte %70 EtOH ile dezenfekte edildi. Çalışmalar sırasında kabin içerisine alınan her sarf malzeme %70 EtOH ile dezenfekte edildi. Alana ilk girişten itibaren giyilen eldivenler sıklıkla %70 EtOH ile dezenfekte edildi, gerektiğinde değiştirildi.

4.2.6.2. Hücre Hatlarının Kültür Koşulları

Çalışmada kullanılan hücre hatlarının kültür edildiği besiyeri ortamlarına ait bilgiler Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Hücre hatlarının kültür koşulları

Hücre Hattı	Besiyeri	İlave Bileşenler
FO	ClonaCell™-HY Medium A (Stem Cell, 03801)	-
MCF-7	DMEM with 4.5 g/l Glucose, without L-Glutamine (Lonza, 12-614F)	%10 FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin, 5 µg/ml Plasmocin
MDA-MB-468	MEM-Eagle, Earle's salts (Biological Industries, 01-025-1A)	%10 FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin, 5 µg/ml Plasmocin
Caco-2	DMEM with 4.5 g/L Glucose, without L-Glutamine (Lonza, 12-614F)	%20 FBS, 2 mM L-Glutamine, 1X MEM NEAA, 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin, 5 µg/ml Plasmocin
HeLa	DMEM with 4.5 g/L Glucose, without L-Glutamine (Lonza, 12-614F)	%10 FBS, 2 mM L-Glutamine, 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin, 5 µg/ml Plasmocin

4.2.6.3. Stoktan Hücre Açılması

Stoktan hücre açılması öncesinde kültür besiyeri su banyosunda 37 °C'ye ısıtıldı. Sıvı azotta muhafaza edilen hücre hatları buz üzerinde hücre kültürü çalışma alanına getirildi. Hücrelerin bulunduğu cryovial tüpler 1 dk 37 °C su banyosunda inkübe edildi. Cryovial tüplerin ağzı %70 EtOH ile silindikten sonra 1 ml hücre süspansiyonu, 4 ml önceden ısıtılmış kültür besiyerine eklenip karıştırıldı ve 15 ml falkon tüpte toplandı. 1500 rpm 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Pellette kalan hücreler taze kültür besiyerinde çözöldükten sonra uygun kültür kabına aktarıldı. Mikroskop altında kontrol edildikten sonra 37 °C %5 CO₂ inkübatörüne kaldırılarak idame edildi.

4.2.6.4. Hücre Pasajlama

İdame edilen hücreler günlük olarak invert mikroskop altında kontrol edildi. %80 doluluğa ulaşan hücreler pasajlandı. Pasajlama işlemi öncesi PBS, Tripsin-EDTA solüsyonu ve kültür besiyeri su banyosunda 37 °C'ye ısıtıldı. Rutin olarak T-75'lik flasklarda idame edilen hücreler ilk 10 ml PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üzerine 3 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. 37 °C hücre kültürü inkübatöründe üç ila beş dakika arası inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrışma durumları invert mikroskop altında kontrol edildi. Ayrıştığı gözlenen hücreler 7 ml kültür besiyeri ile 15 ml falkon tüpte toplandı. 1500 rpm 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Pellette kalan hücreler taze kültür besiyerinde çözöldükten sonra 1:3 oranında 3 ayrı T-75 flaska ekildi. Mikroskop altında kontrol edildikten sonra 37 °C %5 CO₂ inkübatörüne kaldırılarak idame edildi.

4.2.6.5. Hücrelerden Stok Alımı ve Saklama Koşulları

Hücrelerden stok alımı için öncelikle dondurma çözeltisi hazırlandı. Hibridoma hücreleri ve F0 miyelom hücreleri %90 FBS, %10 DMSO karışımında donduruldu. Diğer hücreler ise %70 kültür besiyeri, %20 FBS, %10 DMSO karışımında donduruldu. Dondurma çözeltileri her zaman taze hazırlandı ve dondurma işlemine kadar 4 °C'de tutuldu. Stok alınacak hücre öncelikle 4.2.6.4. bölümünde tarif edildiği üzere tripsinize edilerek bulunduğu yüzeyden ayrılarak pellet şeklinde toplandı. Ardından soğuk dondurma çözeltisinde çözöldü. Çözölen hücreler cryovial tüplere 1 ml hücre süspansiyonu/cryovial

olacak şekilde dağıtıldı. Tüpler etiketlendi ve Mr. Frosty (Thermo Scientific, 5100-0001) dondurma kabına yerleştirildi. Mr. Frosty dondurma kabı -80 °C'ye kaldırıldı. Bir gece sonra hücreler sıvı azot tankına transfer edildi.

4.2.6.6. Hematositometre ile Hücre Sayımı

Sayım yapılacak hücre öncelikle 4.2.6.4. bölümünde tarif edildiği üzere tripsinize edilerek bulunduğu yüzeyden ayrılarak pellet şeklinde toplandı. Ardından taze kültür besiyerinde çözüldü. 1,5 ml endorf tüpe 100 µl hücre süspansiyonu ve 100 µl trypan blue boyası eklenerek pipetajla karıştırıldı. 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Hematositometre üzeri lamel ile kapatıldı ve hazırlanan hücre-trypan blue karışımından 10 µl eklendi. Hematositometre invert mikroskop altında 10X optik büyütmede görüntülendi. Dört köşedeki 16 kare ve ortadaki 20 karelik alandaki canlı ve ölü hücreler sayılarak not edildi. Toplam beş ayrı bölgedeki canlı hücre sayıları toplandı. Ardından şu formüle göre hesaplama yapıldı.

$$\text{Alandaki hücre sayısı ortalaması} = \text{Canlı Hücre Sayısı} / \text{Alan Sayısı}$$

$$\text{Dilüsyon faktörü} = \text{Son hacim} / \text{Hücre Hacmi}$$

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \text{Alandaki Hücre Sayısı Ortalaması} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4$$

4.2.6.7. Hücre Hatlarından Total Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu yapılacak hücre hattı 6 kuyulu plakaya her bir kuyuya hücre büyüme kinetiğine uygun sayıda olacak şekilde ekildi. Hücreler %70-80 doluluk oranına ulaştığında hücrelerden protein izolasyonu işlemine başlandı. Hücreler öncelikle 2 kez soğuk 1X PBS ile yıkandı. Ardından kuyular kazıyıcı ile kazınarak 1X PBS içerisinde 3 kuyu bir endorf tüpe toplandı. Tüpler 5000 g 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletler üzerine, her bir tüpe, 500 µl cOmplete™ lysis-M (Roche) ve cOmplete™ proteaz inhibitörü (Roche) tamponundan (10 ml lysis-M solüsyonu içerisine bir adet proteaz inhibitör tablet) eklendi. Pelletler pipetajla çözüldü. 10 dk oda ısısında çalkalayıcı üzerinde nazikçe çalkalanarak inkübe edildi. Tüpler 13.000 rpm 4 °C'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni ve temiz bir tüpe aktarılıp, etiketlenerek -80 °C'de muhafaza edildi.

4.2.7. HİBRİDOMA

Hibridoma deneyleri ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (Stem Cell) kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam beş komponentten oluşan kit monoklonal antikor geliştirilmesinde füzyondan klon eldesine kadar olan süreçteki tüm ihtiyaçları karşılamaktadır. Bu beş komponent arasında miyelom ve hibridoma kültür besiyeri ClonaCell™-HY Medium A, hibridoma füzyon besiyeri ClonaCell™-HY Medium B (serumsuz), hibridoma füzyon toplarlama besiyeri ClonaCell™-HY Medium C, yarı-katı metil-sellüloz seleksiyon besiyeri ClonaCell™-HY Medium D (HAT+), hibridoma geliştirme besiyeri ClonaCell™-HY Medium E (HT+) bulunmaktadır. Prensip olarak miyelom hücreleri ile fare B hücrelerinin PEG aracılı füzyonu sonrası yarı-katı metil-sellüloz besiyerlerinde HAT ile seleksiyonuna dayanır. Besiyerleri füzyon ve hibridoma için gerekli tüm büyüme faktörleri, hormonlar vb. içerdiği için feeder hücre, HT gibi ek hiçbir bileşene gerek duyulmamaktadır. Hibridoma deneylerine ait detaylar ilerleyen alt başlıklarda detaylandırılmıştır.

4.2.7.1. Farelerin İmmünizasyonu

Antijen -80 °C'den alınıp buz üzerinde çözöldü. Ardından ilk immünizasyon aşısı için, 50 µg/ml konsantrasyonda EGFRd2 antijeni 1:1 oranında Complete Freund's Adjuvant ile karıştırıldı. Antijen ve adjuvan karışımı, iyice karışacak şekilde vortekslendi. Ardından 6-8 haftalık, sağlıklı ve dişi BALB/c fareye intraperitoneal yoldan enjekte edildi. Sonrasındaki immünizasyonlar 15'er gün arayla, yine 50 µg/ml EGFRd2 antijeni 1:1 oranında bu sefer Incomplete Freund's Adjuvant ile karıştırıldı. Antijen ve adjuvan karışımı, iyice karışacak şekilde vortekslendi. Fareye intraperitoneal yoldan enjekte edildi. Füzyondan 5 gün önce boost immünizasyon 50 µg/ml EGFRd2 antijeninin saf olarak intraperitoneal yoldan enjeksiyonu şeklinde gerçekleştirildi.

4.2.7.2. Miyelom Hücrelerinin Füzyona Hazırlanması

F0 miyelom hücreleri füzyondan bir hafta önce medium A içerisinde kültür edilmeye başlandı. Füzyondan beş gün öncesinden başlanarak günlük olarak hücrelere 1X HT uygulaması yapıldı. Füzyon günü miyelom hücreleri 1 adet 50 ml falkonda toplandı. 300xg 10 dk oda ısısında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Miyelom hücreleri üzerine 30 ml medium B eklendi ve hücreler dikkatlice çözöldü. 300xg 10 dk oda ısısında santrifüj edildi. Bu aşama 3 kez tekrar edildi. Medium B ile toplamda 3 kez yıkama yapıldı. Son

yıkamadan sonra hücreler 25 ml medium B'de çözüldü. Hücreler sayıldı. 2×10^7 sayıda hücre ayrıldı. Sayılan hücreler füzyona kadar oda ısısında bekletildi.

4.2.7.3. Splenositlerin (Dalak Hücreleri) Füzyona Hazırlanması

İmmünize olduğu belirlenen fareye 3:1 oranında ketamin:ksilazin ile anestezi uygulandı. Fare uyku durumuna geçince steril laminar akışkan kabin içerisinde diseksiyona hazır hale getirildi. Fare peritoneal bölgesi steril makasla açılarak dalak çıkarıldı. Dalak, ayrı bir steril laminar akışkan kabin içerisinde, steril petri kabında şırınga yardımıyla Medium B ile yıkanarak ezildi. Dalak hücreleri üzerine 30 ml medium B eklendi. 400xg 10 dk oda ısısında santrifüj edildi. Bu aşama 3 kez tekrar edildi. Medium B ile toplamda 3 kez yıkama yapıldı. Son yıkamadan sonra hücreler 25 ml medium B'de çözüldü. Hücreler sayıldı. 1×10^8 sayıda hücre ayrıldı. Sayılan hücreler füzyona kadar oda ısısında bekletildi.

4.2.7.4. PEG Aracılı Füzyon

Füzyon öncesi PEG, medium A, B ve C 37 °C'ye ısıtıldı. Füzyon için hazırlanan 2×10^7 miyelom hücresi ile 1×10^8 dalak hücresi 50 ml falkonda karıştırıldı. 400xg 10 dk oda ısısında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün altına hafifçe vurarak hücre pelleti dağıtıldı. 1 ml PEG, 1 ml serolojik pipetle 1 dakika boyunca karıştırmadan pellet üzerine yavaşça bırakıldı. Sonraki 1 dakika boyunca pellet pipet ile dikkatlice karıştırıldı. Pellet üzerine 4 ml medium B eklendi. 4 dakika boyunca pipet ile karıştırıldı. Yavaşça 10 ml medium B eklendi. 37 °C'de 15 dakika inkübe edildi. Yavaşça 30 ml medium A eklendi. 400 g 7 dk oda ısısında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Yavaşça 40 ml medium A eklendi. 400 g 7 dk oda ısısında santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler yavaşça 10 ml medium C'de çözüldü. Süspansiyon T-75 flaska aktarıldı. Flaska 20 ml daha medium C ilave edildi ve füzyon hücreleri toplamda 30 ml medium C içerisinde ekilmiş oldu. 16-24 saat arası 37 °C'de %5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi.

4.2.7.5. Yarı Katı HAT Besiyeri ile Seleksiyon

Füzyondan bir gün sonra medium D iyice karıştırıldı ve oda ısısına getirildi. T-75 flastaki hücreler 50 ml falkona alındı. 400xg 10 dk oda ısısında santrifüj edildi. Hücreler 10 ml medium C'de çözüldü. 10 ml'lik hücre süspansiyonu direk 90 ml medium D şişesine eklendi. Sertçe karıştırıldı. 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. 12 ml'lik 16 gauge-blunt-end

needle şırınga ile 100 mm petri kaplarına baloncuk olmamasına dikkat ederek 9,5'ar ml dağıtıldı. Yarı katı besiyeri petriye güzelce yayıldı. HAT bulunan bu yarı-katı besiyerinde hücreler 10-14 gün inkübe edildi ve koloni oluşturmaları beklendi.

4.2.7.6. Hibridomaların Yarı Katı Seleksiyon Besiyerinden Toplanması

Füzyondan 10 gün sonra yarı katı besiyeri üzerinde koloniler oluştu, koloniler laminar akışlı kabin içerisinde ve mikroskop altında mikropipet yardımıyla 48 kuyulu hücre kültür plakalarına medium E içerisine toplandı. Kolonilerin antikor salgılama durumlarının belirlenmesi ve indirek ELISA testi ile taranması süresince, hücreler medium E içerisinde idame edildi. Koloniler çoğalıp besiyerlerini asidik düzeye getirince, süpernatantlar toplanarak indirek ELISA testi ile EGFRd2 antijenine karşı test edildi.

4.2.7.7. Alt Klonlama ile Kolonilerin Monoklonalleştirilmesi

Alt klonlama için idame edilen hibridoma kolonisi toplandı ve santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml medium A içerisinde çözüldü. 96 kuyulu hücre kültür plakasının tüm kuyularına 100 µl medium A eklendi. Ardından A1 nolu kuyuya 100 µl hacimde 2×10^3 sayıda hücre süspansiyonu eklendi. Bu kuyudan başlanarak H kuyusuna kadar aşağı doğru pipetajla 1:2 oranda 8 dilüsyon yapıldı. Bu işlemten sonra çok kanallı pipet yardımıyla 1. sütundan 12. sütuna kadar yine 100'er µl hacimde 1:2 dilüsyon yapıldı. Son olarak tüm kuyulara 100 µl medium A eklenerek hücreler toplam 200 µl hacimde idameye bırakıldı. Yaklaşık 7 gün sonra kuyular invert mikroskop altında kontrol edilerek derecelendirildi. 7-10 gün arası dilimde besiyeri asiditeye kayınca plaka indirek ELISA ile EGFRd2 antijenine karşı tarandı. Neredeyse tüm kuyular pozitif salgılayıcı olarak belirlenince tek koloni içerip en yüksek sinyale sahip olan kuyudaki hücre alınarak ikinci kez alt klonlamaya tabi tutuldu. İkinci alt klonlama işleminde de aynı başarı ölçütleri sağlanınca alt klonlanan koloni monoklonal olarak kabul edildi.

4.2.8. ANTİKOR İZOTİPLENDİRME

Antikor izotiplendirme işlemi için Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche) kullanıldı. Test edilecek antikor içeren hücre kültür süpernatantı %1 BSA ile 1:10 oranında dilüe edildi. Saf antikor ise %1 BSA ile 2 µg/ml konsantrasyona dilüe edildi. Dikkatlice vortekslendi. Dilüentten 150 µl alınıp bead içeren strip tüpüne aktarıldı. 30 sn

oda ısısında inkübe edildi. Kısaca vortekslendikten sonra beadlerin tamamen çözündüğü görüldü. Ardından strip tüpe daldırıldı ve 3 dk oda ısısında inkübe edildi. Strip tüpten çıkarıldı. 10 dk içerisinde ağır ve hafif zincirlere ait en üstte yer alan pozitif kontrol bantları ve analizi yapılan monoklonal antikorun bantları strip üzerinde mavi renkte belirginleşti. Stripler fotoğraflandı.

4.2.9. ANTİKOR SAFLAŞTIRMA

Antikor saflaştırma işlemi için Hitrap Protein G HP 1 ml (GE Healthcare, 17-0404-1) veya 5 ml (GE Healthcare, 17-0405-1) kolonları kullanıldı. Sıvı geçişleri peristaltik pompa (Lead Fluid, Model No: BT101L) yardımıyla kolon karakteristiklerine uygun olarak gerçekleştirildi.

4.2.9.1. Saflaştırma Öncesi Örnek Hazırlığı

Antikor saflaştırma için öncelikle hibridoma hücreleri FBS detoksuna tabi tutuldu. Standart olarak %10 FBS içeren besiyerinde kültür edilen hücreler sırasıyla %7,5, %5, %2,5 ve %1 FBS içeren besiyerinde kültür edildi. Tüm yüzdelerden süpernatant ayrılarak indirek ELISA testiyle antikor salgılama durumları kontrol edildi. Saflaştırma için ise %1 FBS içeren kültür süpernatantı kullanıldı. Süpernatantlar saflaştırmadan önce 10.000xg'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen süpernatant 0,45 µm filtreden geçirildi. Ardından 1:1 oranında 2X bağlama tamponu ile karıştırıldı.

4.2.9.2. Örneklerin Kolondan Geçirilmesi

Peristaltik pompa hortumu bağlama tamponu (20 mM Sodyum Fosfat Tamponu, 150 mM NaCl, pH:7) ile dolduruldu. Pompa hortumu kolona bağlandıktan sonra, kolon 5-10 kolon hacmi kadar bağlama tamponu ile yıkandı. Küçük kolonlar için 1 ml/dk, büyük kolonlar için 5 ml/dk hızında geçirme yapıldı. Hazırlanmış hücre kültürü süpernatantı küçük kolonlar için 0,5 ml/dk, büyük kolonlar için 2,5 ml/dk hızında geçirildi. Örnek geçişi tamamlandıktan sonra kolon 5-10 hacim kadar bağlama tamponu ile yıkandı. OD280 absorbans ölçümü ile elüantlarda protein kalmayınca kadar bu işlem devam ettirildi. Kolona bağlanan antikor 5 kolon hacmi elüsyon tamponu (0,1 M Glisin, pH:2,7) ile 0,5 ml/dk (küçük kolon) ve 2,5 ml/dk (büyük kolon) hızında her bir ml fraksiyon için 50 µl

nötralizasyon tamponu (1M Tris-HCl, pH:9) içerisine elute edildi. OD280 absorbans ölçümü ile elüantlerde protein kalmayınca kadar bu işlem devam ettirildi.

4.2.9.3. Diyaliz ile Antikorların Tampon Değişimi

Saflaştırılan antikor örneğinin tampon değişimi için diyaliz aşamasına geçildi. Diyaliz için Slide-A-Lyzer Dializ, MWKO 7K kasetleri (Thermo Scientific) kullanıldı. Elüantlar kitin şırıngası yardımıyla kasetlere aktarıldı. Sonrasında kasetler hazırlanan PBS (1:500) içerisine konularak soğuk odada gece boyu karıştırıldı. 1 gece sonra kasetler soğuk odadan alındı ve diyaliz kasetleri içerisindeki antikor örnekleri toplandı.

4.2.9.4. Antikor Miktar Tayini

Saflaştırılan antikorum miktar tayini BCA testi ile belirlendi. Standart protein olarak BGG kullanıldı. Saflaştırılan antikorum miktar tayini kontrolü için ayrıca Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, Model No: ND1000) spektrofotometrede Protein A280 kanalı IgG okuma modunda ölçüm yapıldı.

4.2.9.5. Saflaştırılan Antikorum Konsantrasyonu

Antikor konsantrasyonunu artırmak için Pierce Protein Concentrators 3K MWCO (Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Diyaliz sonrası antikor örneği konsantratöre aktarıldı. 5000xg'de 5'er dk süre ile kontrollü olarak santrifüj edildi. Konsantratör verimi her santrifüjden sonra Nano Drop okuması ile kontrol edildi. İstenilen yoğunluğa gelen antikor konsantratör haznesinden dikkatlice toplandı.

4.2.10. HÜCRE CANLILIK ANALİZLERİ

4.2.10.1. WST-1 Testi ile Nokta Zamanlı Hücre Canlılık Analizi

Nokta zamanlı hücre canlılık analizleri WST-1 testi gerçekleştirildi. WST-1 testi için Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System (Takara Biosciences) kiti kullanıldı. Öncelikle kanser hücre hatları 96 kuyulu plakalara Caco-2 ve MDA-MB-468 hücre hatları 5×10^4 /kuyu, HT-29, MDA-MB-231 ve HeLa hücreleri ise 3×10^4 /kuyu sayıda 200 μ l hacimde ekildi. Ekimden 24 saat sonra hücreler üzerine CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR antikor ve pozitif kontrol olarak ticari terapötik anti-EGFR antikor olan Cetuximab,

(Erbix, Merck) 2, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda uygulandı. Negatif kontrol olarak uygulama yapılmayan hücreler bırakıldı. Antikor uygulamalarından 48 saat sonra hücreler üzerine 20 µl WST-1 reaktifi eklendi. 2 saatlik inkübasyon sonrası 450 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Sonuçlar negatif kontrol kuyuları %100 canlı baz alınarak canlılık değerleri analiz edildi.

4.2.10.2.xCELLigence Platformu ile Gerçek Zamanlı Hücre Canlılık Testi

Gerçek zamanlı hücre canlılık testleri için xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemlerinin (Acea Biosciences) RTCA-DP modeli kullanıldı. Sayılan hücreler sistemde özel plakalara (E-plate 16) ekildi. Caco-2 ve MDA-MB-468 hücre hatları için 5×10^4 /kuyu, ve HeLa hücreleri için 3×10^4 /kuyu sayıda hücre bir tüpte hazırlandıktan sonra, öncelikle sistem plakalarının kuyularına 100 µl 37°C sıcaklıktaki hücre içermeyen kültür besiyeri konuldu. Ardından plakalar sisteme yerleştirildi. Yazılım çalıştırılıp bir dakikalık arka plan ölçümü alındı. Ölçüm sonrası plakalar sistemden çıkarıldı ve laminar kabine getirildi. Burada plaka kuyularına 100 µl hacimde hücreler her kuyuya eşit sayıda olacak şekilde ekildi. Ekim sonrası plakalar laminar kabin içerisinde oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası plakalar sisteme yerleştirildi ve yazılım üzerinden her 15 dakikada bir ölçüm alacak şekilde ayarlanarak deney tasarımına uygun saatte analiz başlatıldı. Sistem plakalarına hücre ekiminden 24 saat sonra hücreler üzerine CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR antikor ve pozitif kontrol olarak ticari terapötik anti-EGFR antikor olan Cetuximab, (Erbix, Merck) 2, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda uygulandı. Plakalar sisteme yerleştirildi ve deney yazılım üzerinden takip edildi.

4.2.11. EGFR FOSFORİLASYON ARRAY TESTİ

Caco-2 kolorektal kanser hücreleri 6 kuyulu plakaya 5×10^5 /kuyu sayıda ekildi. Hücre ekiminden üç gün sonra hücreler bulundukları kuyuda %80 doluluğa ulaştığında besiyerleri %2 FBS içeren kültür besiyeri ile değiştirildi ve gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi sabah yaklaşık 14-16 saat sonra hücreler FBS içermeyen besiyerinde iki saat süreyle inkübe edildi. Sonrasında hücreler kuyu bazında EGFR fosforilasyon array testi için 6 gruba ayrıldı.

Bu gruplar;

- i. Kontrol grubu (Uygulama yapılmayan hücreler)
- ii. 100 ng/ml EGF uygulanan hücreler
- iii. 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR antikoru uygulanan hücreler
- iv. 100 µg/ml Cetuximab anti-EGFR antikoru uygulanan hücreler
- v. 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR antikoru uygulaması sonrasında 100 ng/ml EGF uygulanan hücreler
- vi. 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 Cetuximab antikoru uygulaması sonrasında 100 ng/ml EGF uygulanan hücreler

FBS detoksunun ardından 3 ve 5. gruptaki hücelere 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR antikoru, 4 ve 6. gruptaki hücelere ise 100 µg/ml Cetuximab anti-EGFR antikoru bir saat süreyle uygulandı. Bir saat sonunda 2, 5 ve 6. gruptaki hücelere 100 ng/ml EGF 20 dakika süreyle uygulandı. 20 dakika sonunda besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücelere iki kez soğuk 1X PBS ile yıkandı. Sonrasında her bir kuyuya 500 µl 1X Lysis Buffer (Protease Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktail Set I ve Set II içeren) eklenerek hücelere pipetaj ile çözüldü ve 30 dk süreyle 4°C’de orbital çalkalayıcıda üzerinde yavaş devirde inkübe edildi. Ardından hücelere 1,5 ml ependorf tüpe toplandı ve 14000xg hızda 4°C’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar yeni ve temiz tüplere ayrıldı, alikotlandı ve daha sonra kullanılmak üzere -70 °C’ye kaldırıldı. İzole edilen proteinlerin miktarı BCA testi ile belirlendi.

Membranlar kit içerisinde çıkan 8 kuyulu plaka bölmelerine yerleştirildi ve üzerlerine 1’er ml Blocking Buffer eklenerek bir saat oda ısısında ve orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek bloklandı. Bir saat sonunda Blocking Buffer membranlar üzerinden uzaklaştırıldı ve hücre lizatları 200 µg/ml son hacimde olmak üzere 1’er ml membranlar üzerine eklendi. 8 kuyulu plaka ağzı dikkatlice kapatıldıktan sonra membranlar gece boyu 4°C’de orbital çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

Ertesi gün, hücre lizatlarının uygulamasından 16 saat sonra, lizatlar membranlar üzerinden uzaklaştırıldı. Membranlar 8 kuyulu plaka üzerinde 3’er kez 3’er dk süreyle 2 ml 1X Wash Buffer I ile yıkandı. Ardından her bir membran ayrı bir 60 mm petri kabına alındı. Petri kaplarındaki membranlar 6’şar kez 5’er dk süreyle 5 ml 1X Wash Buffer I ile yıkandı.

Ardından membranlar 3'er kez 5'er dk süreyle 5 ml 1X Wash Buffer II ile yıkandı. Bu sırada 8 kuyulu plaka otoklavlanmış ddH₂O ile yıkandı ve kurulandı. Yıkamalar sonrası membranlar tekrar 8 kuyulu plakaya alındı ve üzerlerine 1'er ml Biotin-Conjugated Anti-EGFR eklendi. Membranlar 2 saat oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde ve karanlıkta inkübe edildi. 2 saatlik inkübasyon sonrası Anti-EGFR antikoru membranlar üzerinden uzaklaştırıldı. Her bir membran ayrı bir 60 mm petri kabına alındı. Petri kaplarındaki membranlar 6'şar kez 5'er dk süreyle 5 ml 1X Wash Buffer I ile yıkandı. Ardından membranlar 3'er kez 5'er dk süreyle 5 ml 1X Wash Buffer II ile yıkandı. Bu sırada 8 kuyulu plaka otoklavlanmış ddH₂O ile yıkandı ve kurulandı. Yıkamalar sonrası membranlar tekrar 8 kuyulu plakaya alındı ve üzerlerine 1,5'ar ml 1X HRP-conjugated streptavidin sekonder antikoru eklendi. Membranlar 2 saat oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde ve karanlıkta inkübe edildi. 2 saatlik inkübasyon sonrası 1X HRP-conjugated streptavidin sekonder antikoru membranlar üzerinden uzaklaştırıldı. Her bir membran ayrı bir 60 mm petri kabına alındı. Petri kaplarındaki membranlar 6'şar kez 5'er dk süreyle 5 ml 1X Wash Buffer I ile yıkandı. Ardından membranlar 3'er kez 5'er dk süreyle 5 ml 1X Wash Buffer II ile yıkandı. Yıkamalar sonrası her bir membran görüntüleme için plastik föy üzerine alındı. 250 µl Detection Buffer C ve 250 µl Detection Buffer D karışımı membranı kaplayacak şekilde membran üzerine bırakıldı. Oda ısısında ve karanlıkta iki dk inkübe edildi. Sonrasında Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) sisteminde Chemi 200 kanalında kemiluminesans görüntüleme yapıldı.

Sinyal dansiteleri Image J (National Institutes of Health) yazılımı ile ölçüldü. Her membrandaki spesifik protein ışımlarının normalizasyonu aşağıdaki formüle göre yapıldı.

Pos(1) = Kontrol grubu membranındaki pozitif kontrollerin ortalama sinyal yoğunluğu

Pos(2) = Uygulama grubu membranındaki pozitif kontrollerin ortalama sinyal yoğunluğu

X (2) = Uygulama grubu membranındaki belirli bir nokta için sinyal yoğunluğu

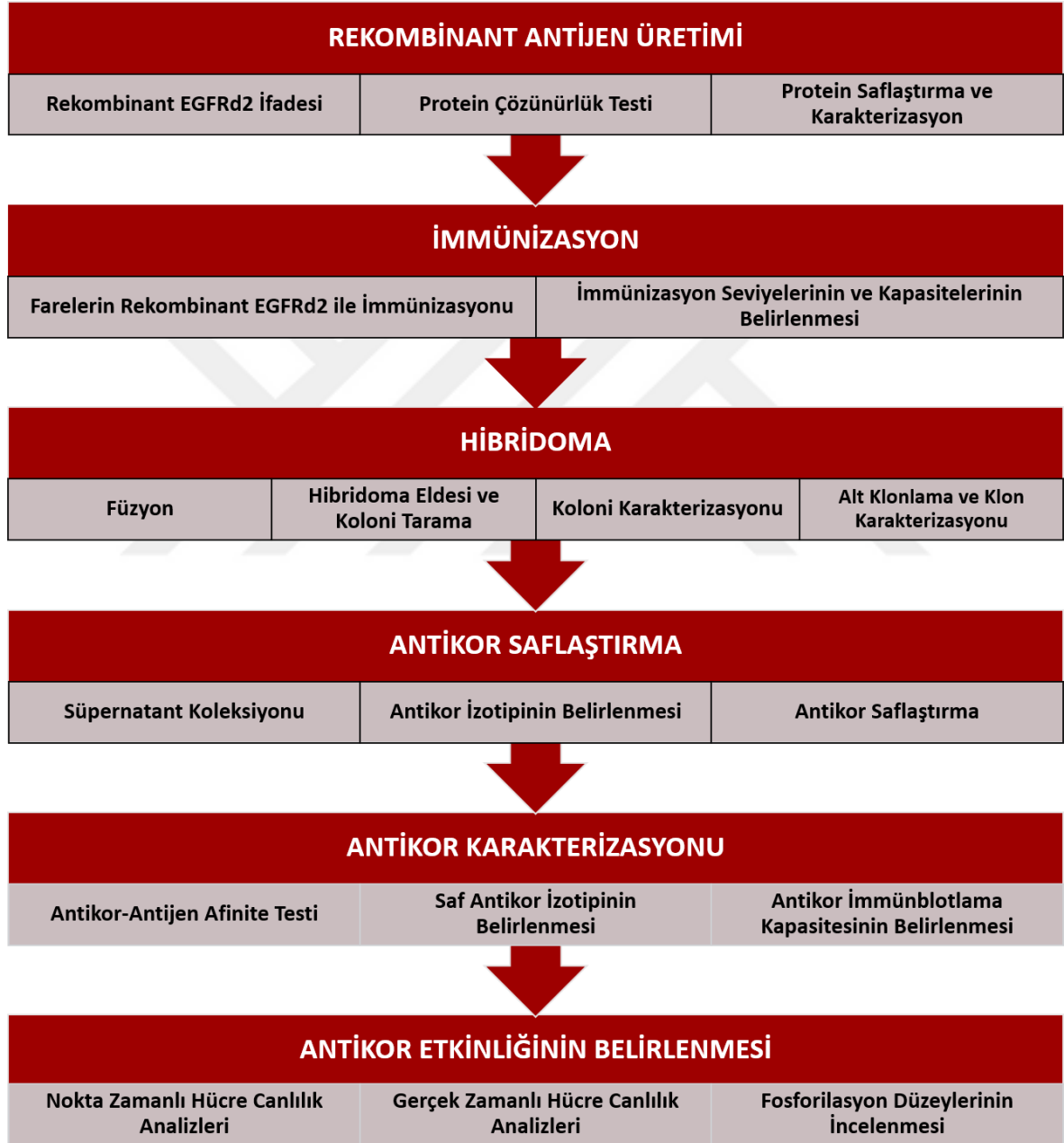
X (N2) = Uygulama grubu membranındaki belirli bir nokta için normalleştirilmiş değer

$$X(N2) = X(2) * Pos(1)/Pos(2)$$

Gruplar arası farkın istatistiksel analizi student t test ile yapıldı. P<0,05 anlamlı kabul edildi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü dimerizasyon (domain II) bölgesine spesifik hibridoma yöntemi ile anti-EGFR monoklonal antikorun geliştirilmesi, üretimi, karakterizasyonu ve etkinliğinin belirlenmesine yönelik araştırma bulguları yer almaktadır. Çalışmanın genel iş akış süreci Şekil 5.1.'de özetlenmiştir.

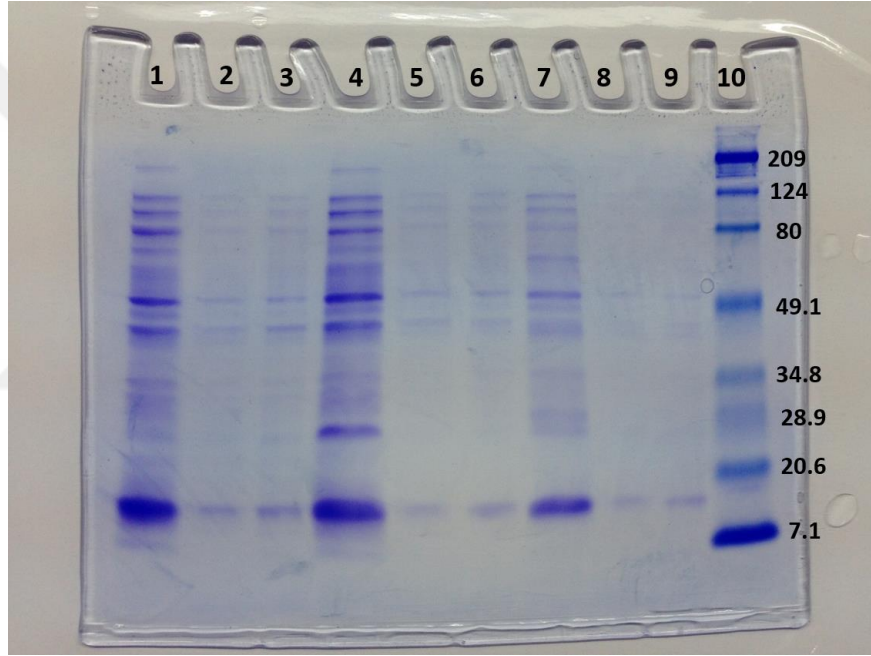


Şekil 5.1. Tez çalışmasına ait iş akış süreci

5.1. REKOMBİNANT ANTİJEN ÜRETİMİ

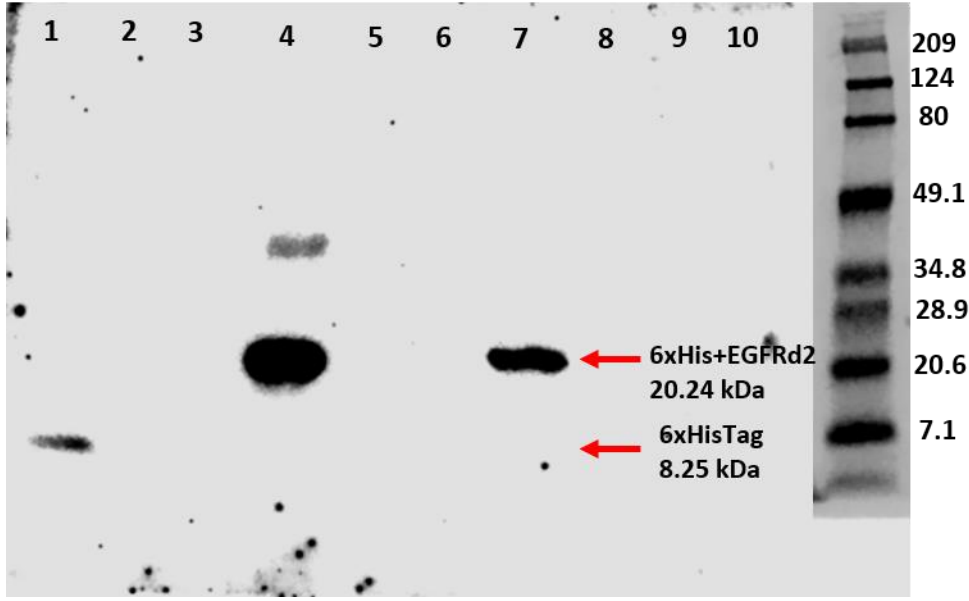
5.1.1. EGFRD2 PROTEİN ÇÖZÜNÜRLÜK PROFİLİ

pET-30a plazmidi içine klonlanıp N terminalinde 6xHis Tag ile ifade ettirilen EGFRd2 proteinin çözünürlüğü test edilmiştir. Hem pET-30a hem de pET-30a.EGFRd2 plazmidi BL21(DE3) ve RosettaTagami(DE3)pLysS suşlarında ifade ettirilmiştir. Ardından çözünür fraksiyon, 8M ürede çözünen fraksiyon ve çözünür olmayan fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri olarak örnekler SDS-PAGE ile jelde ayrıştırılmıştır. Örnekler hem Coomassie Blue ile boyanmış (Şekil 5.2.), hem de anti-6xHisTag spesifik antikor ile immünblotlama (Şekil 5.3.) yöntemiyle analiz edilmiştir.



Şekil 5.2. 6xHis.EGFRd2 füzyon proteininin protein çözünürlük testi (Coomassie blue boyaması)

- 1) BL21 pET-30a + IPTG (Çözünür fraksiyon)
- 2) BL21 pET-30a + IPTG (Üre çözünür fraksiyon)
- 3) BL21 pET-30a + IPTG (Çözünmeyen fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri)
- 4) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Çözünür fraksiyon)
- 5) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Üre çözünür fraksiyon)
- 6) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Çözünmeyen fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri)
- 7) RosettaTagami pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Çözünür fraksiyon)
- 8) RosettaTagami pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Üre çözünür fraksiyon)
- 9) RosettaTagami pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Çözünmeyen fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri)
- 10) Protein standardı, kDa (Bio-Rad, 1610318)



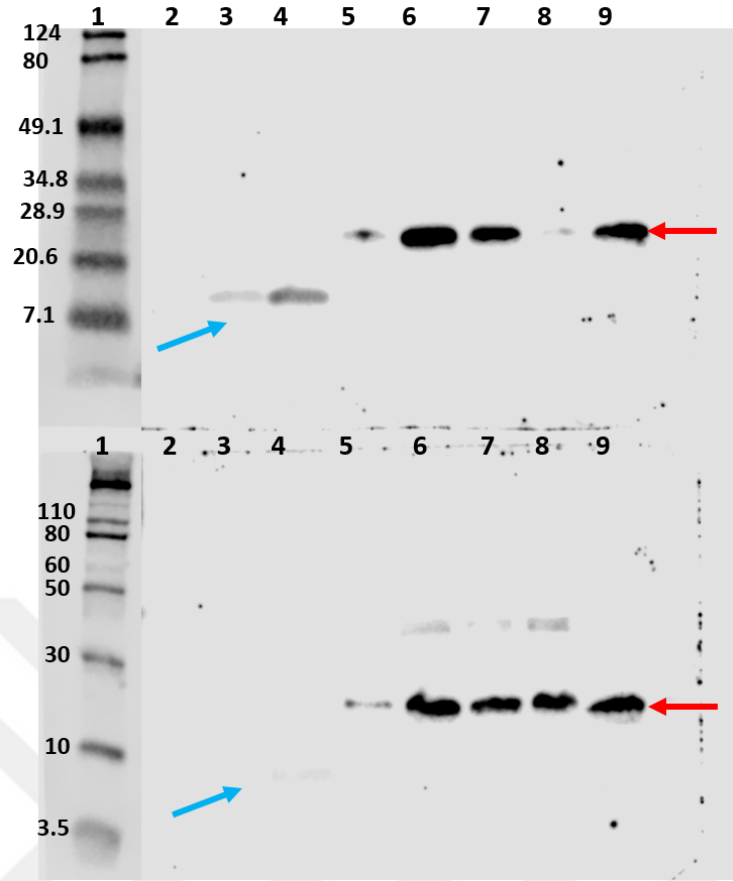
Şekil 5.3. 6xHis.EGFRd2 füzyon proteinin protein çözünürlük testi (Anti-Histag antikoru ile immün blotlama analizi)

- 1) BL21 pET-30a + IPTG (Çözünür fraksiyon)
- 2) BL21 pET-30a + IPTG (Üre çözünür fraksiyon)
- 3) BL21 pET-30a + IPTG (Çözünmeyen fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri)
- 4) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Çözünür fraksiyon)
- 5) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Üre çözünür fraksiyon)
- 6) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Çözünmeyen fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri)
- 7) RosettaTagami pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Çözünür fraksiyon)
- 8) RosettaTagami pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Üre çözünür fraksiyon)
- 9) RosettaTagami pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Çözünmeyen fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri)
- 10) Protein standardı, kDa (Bio-Rad, 1610318)

Bu analiz sonucunda, ifade ettirilen rekombinant proteinin her iki suşta da çözünür fraksiyonda yer aldığı gözlenmiştir. Coomassie blue boyaması yapılarak kuyuya girmeyen veya yukarıda kalabilecek agregatların olmadığı da gözlenmiştir (Şekil 5.2.). Coomassie blue boyamasının doğrulanması aynı örneklerin immün blotlama ile analiziyle sağlanmıştır. Hem Şekil 5.2. hem de Şekil 5.3.'de 1, 4 ve 7. kuyularda çözünür fraksiyonlarda bantlar gözlenmektedir. Membranlar Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) cihazında (sol panelde yer alan örnekler Chemi kanalında 2 dk, sağda yer alan protein standardı ise 700 kanalında 30 sn süreyle) görüntülenmiştir.

5.1.2. EGFRD2 PROTEİNİNİN BÜYÜK ÖLÇEKLİ ÜRETİMİ

pET-30a.EGFRd2 proteini, indüklemeye optimizasyonları için küçük ölçekte (50 ml kültür), protein saflaştırma işlemleri için ise büyük ölçekte (500 ml – 1 litre kültür) pek çok kez üretilmiştir. Her üretim sonrası bakteriyel pellet laemmlili tamponu ile denatüre edildikten sonra 20'şer µl olarak kuyulara yüklenmiştir. Örneklerin immün blotlama analizlerinde anti-6xHis tag antikoru primer, goat anti-rabbit HRP antikoru ise sekonder antikorlar olarak kullanılmıştır. Membranlar Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) cihazında görüntülenmiştir. Şekil 5.4.'te küçük ve büyük kültürlerde IPTG ile indüklenen ve indüklenmeyen örneklerin bant durumları görülmektedir. Şekil 5.4. üst ve alt panellerde mavi ok ile işaretlenen bant 8,25 kDa'luk His-tag'tır, öte yandan 20.24 kDa'luk 6xhis.EGFRd2 bandı kırmızı ok ile işaretlenmiştir. Şekil 5.5.'de ise tamamı büyük kültür olan bir seri indüklenen kültürlerin örnekleri yer almaktadır. Burada tüm bantlar 20.24 kDa'luk 6xhis.EGFRd2 ifadesini göstermektedir.



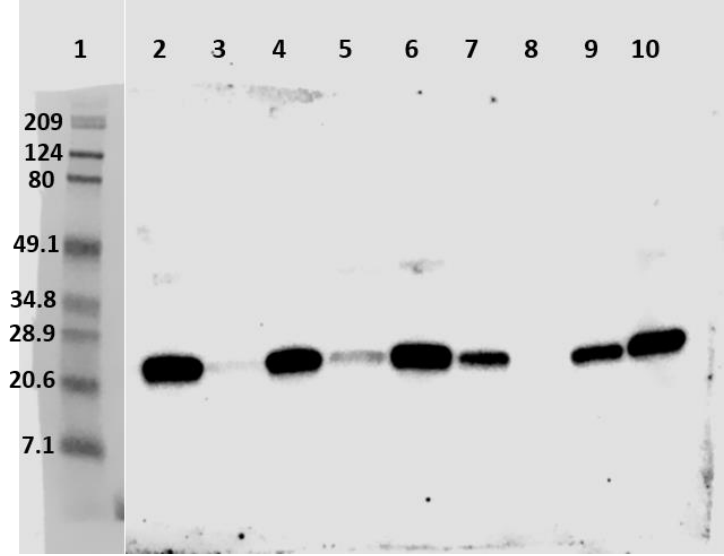
Şekil 5.4. 6xHis.EGFRd2 proteinin büyük ve küçük ölçekli üretimi sonrası protein analizi

Şekil 5.4. Üst panel örnekleri:

- 1) Protein standardı, kDa (Bio-Rad, 1610318)
- 2) BL21
- 3) BL21 pET-30a – IPTG
- 4) BL21 pET-30a + IPTG
- 5) BL21 pET-30a.EGFRd2 – IPTG
- 6) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG
- 7) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (büyük kültür 1)
- 8) BL21 pET-30a.EGFRd2 – IPTG (büyük kültür 2)
- 9) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (büyük kültür 2)

Şekil 5.4. Alt panel örnekleri

- 1) Protein standardı, kDa (Novex, LC5800)
- 2) BL21
- 3) BL21 pET-30a – IPTG
- 4) BL21 pET-30a + IPTG
- 5) BL21 pET-30a.EGFRd2 – IPTG
- 6) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG
- 7) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (büyük kültür 3)
- 8) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (büyük kültür 4)
- 9) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (büyük kültür 5)



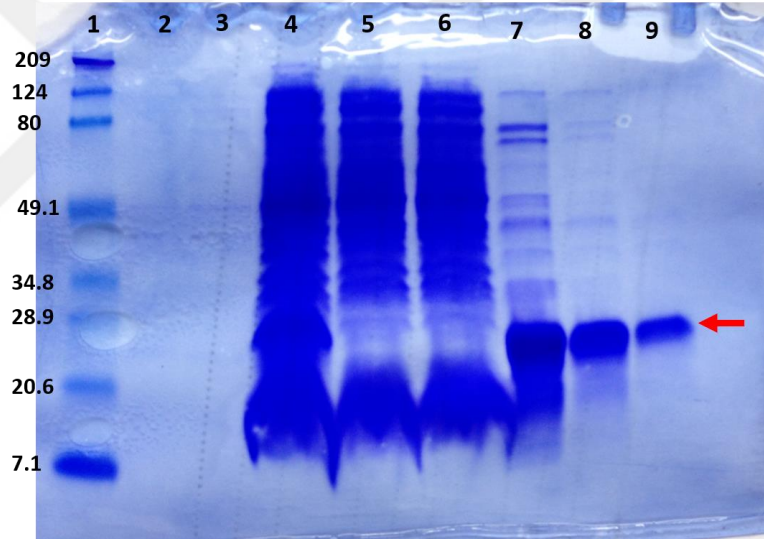
Şekil 5.5. 6xHis.EGFRd2 proteinin büyük ölçekli üretimi sonrası immün blotlama analizi

- 1) Protein standardı, kDa (Bio-Rad, 1610318)
- 2) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Büyük kültür 6)
- 3) BL21 pET-30a.EGFRd2 – IPTG (Büyük kültür 7)
- 4) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Büyük kültür 7)
- 5) BL21 pET-30a.EGFRd2 - IPTG (Büyük kültür 8)
- 6) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Büyük kültür 8)
- 7) RosettaGami pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Büyük kültür 1R)
- 8) RosettaGami pET-30a.EGFRd2 - IPTG (Büyük kültür 1R)
- 9) RosettaGami pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Büyük kültür 2R)
- 10) (Pozitif kontrol) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (büyük kültür 5)

5.1.3. EGFRD2 PROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILMASI

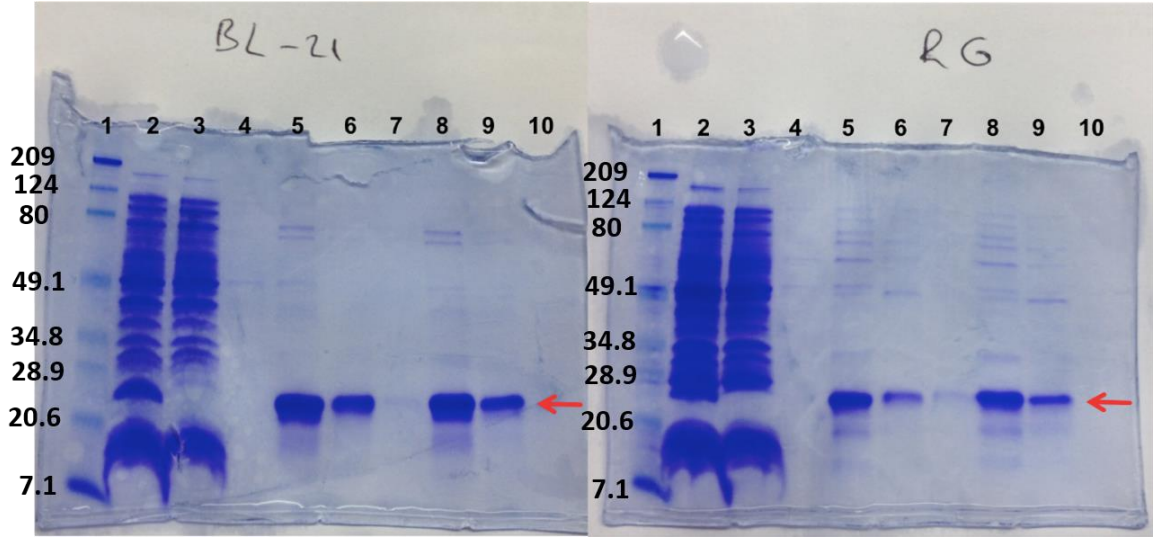
Büyük ölçekte üretilen bakteriyel kültürden protein saflaştırmak için HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Bakteriyel pelletin materyal ve yöntem bölümünde belirtildiği şekilde lizisini takiben kit yönergeleri takip edilerek protein saflaştırması yapılmıştır. Saflaştırma sırasında da kolon sonrası ve elüsyon aşamalarında SDS-PAGE için protein örneği ayrılmıştır. Elüsyonu takiben imidazol ve diğer küçük molekülleri uzaklaştırmak için diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Slide-A-Lyzer Dializ MWKO 7K (Thermo Scientific) kasetleri kullanılmıştır. Daha sonra bu örnekler denatüre edilip SDS-PAGE jelde ayrıştırılmış ve Coomassie blue ile boyanarak analiz edilmiştir. Örneklerin konsantrasyonları BCA testi ile belirlenmiştir. Şekil 5.6., 5.7. ve 5.8.'de her kuyuya 20 µl örnek üzerine 6X laemmli tamponu eklenerek yüklenmiştir. Her bir elüsyon 3 ml hacimde gerçekleştirilmiş, diyaliz işlemi de 3 ml kasetler içerisinde soğuk

fosfat tamponu ile gece boyu yapılmıştır. Diyaliz sonrası protein konsantrasyonu düşmemiştir, suşuna ve saflaştırma verimine bağlı olarak 0,3-1 mg/ml EGFRd2 proteini elde edilmiştir. Şekil 5.6.'da kolondan geçmeden önceki ve sonrasındaki protein örnekleri görülmektedir. 20.24 kDa'luk 6xHis.EGFRd2 proteini kırmızı ok ile işaretlenmiştir. 4 nolu kuyuda 20.24 kDa'luk 6xHis.EGFRd2 füzyon proteini görülürken, 5 ve 6 nolu kuyularda proteinin kolona bağlandığı gözlenmiştir. 7, 8 ve 9 nolu kuyularda ise proteinin başarıyla kolondan elüe edildiği görülmektedir. Şekil 5.7.'de aynı protokol hem BL21(DE3) hem de RosettaTagami(DE3)pLysS suşlarında ifade edilen rekombinant protein için uygulanmıştır ve 6xHis.EGFRd2 proteini her iki suşta başarıyla saflaştırılmıştır. Şekil 5.7.'de saflaştırma sürecine ait ürünlerin yanı sıra saflaştırılan proteinin diyaliz sonrası örnekleri de jelde gösterilmiştir. Şekil 5.7., 8 ve 9 numaralı kuyularda diyaliz edilen protein örnekleri görülmektedir. Diyaliz süresince herhangi bir agregat oluşumu, degradasyon veya verim kaybı gözlenmemiştir.



Şekil 5.6. 6xHis.EGFRd2 proteinin saflaştırılması

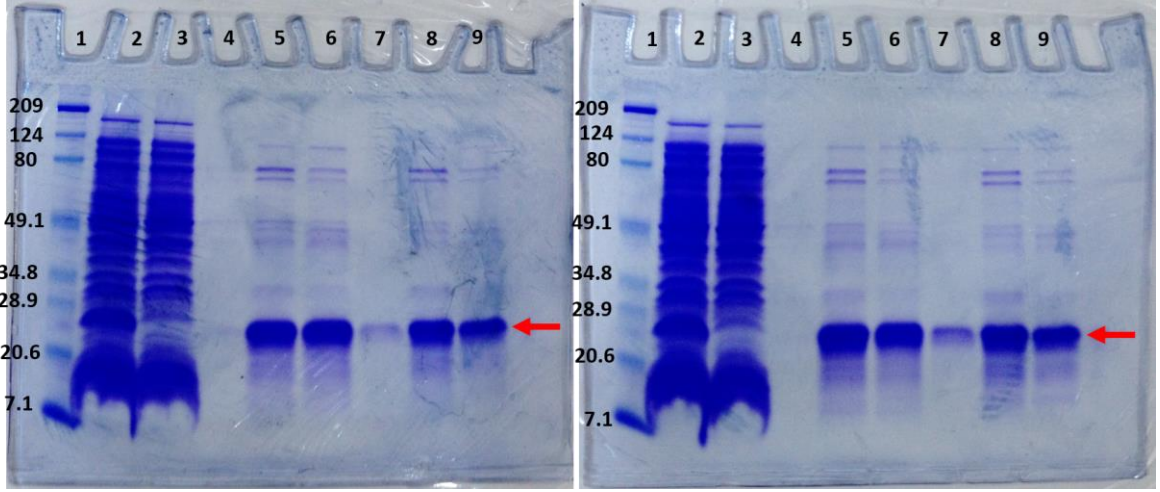
- 1) Protein standardı, kDa (Bio-Rad, 1610318)
- 2) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (10 µl bakteri kültürü)
- 3) Boş
- 4) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (hücre lizatı, kolon öncesi)
- 5) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (hücre lizatı, kolon sonrası)
- 6) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (1. yıkama sonrası, elüsyon öncesi)
- 7) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 1 0,91 mg/ml)
- 8) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 2 0,51 mg/ml)
- 9) BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 3 0,35 mg/ml)



Şekil 5.7. 6xHis.EGFRd2 proteinin BL21 (soldaki jel) ve RosettaGami (sağdaki jel) suşlarından saflaştırılması

- 1) Protein standardı (Bio-Rad, 1610318)
- 2) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Hücre lizati, kolon öncesi)
- 3) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Hücre lizati, kolon sonrası)
- 4) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon öncesi 3. yıkama)
- 5) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 1)
- 6) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 2)
- 7) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 3)
- 8) Diyaliz Sonrası Elüsyon 1 (BL-21 0,55 mg/ml; RosettaGami 0,42 mg/ml)
- 9) Diyaliz Sonrası Elüsyon 2 (BL-21 0,2 mg/ml; RosettaGami 0,15 mg/ml)

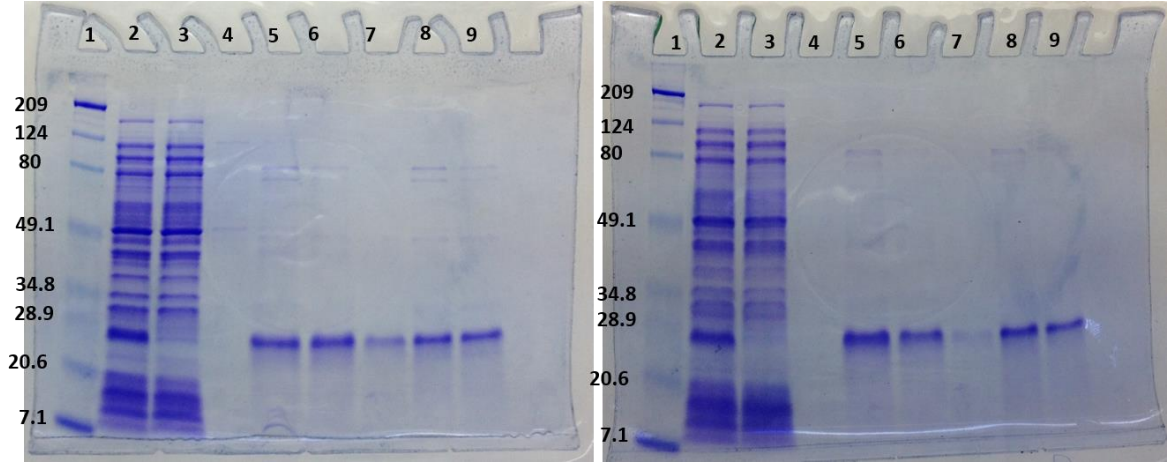
Rekombinant EGFRd2 saflaştırma sürecine ait optimizasyonlar tamamlandıktan sonra hacimsel verim analizi için başlangıç miktarı olarak mililitre-litre bazından pellet ağırlık noktasında da çalışma yapılmıştır. Bu amaçla 0,5 gr ve 0,75 gr BL21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG bakteriyel pellet örneği ile saflaştırma işlemine başlanmıştır. 500 ml sıvı kültürden yaklaşık 0,75 gr pellet elde edilmiştir. Şekil 5.8.'de iki farklı pellet miktarının saflaştırma süreç ürünlerinin SDS-PAGE analiz görüntüsünde; artan pellet miktarına bağlı olarak elde edilen protein miktarında da artma gözlenmiştir. Her iki miktar içinde saflaştırma başarılı gerçekleşmiştir.



Şekil 5.8. 6xHis.EGFRd2 proteinin 0,5 gr pelletten (sol panel) 0,75 gr pelletten (sağ panel) saflaştırılması

- 1) Protein standardı, kDa (Bio-Rad, 1610318)
- 2) BL-21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Hücre lizati, kolon öncesi)
- 3) BL-21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Hücre lizati, kolon sonrası)
- 4) BL-21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon öncesi 3. yıkama)
- 5) BL-21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 1)
- 6) BL-21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 2)
- 7) BL-21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 3)
- 8) Diyaliz sonrası elüsyon 1 (Sol panel: 0,34 mg/ml; sağ panel: 0,47 mg/ml)
- 9) Diyaliz sonrası elüsyon 2 (Sol panel: 0,19 mg/ml; sağ panel: 0,32 mg/ml)

Süreç-hacim analizlerinden sonra 6xHis.EGFRd2 proteini saflaştırma işlemi, kolon başına 250 ml BL-21 pET-30a.EGFRd2 + IPTG kültürü ile 2 ayrı kolonda gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE için ise önceki analizlerden farklı olarak 20 µl yerine 8 µl örnek 2X yükleme tamponu (Invitrogen) ile yüklenmiştir. Şekil 5.9.'da belirtilen şartlarda 6xHis.EGFRd2 protein saflaştırma sürecine ait örneklerin SDS-PAGE analizi görülmektedir. Miktarların azaltılması bant profillerinin daha net ayrışmasına neden olmuş ve netlik artmıştır.



Şekil 5.9. Kolon başına 250 ml BL-21 bakteri kültürü ile gerçekleştirilen saflaştırma

- 1) Protein standardı, kDa (Bio-Rad, 1610318)
- 2) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Hücre lizatı, kolon öncesi)
- 3) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Hücre lizatı, kolon sonrası)
- 4) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon öncesi 3. yıkama)
- 5) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 1) (Sol panel: 0,33 mg/ml; sağ panel: 0,28 mg/ml)
- 6) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 2) (Sol panel: 0,17 mg/ml; sağ panel: 0,24mg/ml)
- 7) pET-30a.EGFRd2 + IPTG (Elüsyon 3) (Sol panel: 0,01 mg/ml; sağ panel: 0,07 mg/ml)
- 8) Diyaliz sonrası elüsyon 1 (Sol panel: 0,3 mg/ml; sağ panel: 0,26 mg/ml)
- 9) Diyaliz sonrası elüsyon 2 (Sol panel: 0,2 mg/ml; sağ panel: 0,26 mg/ml)

Sonuç olarak; 6xHis.EGFRd2 antijeni iki farklı protein ekspresyon suşunda ifade ettirilerek pek çok kez saflaştırılmıştır. Saflaştırma optimizasyonları farklı açılardan test edilmiştir.

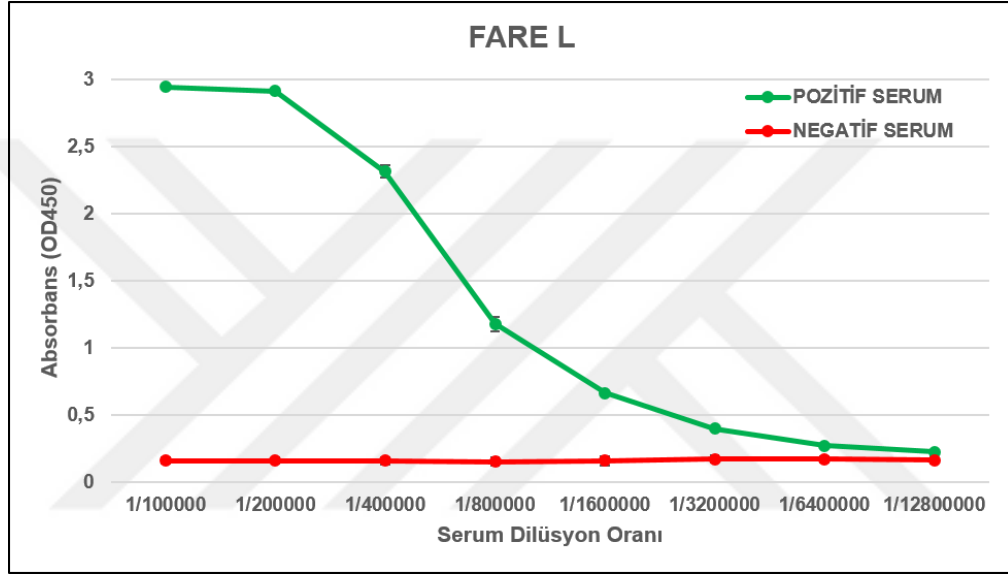
5.2. İMMÜNİZASYON, HİBRİDOMA GELİŞTİRME VE MONOKLONALLEŞTİRME SÜREÇLERİ

5.2.1. İMMÜNİZASYON SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

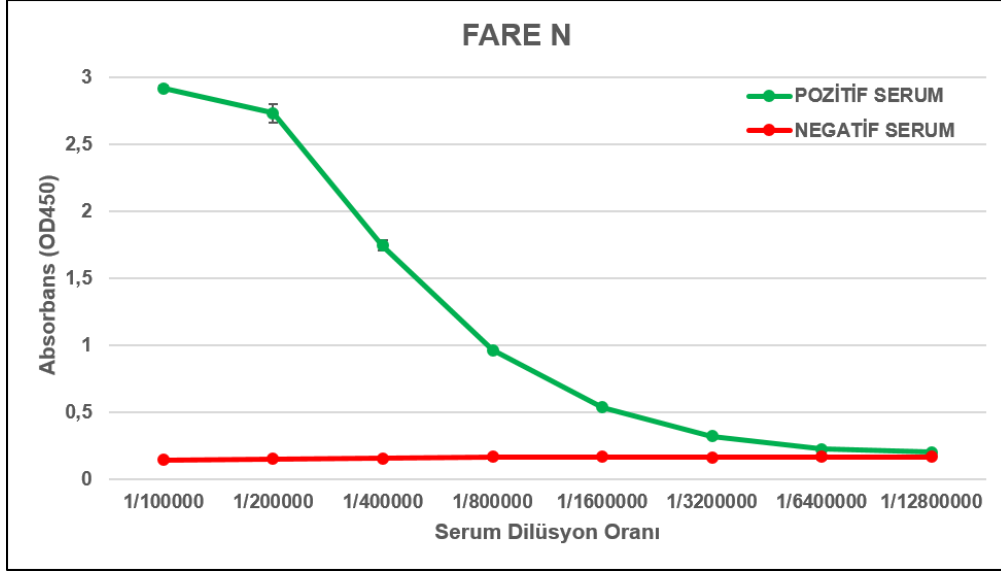
5.2.1.1. İndirek ELISA Yöntemi ile Fare Serum Titrasyon Analizleri

3 adet sağlıklı, dişi ve 6-8 haftalık BALB/c farenin kuyruk venlerinden 50'şer µl kan toplanmış ve serum ayrılmıştır. Ardından fare başına 50 µg/ml EGFRd2 antijeni 1:1 oranında Complete Freund's Adjuvan ile karıştırılarak farelere intraperitoneal yoldan inoküle edilmiştir. 15'er gün arayla fare başına 50 µg/ml EGFRd2 antijeni bu kez Incomplete Freund's Adjuvan ile karıştırılarak intraperitoneal yoldan inoküle edilmiştir. 3. aşılama sonrası farelerin kuyruk venlerinden 50'şer µl kan toplanarak serum ayrılmıştır.

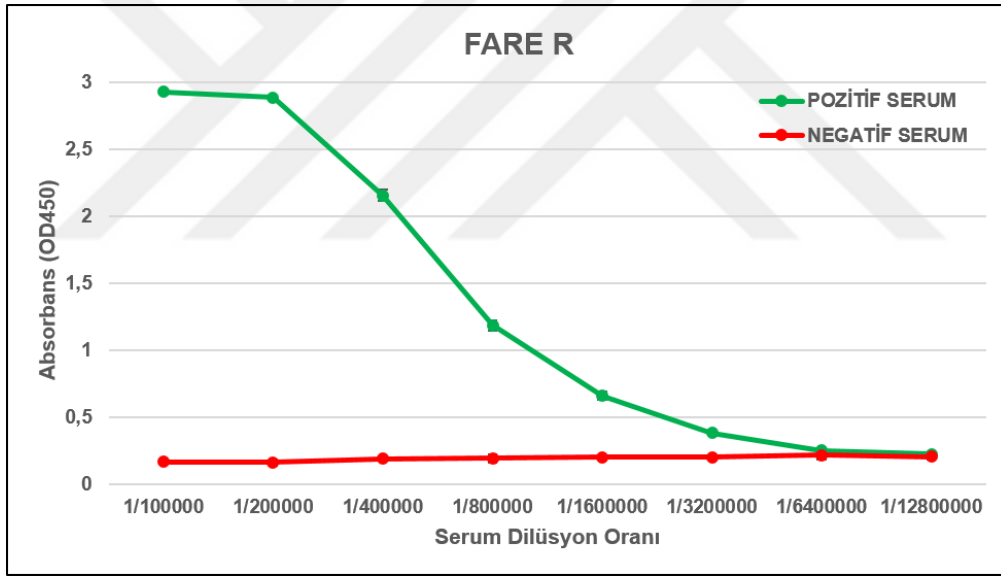
İmmünizasyonlara başlamadan önce ve 3. inokülasyonlardan sonra toplanan serumlar 1/100000 dilüsyondan başlanarak 1/12800000'e kadar düzenli olarak 2'şer kat aralıkta titre edilmiştir. Elde edilen serumlar ile her bir kuyucuğu 100 µl 2 µg/ml EGFRd2 antijeni ile kaplanmış plakalarda klasik indirek ELISA testi gerçekleştirilmiştir. Sekonder antikor olarak Goat Anti-Mouse HRP kullanılmıştır. Tüm örnekler 3 teknik tekrarlı tasarlanarak okumalar alınmış ve her bir farenin immünizasyon grafiği çıkartılmıştır. Eğriler birbirine çok yakın olduğu için titrasyonlar her bir fare için Şekil 5.10., Şekil 5.11., ve Şekil 5.12.'de ayrı grafiklerde verilmektedir.



Şekil 5.10. Fare L pozitif ve negatif serumlarından gerçekleştirilen titrasyon grafiği



Şekil 5.11. Fare N pozitif ve negatif serumlarından gerçekleştirilen titrasyon grafiği

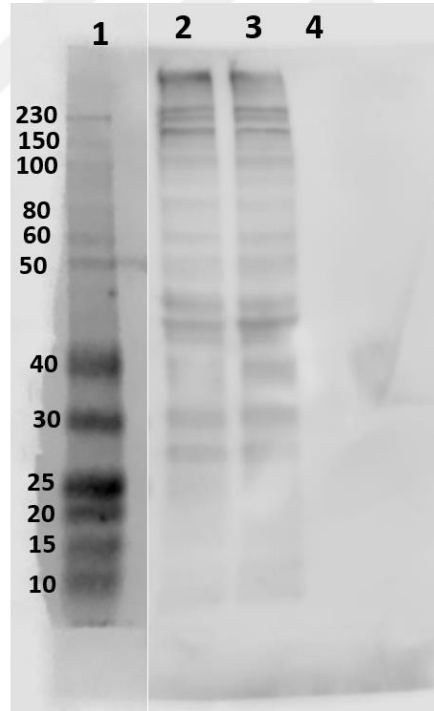


Şekil 5.12. Fare R pozitif ve negatif serumlarından gerçekleştirilen titrasyon grafiği

Alınan sonuçlara göre her üç farede de 1/100000 – 1/12800000 pozitif serum dilüsyonlarında plato fazı, end-point ve base-line değerleri elde edilmiştir. Fareler 1/1600000 – 1/3200000 dilüsyonlarına kadar EGFRd2 antikoru üretmişlerdir. 1/6400000 dilüsyonda end-point'e ulaşılmıştır. Elde edilen rakamsal veriler doğrultusunda Fare R füzyon adayı olarak belirlenmiştir.

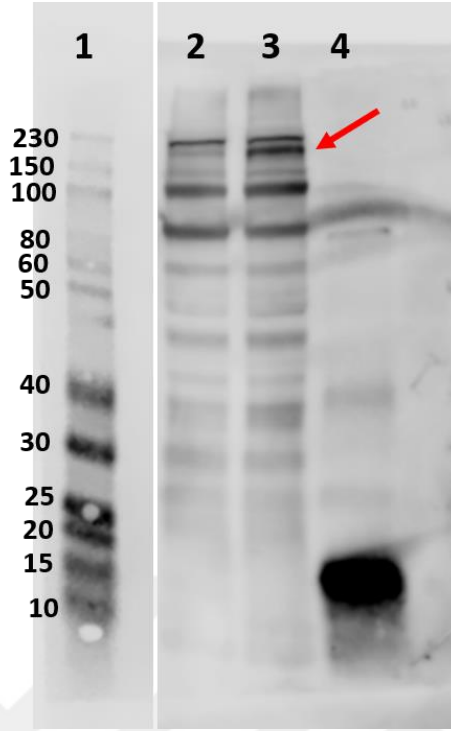
5.2.1.2. Fare Serumlarının Rekombinant ve Endojen EGFR Tanıma Kapasitelerinin İmmünblotlama ile Belirlenmesi

Fare R'nin immünizasyonlar öncesi ve 3. inokülasyon sonrası serumları kullanılarak, bu serumların hücre lizatlarındaki endojen EGFR'nü ve rekombinant EGFRd2 proteinini tanıyıp tanımayacağı immünblotlama ile incelenmiştir (Şekil 5.13., 5.14.). Aynı örnekler, EGFR proteinin migrasyon paternini kıyaslayabilmek için ticari olarak satın alınmış anti-EGFR monoklonal antikoru ile de analiz edilmiştir. Bu amaçla EGFR proteinini overeksprese ettiği bilinen MDA-MB-468 ve EGFR ekspresyonunun çok düşük olduğu bilinen MCF-7 hücre hatlarından elde edilen total proteinler kullanılmıştır. SDS-PAGE jelinde 20'şer µg MCF-7 (EGFR ifadesi düşük), MDA-MB-468 (EGFR ifadesi yüksek) hücre lizatları ve 10 ng 6xhis.EGFRd2 protein yürütülmüş, fare R'nin immünizasyon öncesi (Şekil 5.13.) ve 3. immünizasyon sonrası (Şekil 5.14.) alınan serumları ile analiz edilmiştir. Her iki çalışmada da serumlar 1/1000 dilüsyonda (%5 BSA ile dilüe edilerek) kullanılmıştır.



Şekil 5.13. Fare R immünizasyon öncesi serum ile immün blotlama

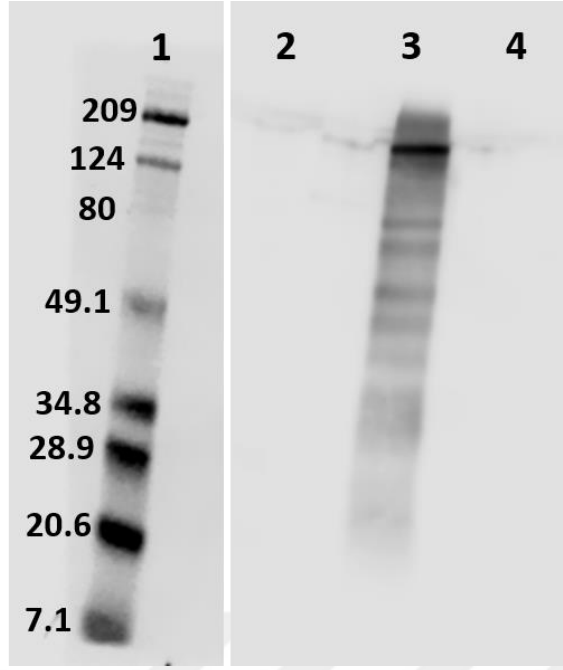
- 1) Protein standardı, kDa (NEB, 7711S)
- 2) MCF-7 hücre lizatı (20 µg)
- 3) MDA-MB-468 hücre lizatı (20 µg)
- 4) EGFRd2 saf rekombinant protein (10 ng)



Şekil 5.14. Fare R 3. immünizasyon sonrası serum ile immün blotlama

- 1) Protein standardı (NEB, 7711S)
- 2) MCF-7 hücre lizati (20 µg)
- 3) MDA-MB-468 hücre lizati (20 µg)
- 4) EGFRd2 saf rekombinant protein (10 ng)

Şekil 5.13. ve 5.14.'e göre, immünizasyon öncesi fareden alınarak hazırlanan serum örneği 170 kDa bölgesinde bantlarda farklılık göstermezken, immünizasyon sonrası EGFR ifade eden ve etmeyen hücre proteinlerini beklenen şekilde tanımıştır. Şekil 5.14.'de MDA-MB-468 hücre lizatının yer aldığı 3 numaralı kuyuda 170 kDa'da bant gözlenirken, MCF-7 hücre lizatının yer aldığı 2 numaralı kuyuda 170 kDa'da çok zayıf bant gözlenmiştir. Aradaki fark beklendiği gibi oldukça fazladır. Aynı serum EGFRd2 saf rekombinant proteini için de oldukça güçlü sinyal vermiştir. Aynı örnekler endojen EGFR protein migrasyon paternini kıyasayabilmek amacı ile satın alınan ticari anti-EGFR antikoru ile immün blotlama için kullanılmıştır. Ticari anti-EGFR antikoru (Abcam, ab52894) 1/2500 dilüsyonda kullanılmıştır. 170 kDa endojen EGFR bandı MDA-MB-468 hücre lizatında gözlenmiştir. Bu epitop EGFR'nin karboksi terminaline spesifik olduğu için rekombinant EGFR'ı beklediğimiz üzere tanımamıştır (Şekil 5.15.). Şekil 5.14. ve 5.15.'in 3er numaralı kuyuları kıyaslandığında Fare R serumunun endojen EGFR'ı en az ticari anti-EGFR antikoru kadar başarılı tanıdığı görülmektedir.



Şekil 5.15. Ticari EGFR antikoru ile immün blotlama

- 1) Protein standardı (Bio-Rad, 1610318)
- 2) MCF-7 hücre lizatı (20 µg)
- 3) MDA-MB-468 hücre lizatı (20 µg)
- 4) EGFRd2 saf rekombinant protein (10 ng)

5.2.2. HİBRİDOMA VERİLERİ

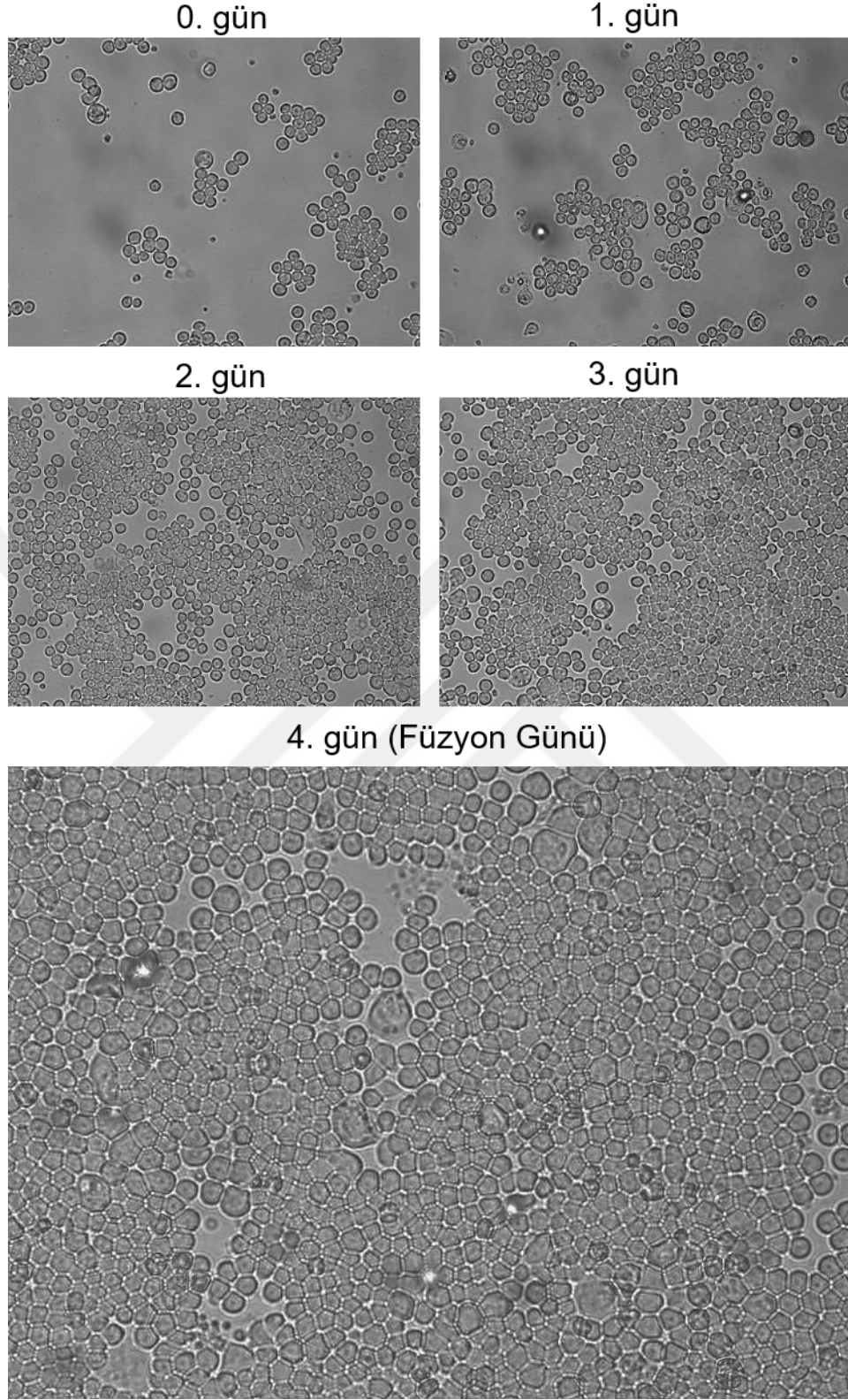
Füzyon sonrası elde edilen koloni sayıları ve bu alt başlık altında sunulan veriler için süreç, Şekil 5.16.'da özetlenmektedir.



Şekil 5.16. Hibridoma süreç özeti

5.2.2.1. Miyelom Kültürü ve Füzyon

Füzyon için seçilen fare R'ye füzyondan 5 gün önce 50 µg EGFRd2 antijeni saf olarak intraperitoneal yoldan enjekte edilerek boost immünizasyon yapılmıştır. Aynı gün F0 miyelom hücreleri (ATCC, CRL1646) füzyon için T-75 flasklarda kültüre alınmıştır. Ertesi günden başlamak üzere hücrelere füzyon gününe kadar her gün 1X HT (Sigma) reaktifi uygulanmıştır. Hücreler günlük olarak kontrol edilmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 5.17.). Şekil 5.17.'da görüleceği üzere F0 hücreleri kültüre alındıkları günden itibaren sağlıklı şekilde çoğalmıştır. Şekil 5.17. alt panelde görüldüğü üzere füzyon günü hücrelerin yüksek yoğunluğa ulaşmamasına özen gösterilmiştir.



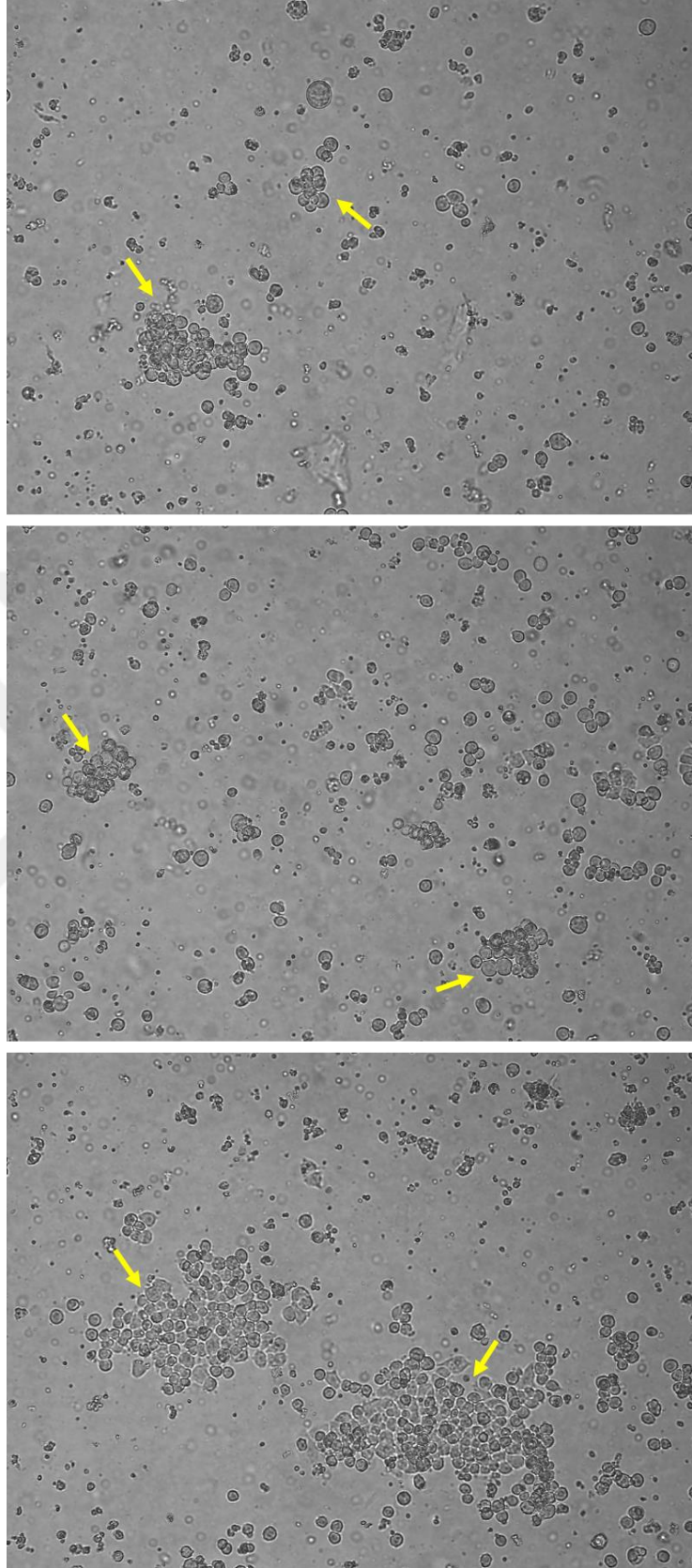
Şekil 5.17. Füzyon öncesi kültüre alınan F0 hücrelerinin günlük fotoğrafları (20X objektif)

Füzyon işlemi ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (Stem Cell) kullanılarak üreticinin protokollerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Toplam beş komponentten oluşan kit monoklonal antikor geliştirilmesinde füzyondan klon eldesine kadar olan süreçteki tüm ihtiyaçları karşılamaktadır, detaylar Yöntem bölümü 4.2.7. Hibridoma kısmında yer almaktadır.

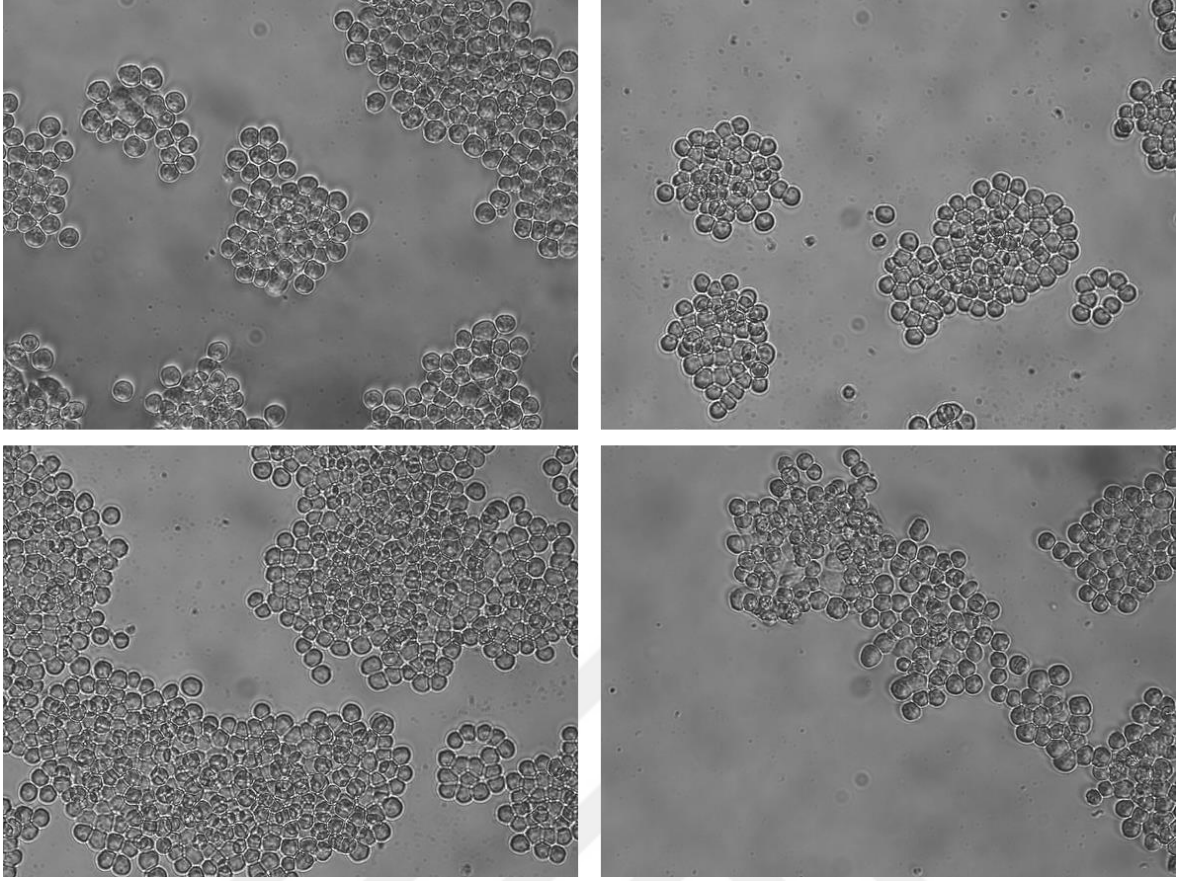
Füzyon günü fare R'ye anestetik uygulandıktan sonra kan, ascite sıvısı ve dalak alınmıştır. Dalak naylon filtre üzerinde medium B ile ezilerek süspanse edilmiştir. Öte yandan medium A'da kültür edilen F0 miyelom hücreleri de toplanmıştır. Miyelom ve dalak hücreleri füzyona hazırlık için üçer kez medium B ile yıkanmış, üçüncü yıkama sonrası hücreler sayılmıştır. 2×10^7 miyelom hücresi ile 1×10^8 dalak hücresi 50 ml falkonda karıştırılmış ardından PEG aracılı füzyon gerçekleştirilmiştir. Füzyon hücreleri medium C içerisinde çözülüp bir adet T-75 flaska medium C içerisinde ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrası hücreler toplanmış ve santrifüj sonrası 10 ml medium C'de çözülmüştür. Hücre süspansiyonu 90 ml medium D ile karıştırılmış ve 12 ml'lik 16 gauge-blunt-end needle şırınga ile 100 mm petri kaplarına 9,5'ar ml dağıtılarak seleksiyon işlemi başlatılmıştır.

5.2.2.2. Hibridoma Eldesi ve Koloni Tarama

Füzyondan 5 gün sonra koloniler oluşmaya başlamış (Şekil 5.18.) 10 gün sonra koloniler petri kaplarında gözle görülecek büyüklüğe gelmiştir. Koloniler mikroskop altında kontrol edilerek pipet ucu ile 48 kuyulu plakalarda medium E içerisine toplanmıştır. Füzyon sonrası toplam 240 ayrı koloni elde edilmiştir. Toplanan koloniler günlük kontrol edilerek derecelendirilmiş ve idamesi sağlanmıştır. Bu süreçte 31 koloni ölmüş ve 209 sağlıklı koloni kalmıştır. Hücreler sağlıklı bir şekilde çoğalmış, aralarından rastgele seçilerek fotoğraflanmıştır (Şekil 5.19.).



Şekil 5.18. Füzyondan 5 gün sonra oluşmaya başlayan koloniler (20X objektif)

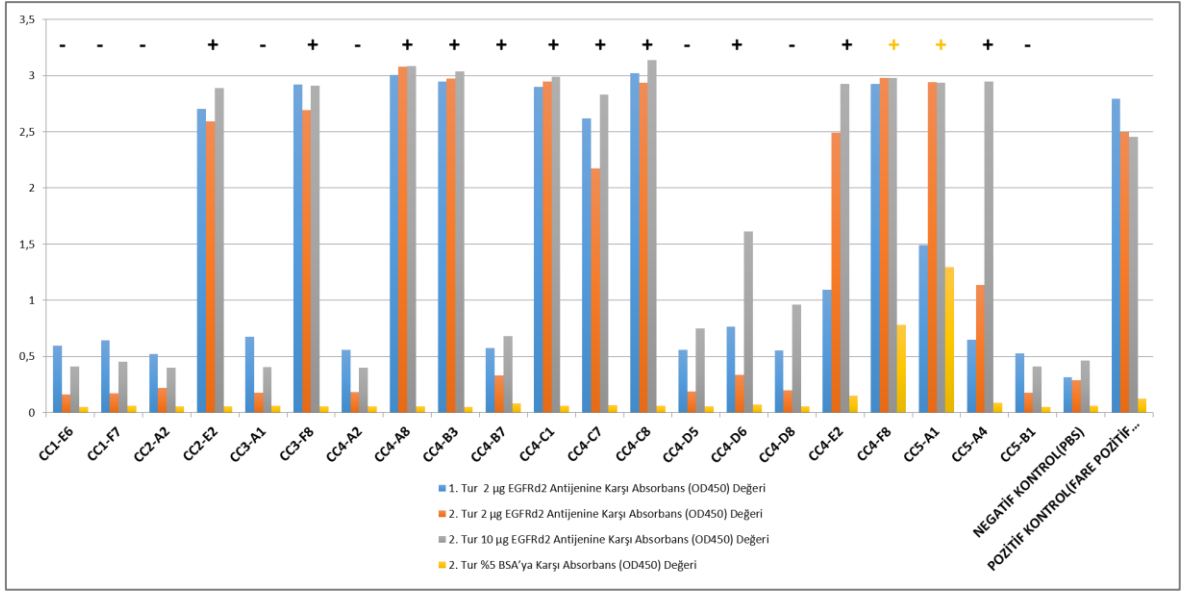


Şekil 5.19. Toplanan kolonilerin fotoğrafları (20X objektif)

Koloniler toplandıktan 4 gün sonra besiyeri rengini değiştirmeye (pembeden sarıya) başlamış ve bu noktada süpernatantlar ayrılarak hücrelerin antikor salgılama durumları klasik indirek ELISA testi ile kontrol edilmiştir. 209 koloniden 2 µg EGFRd2 antijenine karşı OD450 değeri 0,5 üzeri absorbands değeri veren 21 koloni 6 kuyulu plakalara transfer edilmiştir. Sonrasında 21 koloninin 2. tur indirek ELISA testi 2 µg EGFRd2, 10 µg EGFRd2 ve antijensiz %5 BSA kaplı kuyular ile yapılmıştır. 2. tur ELISA testi sonucunda 13 koloni pozitif, 8 koloni ise negatif salgılayıcı olarak kabul edilmiştir. Kantitatif değerler Çizelge 5.1.'de, değerlerin sütun grafiğe dökülmüş hali ise Şekil 5.20.'de verilmiştir. 2. tur ELISA sonuçlarını aldıktan sonra 6 kuyulu plakalarda idame edilen 13 koloniden stok alınarak ilk tur dondurulmuştur. %5 BSA'ya karşı sinyal veren CC4-F8 ve CC5-A1 kolonilerinin PVC'ye karşı ELISA testi de gerçekleştirilmiş ve bu kolonilerin PVC'ye karşı da reaksiyon verdiği tespit edilmiştir. Bu koloniler Çizelge 5.1.'de yeşil renk ile boyanmıştır. 13 koloniden ELISA değerleri tatmin edici olmayan CC4-B7 ve CC4-D6 dışındaki 11 koloninin idamesine devam edilmiştir.

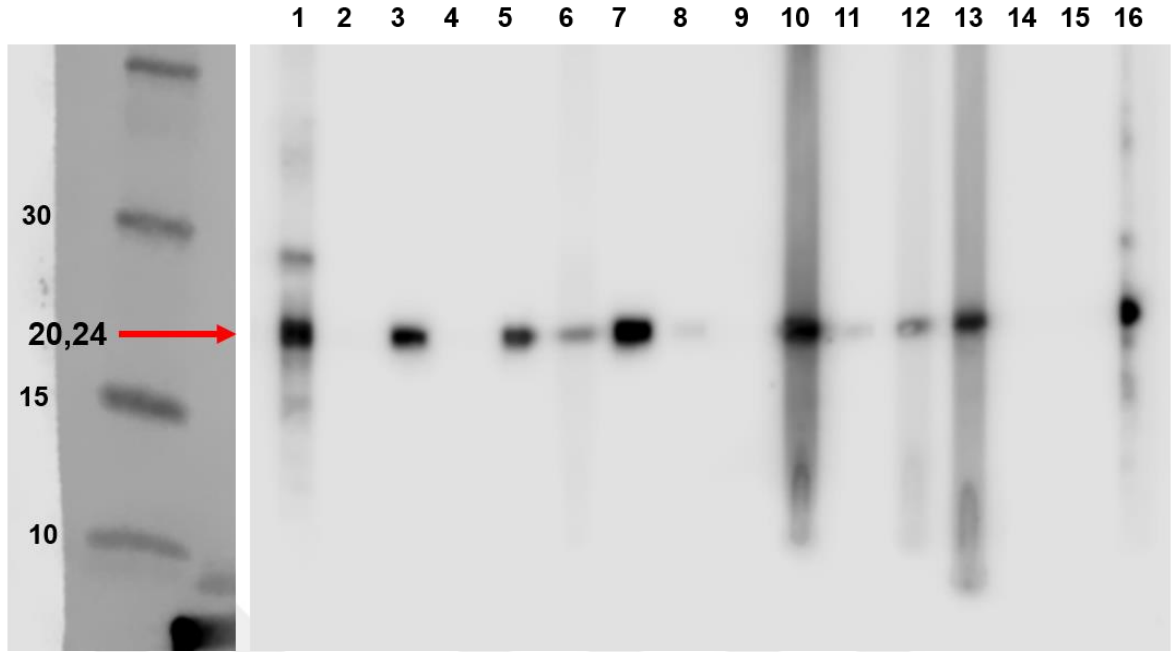
Çizelge 5.1. Hibridoma kolonilerinin indirek ELISA testi absorbands değerleri

Koloni adı	1. tur 2 µg EGFRd2 antijenine karşı absorbands (OD450) değeri	2. tur 2 µg EGFRd2 antijenine karşı absorbands (OD450) değeri	2. tur 10 µg EGFRd2 antijenine karşı absorbands (OD450) değeri	2. Tur %5 BSA'ya karşı absorbands (OD450) değeri
CC1-E6	0,598	0,164	0,414	0,054
CC1-F7	0,647	0,175	0,454	0,060
CC2-A2	0,523	0,222	0,403	0,059
CC2-E2	2,706	2,593	2,891	0,056
CC3-A1	0,678	0,178	0,408	0,061
CC3-F8	2,920	2,695	2,909	0,055
CC4-A2	0,558	0,183	0,403	0,059
CC4-A8	3,007	3,082	3,084	0,055
CC4-B3	2,947	2,973	3,037	0,051
CC4-B7	0,576	0,333	0,682	0,081
CC4-C1	2,900	2,945	2,990	0,060
CC4-C7	2,619	2,174	2,830	0,066
CC4-C8	3,021	2,935	3,138	0,064
CC4-D5	0,561	0,187	0,752	0,059
CC4-D6	0,768	0,338	1,614	0,074
CC4-D8	0,553	0,199	0,963	0,059
CC4-E2	1,097	2,490	2,926	0,151
CC4-F8	2,924	2,980	2,977	0,781
CC5-A1	1,489	2,944	2,936	1,296
CC5-A4	0,649	1,137	2,950	0,091
CC5-B1	0,528	0,181	0,411	0,053
Negatif kontrol (PBS)	0,316	0,289	0,467	0,060
Pozitif kontrol (Fare pozitif serum)	2,795	2,500	2,453	0,124



Şekil 5.20. Hibridoma kolonilerinin indirek ELISA testi aborbans değerleri grafiği

Elde edilen pozitif 11 koloninin süpernatantları aynı zamanda spesifik bir immünblotlama türü olan “surf blot” sistemi ile de saf EGFRd2 rekombinant proteinine karşı test edilmiştir.



Şekil 5.21. Surf-Blot ile taranan hibridoma supernatanları

Protein standart kuyusundan sonra diğer kuyular birleştirilerek tek büyük bir kuyuya saf EGFRd2 proteini yüklenmiştir. Surf blot cihazı ile de aşağıdaki serum/supernatanlar 150 µl olarak gece boyu primer antikör olarak uygulanmıştır. Sol panel: Protein standardı, kDa (NEB, 7711S)

- 1) Fare R pozitif serum (1/20000 dilüsyon)
- 2) Fare R negatif serum (1/20000 dilüsyon)
- 3) CC4-B3
- 4) CC2-E2
- 5) CC4-C8
- 6) CC5-A4
- 7) CC4-A8
- 8) CC4-C7
- 9) CC4-C1
- 10) CC5-A1
- 11) CC3-F8
- 12) CC4-E2
- 13) CC4-F8
- 14) Negatif koloni CC1-E6
- 15) Fare R negatif serum (1/20000 dilüsyon)
- 16) Fare R pozitif serum (1/20000 dilüsyon)

Surf blot sisteminden alınan sonuca göre CC2-E2 ve CC4-C1 dışındaki 9 koloni süpernatantı saf EGFRd2 rekombinant proteinini tanımıştır. Bu 9 koloniden 2'si indirek ELISA sonucu ile tutarlı olarak BSA'ya karşı reaksiyon vermiştir (Şekil 5.21., 10 numaralı kuyucuktaki CC5-A1 kolonisi ve 13 numaralı kuyucuktaki CC4-F8 kolonisi).

İndirek ELISA ve immünblotlama sonuçları birleştirildiğinde toplam 7 koloni ön testleri geçmiş ve EGFRd2 alt klonlama adayı olarak belirlenmiştir. Devamında koloniler birkaç tur daha idame edilerek stabil kolonileri belirleme çalışmaları yapılmıştır.

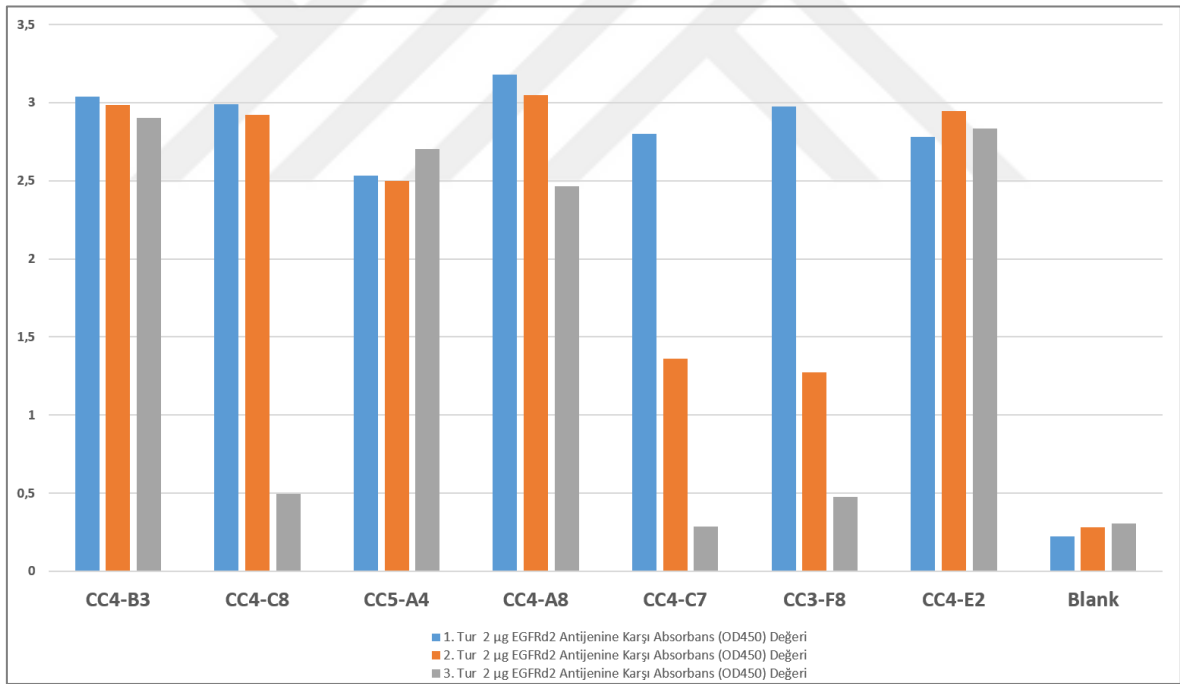
5.2.2.3. Hibridoma Kolonilerinin İdamesi ve Stabil Kolonilerin Belirlenmesi

Füzyon sonrası, indirek ELISA ve immünblotlama testleriyle EGFRd2 monoklonal adayı olarak belirlenen 7 koloni birkaç tur daha idame edilmiş, bu süreçte de hücre üzeri süpernatantlar toplanmıştır. İleri analizlere geçmeden önce stabil olmayan veya düşük salgılayıcı kolonileri elemek amacıyla koloniler 3 tur daha kültür edilmiş, her turun sonunda elde edilen süpernatantlar indirek ELISA analizi ile EGFRd2 antijenine karşı test edilmiştir.

Çizelge 5.2.'de 3 tur daha idame edilen kolonilerin 2 µg EGFRd2 antijenine karşı absorptans (OD450) değerleri verilmiştir. Çizelge üzerinde kırmızı renkle boyanan CC4-C8, CC4-C7 ve CC3-F8 kolonilerinin ilerleyen turlarda antikor salgılamayı durdurdukları gözlenmiştir. Bunlar stabil olmayan koloniler olarak belirlenmiş ve bundan sonraki aşamalar için çalışma setinden çıkarılmıştır. Kalan 4 koloni ise hem immün blotlama hem de indirek ELISA testlerinde stabil üretici koloniler olarak belirlenmiştir. Bunlar da Çizelge 5.2. üzerinde yeşil renkle boyanmıştır. Değerlerin sütun grafiğe dökülmüş hali de Şekil 5.22.'de verilmiştir. **Nihai olarak CC4-B3, CC5-A4, CC4-A8 ve CC4-E2 kolonileri ileri aşamalar için ideal hibridomalar olarak seçilmiştir.**

Çizelge 5.2. Aday hibridoma kolonilerinin stabilizasyon testleri indirek ELISA sonuçları

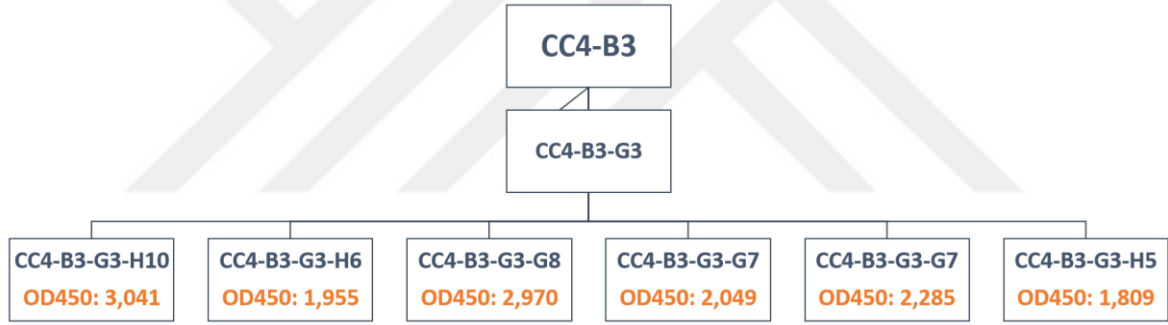
Koloni adı	1. tur 2 µg EGFRd2 antijenine karşı absorbens (OD450) değeri	2. tur 2 µg EGFRd2 antijenine karşı absorbens (OD450) değeri	3. tur 2 µg EGFRd2 antijenine karşı absorbens (OD450) değeri
CC4-B3	3,041	2,984	2,902
CC4-C8	2,992	2,923	0,497
CC5-A4	2,532	2,497	2,703
CC4-A8	3,181	3,046	2,464
CC4-C7	2,801	1,360	0,286
CC3-F8	2,973	1,271	0,475
CC4-E2	2,781	2,948	2,834
Blank	0,223	0,280	0,304



Şekil 5.22. Aday hibridoma kolonilerinin stabilizasyon testleri indirek ELISA sonuçları grafiği

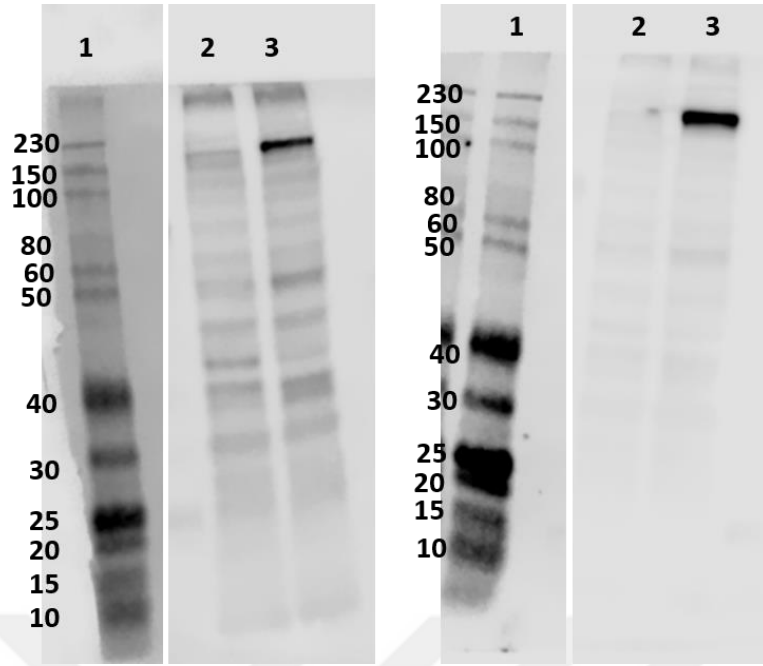
5.2.2.4. Alt Klonlama ile Anti-EGFR Monoklonal Antikor Üreten Klon Eldesi

Stabilizasyon testleri sonrası aday hibridoma kolonileri olarak belirlenen CC4-B3, CC5-A4, CC4-A8 ve CC4-E2 kolonileri 2 tur alt klonlanarak monoklonalleştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu süreçte CC4-A8 kolonisi çok kez denenen alt klonlama çalışmaları sonrasında ya çok düşük sinyal vermiştir ya da hiç sinyal vermemiştir. Bu koloninin devamlı kültüründe ise salgı kapasitesinin giderek düştüğü gözlenmiştir. CC5-A4 ve CC4-E2 kolonileri ise alt klonlamalar sonrası tatmin edici sinyal vermemekle birlikte, %5 BSA'ya olan afinitelerinde artış gözlenmiştir. CC4-B3 kolonisi ise iki alt klonlamada da alt klonlama kriterlerini karşılamıştır. CC4-B3 kolonisinin ikinci alt klonlaması sonrası altı farklı kuyudan klon toplanarak idame edilmiş ve ardından EGFRd2 antijenine karşı tekrar test edilmiştir. İdame sonrası en güçlü sinyali veren CC4-B3-G3-H10 klonu ileri çalışmalar için seçilmiştir. Geri kalan klonlar dondurularak saklanmıştır. Şekil 5.23.'de CC4-B3 kolonisinin iki tur alt klonlama çalışmasındaki süreçte ait diyagram verilmiştir.



Şekil 5.23. CC4-B3 kolonisinin alt klonlama çalışmaları diyagramı

Seçilen CC4-B3 kolonisi ve CC4-B3-G3-H10 klonunun endojenik EGFR tanıma kapasitesi immünblotlama ile test edilmiştir. Bu amaçla yine EGFR proteinini overeksprese ettiği bilinen MDA-MB-468 ve EGFR ekspresyonunun çok düşük olduğu bilinen MCF-7 hücre hatlarından elde edilen total proteinler kullanılmıştır. Şekil 5.24.'te CC4-B3 kolonisi ve bu koloniden klonlanan CC4-B3-G3-H10 klon supernatanları MDA-MB-468 hücre lizatının yer aldığı 3 numaralı kuyularda 170 kDa'da bant gözlenirken, MCF-7 hücre lizatının yer aldığı 2 numaralı kuyularda 170 kDa'da bant gözlenmemiştir.



Şekil 5.24. CC4-B3 kolonisi ve CC4-B3-G3-H10 klon süpernatantları ile immunblotlama

Sol Panel: CC4-B3 koloni süpernatant Sağ Panel: CC4-B3-G3-H10 klon süpernatant

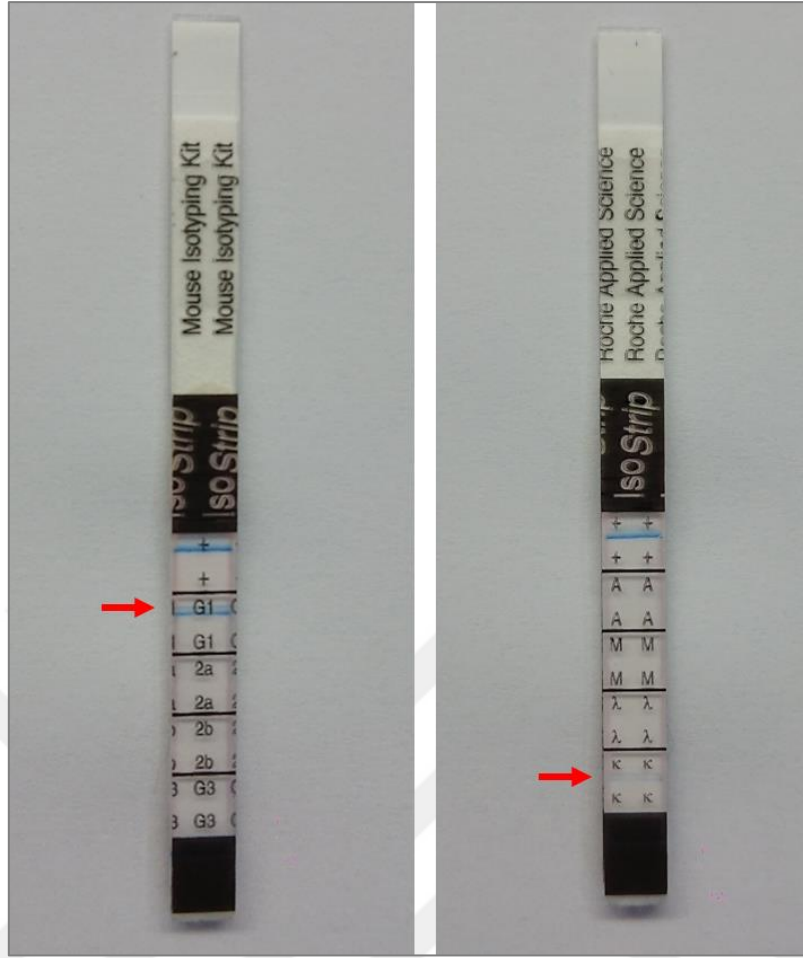
1) Protein standardı, kDa (NEB, 7711S)

2) MCF-7 hücre lizatı (20 µg)

3) MDA-MB-468 hücre lizatı (20 µg)

5.2.3. ANTİKOR İZOTİPİNİN BELİRLENMESİ

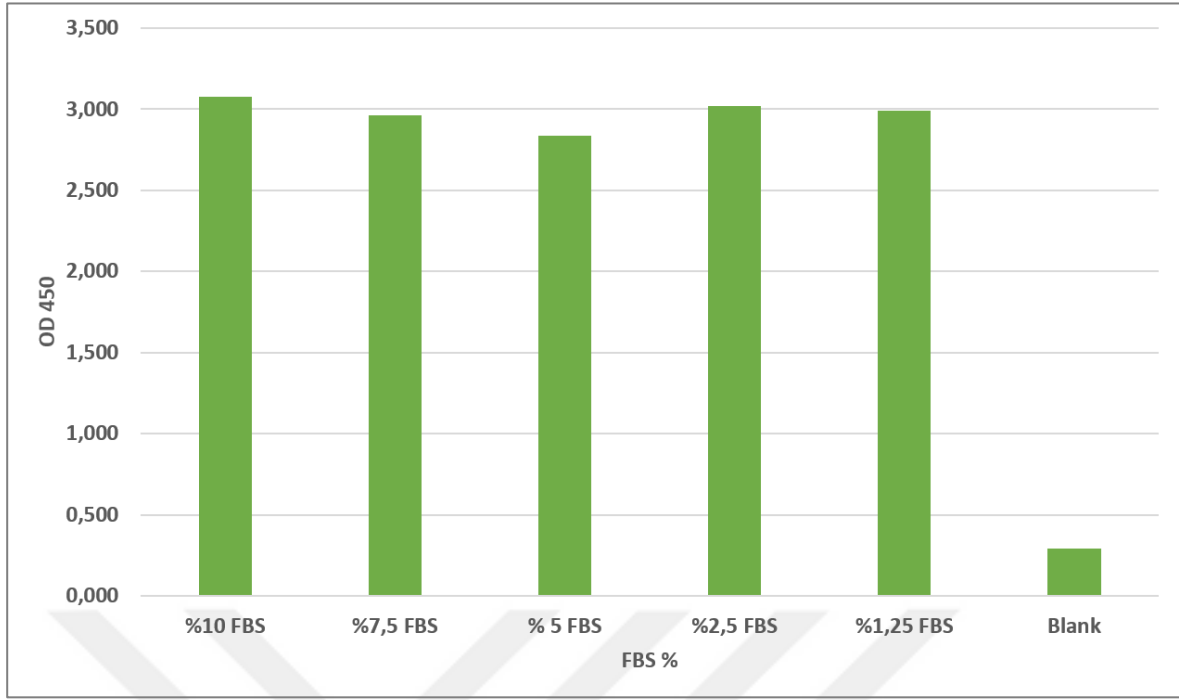
Saflaştırma aşamasına geçmeden önce antikor tipini belirlemek ve uygun kolon materyalini seçmek için antikor izotiplendirmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için Roche Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche) kullanıldı. %1 BSA ile 1:10 dilüe edilmiş 150 µl CC4-B3-G3-H10 supernatani ile yapılan analizde antikorun izotipi ağır zincirlerinde IgG1 hafif zincirlerinde ise Kappa olarak belirlenmiştir. Şekil 5.25.'te sol ve sağ panelde + bölgeleri pozitif kontrol çizgilerini göstermektedir. Uygulanan sıvının tüm strip boyunca ilerlediğini ve aynı zamanda striplerin doğru çalışır durumda olduğu anlamına gelir. CC4-B3-G3-H10 antikoruna ait tipler kırmızı oklarla sol panelde IgG1 ve sağ panelde Kappa olarak gösterilmiştir. Diğer strip alanlarında herhangi bir bant gözlenmemiştir. Bu izotiplendirme sonucuna göre; CC4-B3-G3-H10 klonunun IgG1 tipinde olması nedeniyle, saflaştırma için fare IgG1 ailesine çok güçlü afinite gösteren Protein G materyali kullanılması kararlaştırılmıştır.



Şekil 5.25. CC4-B3-G3-H10 antikorunun izotiplendirme sonucu

5.2.4. ANTİKOR SAFLAŞTIRMA

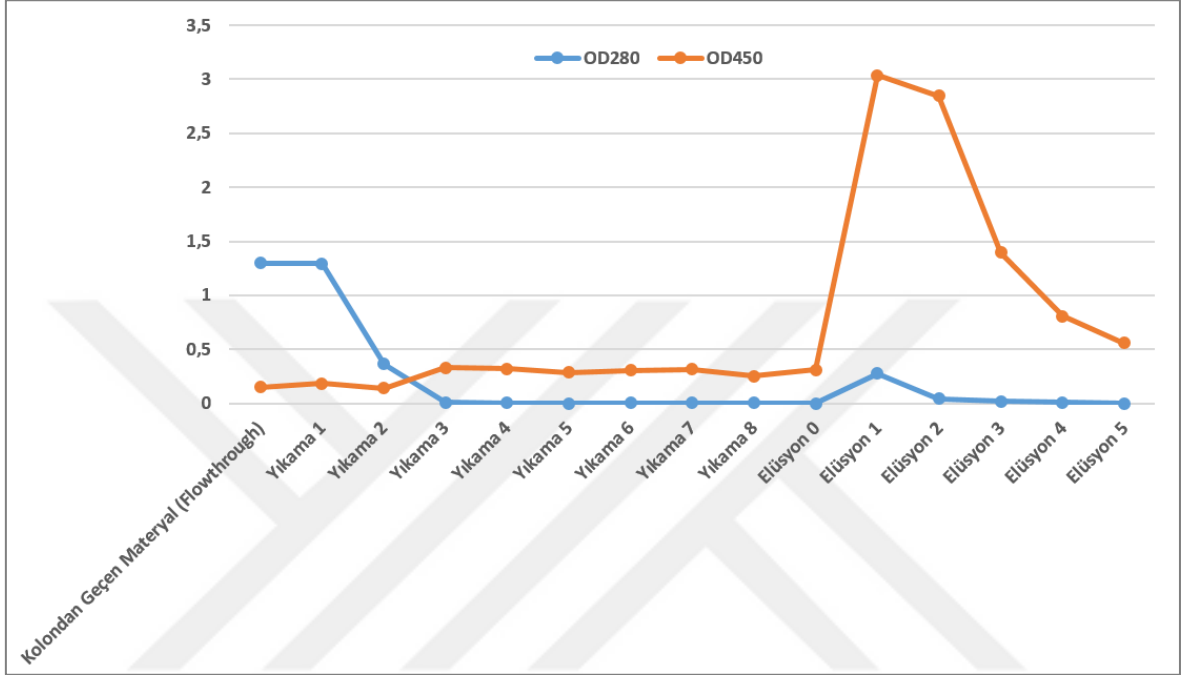
Normal şartlar altında %10 FBS içeren besiyerinde kültür edilen CC4-B3-G3-H10 klonuna saflaştırma için FBS detoksu uygulanmıştır. Her ne kadar HiTrap Protein G HP kolon materyalleri albümin bağlanma bölgesinden yoksun olsa da, serum proteinlerini olabildiğince elemek için hücreler sırasıyla %7,5, %5, %2,5 ve %1,25 FBS içeren ortamda kültür edildi. Bu süreçte hücre üstü süpernatantlar indirek ELISA testi ile EGFRd2 antijenine karşı test edildi. Şekil 5.26.'da %10 FBS içeren süpernatantdan itibaren %1,25'e kadar olan aralıkta hücrelerin antikor üretme durumları yer almaktadır. Bu sonuca göre hücreler FBS azaltımında dahi antikor salgılamaya devam etmişlerdir. Saflaştırma için %1,25 FBS içeren süpernatant biriktirilmiştir.



Şekil 5.26. FBS detoksu sırasında hücrelerin antikor salgılama durumları

Antikor saflaştırması için HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) 1 ml ve 5 ml kolonları ile gerçekleştirilmiştir. Büyük ölçekli saflaştırmaya geçmeden önce 1 ml küçük kolonlarla optimizasyonlar yapılmıştır. Üreticinin de tavsiye ettiği tamponlar ve pH değerleri kullanılmıştır. Bağlama tamponu olarak 0,02 M sodyum fosfat tamponu, 150 mM NaCl çözeltisi pH:7 kullanıldı. Elüsyon için 0,1 M Glisin pH:2,7 kullanıldı. Elüsyon şartları düşük pH gerektirdiğinden, antikor degradasyonunu önlemek amacıyla antikorlar yüksek pH değerinde nötralizasyon tamponu (1M Tris-HCl pH:9) içerisinde toplandı. Antikor içeren süpernatant peristaltik pompa aracılığıyla kolondan geçirildikten sonra seri yıkamalar ile bağlanmayan proteinler kolondan indirildi. Bu süreçte her bir fraksiyondan sonra OD280 değeri ölçülerek protein varlığı kontrol edildi. Yıkamalar için OD280 sıfıra eşitlenince elüsyon aşamasına geçildi ve yine her bir elüanttaki protein miktarı OD280 ile ölçüldü. Tüm fraksiyonlar indirek ELISA testi ile EGFRd2 antijenine karşı test edildi. Şekil 5.27’de saflaştırma sürecine ait fraksiyonların OD280 ve OD450 değerleri görülmektedir. Kolondan geçen materyal 1,297 OD280 değeri verirken 0,157 OD450 değeri vermiştir. Buradan antikorun kolona bağlandığı, istenmeyen proteinlerin ise bağlanmadığı sonucu çıkmaktadır. Seri yıkamalarda da 3. yıkamadan itibaren kolonda yabancı protein kalmamıştır. Elüsyon 1’de 0,277 OD280 değeri elde edilirken, 3,035 OD450 değeri elde edilmiştir. Antikorun büyük oranda elüsyon 1 aşamasında kolondan

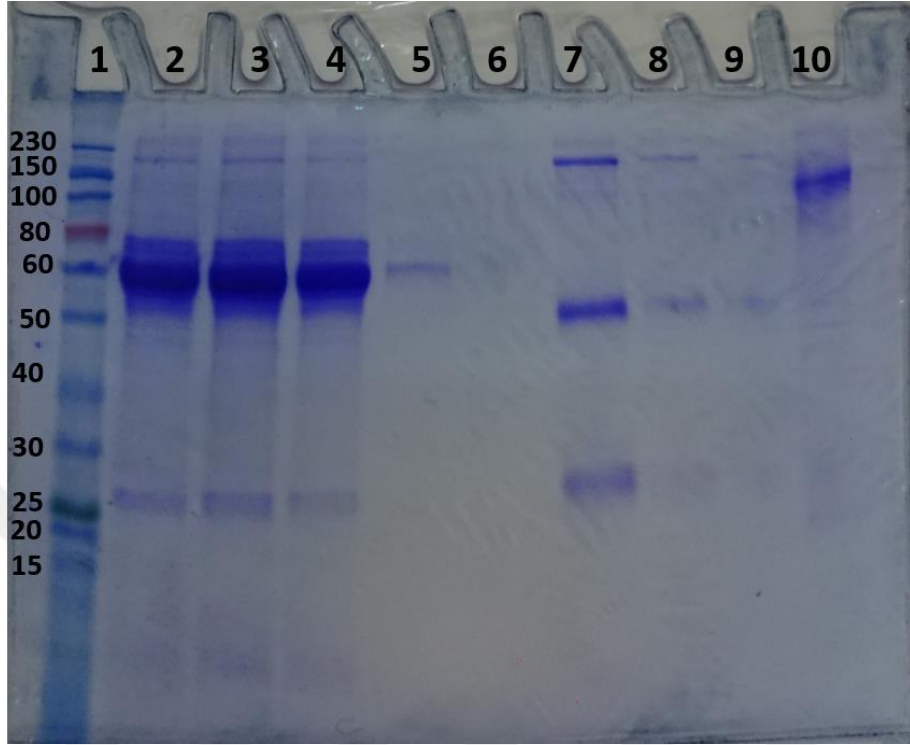
alındığı gözlenmiştir. Metod kısmında belirtildiği üzere elüantlar saflaştırma sonrası tampon değişimi için PBS içerisinde diyalize alınmıştır. Diyaliz sonrası da OD280 ve OD450 değerlerinde değişme olmamıştır. Saflaştırma sonucunda elüsyon 1 fraksiyonunda 5 ml hacimde 150 µg/ml antikor elde edilmiştir. Bu miktar 3K MWCO konsantratör aracılığıyla yaklaşık 3,5 kat konsantre edilerek 550 µg/ml konsantrasyona yükseltilmiştir.



Şekil 5.27. Birinci seri antikor saflaştırma süreci fraksiyonlarının OD280 ve OD450 değerleri

Öte yandan saflaştırma sürecine ait örnekler denatüre edilip SDS-PAGE jelde ayrıştırıldı ve Coomassie blue ile boyanarak analiz edildi. Şekil 5.28’de kolona yüklenen süpernatant örneği, kolondan geçen materyal ve yıkama örnekleri 20’şer µl, elüsyon 1, 2 ve 3 örnekleri ise 3’er µg olarak 6X laemmli tamponu ile karıştırılıp denatüre edilerek yüklenmiştir. 10 numaralı kuyuya ise 3 µg elüsyon 1 örneği B-merkaptoethanol eklenmeden ve kaynatılmadan yüklenmiştir. Coomassie blue boyama sonucuna göre 7 numaralı kuyudaki elüsyon 1 örneğinde 25 kDa bölgede hafif zincir, 50 kDa bölgede ağır zincir bantları görülmektedir. 150 kDa bölgesinde denatüre olmayan total IgG mevcuttur. Aynı zamanda 10 numaralı kuyucukta non-reducing şartlarda total IgG yaklaşık 150 kDa bölgede görülmektedir. Bu kuyuda örnek denatüre edilmediği için 25 ve 50 kDa bölgelerde bant gözlenmemiştir. Elüsyon 2 ve 3’te miktara bağlı olarak silik de olsa ağır ve hafif zincir

bantları elde edilmiştir. Bu sonuçla CC4-B3-G3-H10 klonunun monoklonal antikoru ürettiği ve kaliteli bir şekilde saflaştırıldığı belirlenmiştir.

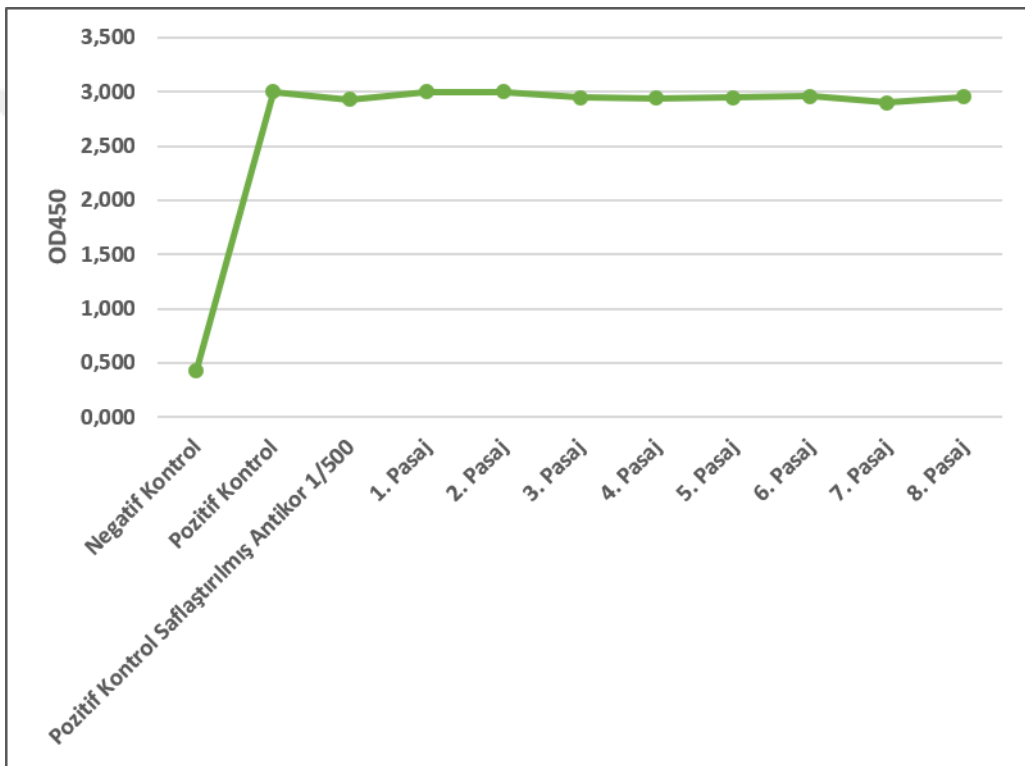


Şekil 5.28. Antikor saflaştırma sürecine ait fraksiyonların Coomassie blue boyaması ile analizi

- 1) Protein standardı, kDa (NEB, 7711S)
- 2) Kolona yüklenen süpernatant örneği
- 3) Kolondan geçen süpernatant (Flowthrough)
- 4) Yıkama 1
- 5) Yıkama 2
- 6) Yıkama 3
- 7) Elüsyon 1
- 8) Elüsyon 2
- 9) Elüsyon 3
- 10-) Elüsyon 1 (Non-reducing şartlar)

CC4-B3-G3-H10 hibridoma hücrelerinin oluşturulması ve birinci seri saflaştırmalardan **yaklaşık bir yıl sonra**, farklı bir araştırma ve hücre kültürü laboratuvarında dondurulmuş hibridoma hücreleri sıvı azot stoklarından tekrar çözülerek kültüre alınmıştır. Hücreler kültür edilirken antikor salgılama durum kontrolü her pasajda ayrılan süpernatantlar kullanılarak indirek ELISA testi ile kontrol edilmiştir. Hücreler yaklaşık 3 günde bir 1:3 oranında üst besiyeri tamamen yenilenerek pasajlanmıştır. 8 pasaj boyunca süpernatant

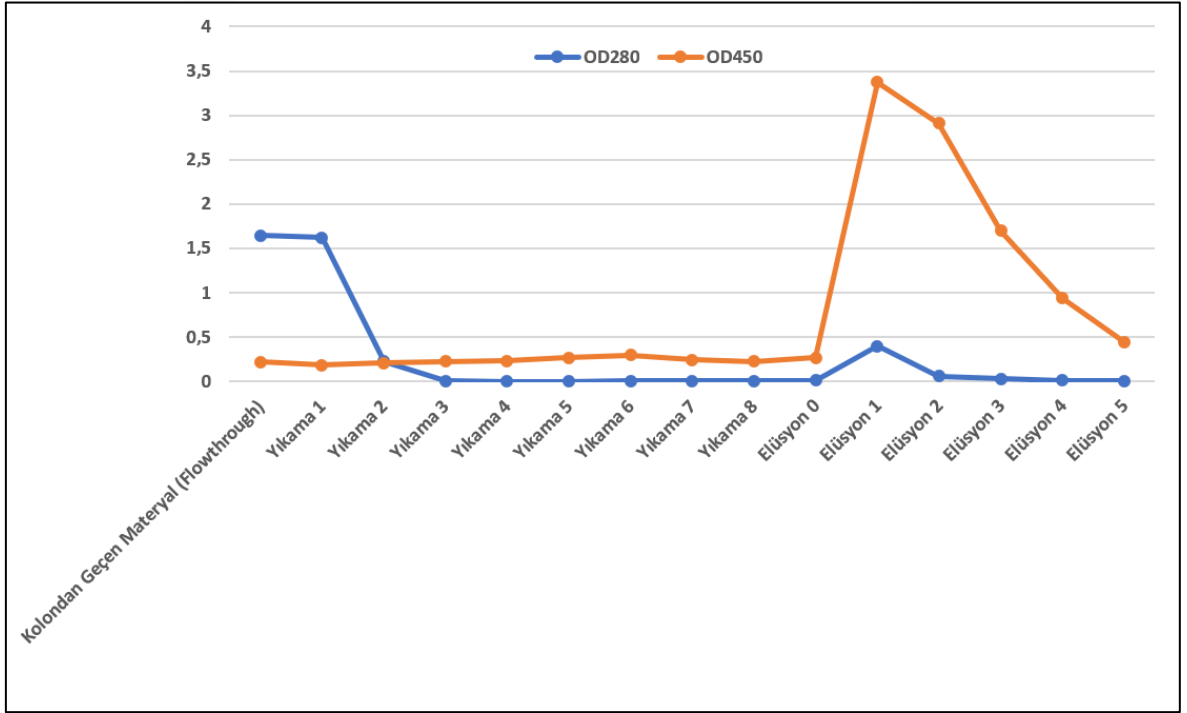
ayrılmıştır. Bu süpernatantlar 2 µg/ml EGFRd2 antijenine karşı indirek ELISA testine tabi tutulmuş ve süpernantantların antikor içeriğine göre değerler elde edilmiştir. Şekil 5.29'da görüldüğü üzere hücreler tüm pasajlar süresince antikor salgısına devam etmiş ve titre düşüklüğü gözlenmemiştir. Pozitif kontrol olarak, daha önceden pozitif olduğu bilinen hücre kültür süpernatantı kullanılmıştır. 2. bir pozitif kontrol olarak ise daha önce saflaştırılmış CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikor 1:500 oranda dilüe edilerek kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise 1X PBS kullanılmıştır. Elde edilen bu sonuçlarla CC4-B3-G3-H10 hücre hattının stabil olarak antikor salgılamaya devam ettiği gözlenmiştir.



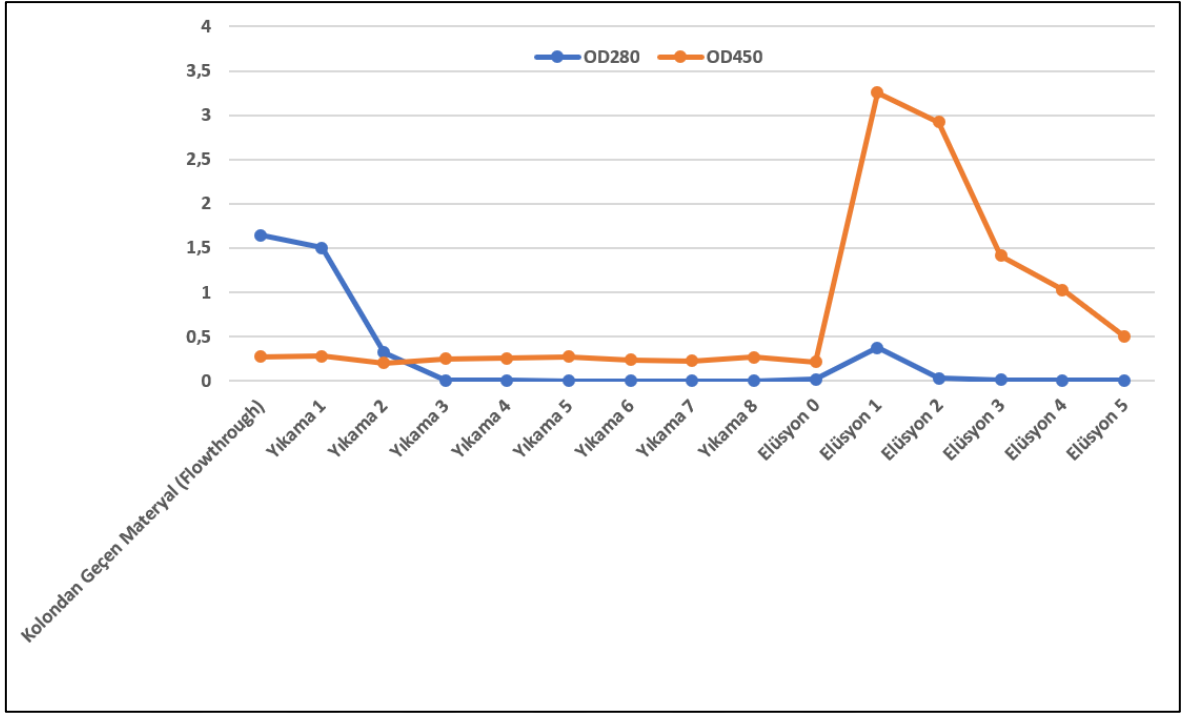
Şekil 5.29. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikor üretici hücre hattının farklı pasajlarda antikor salgılama durumunun indirek ELISA testi sonucu

Bu süreçte CC4-B3-G3-H10 hibridoma hücre hattı kültürüyle toplanan hücre kültürü süpernatantlarından iki ayrı seri daha monoklonal antikor saflaştırması yapılmıştır. Tüm fraksiyonlar indirek ELISA testi ile EGFRd2 antijenine karşı test edilmiştir. Şekil 5.30. ve 5.31.'de ikinci ve üçüncü seri saflaştırma süreçlerine ait fraksiyonların OD280 ve OD450 değerleri gösterilmiştir. Kolondan geçen materyal ikinci seri için 1,644 ve üçüncü seri için 1,646 OD280 değeri verirken sırasıyla 0,221 ve 0,269 OD450 değeri vermiştir. Buradan

antikorun kolona bağlandığı, istenmeyen proteinlerin ise bağlanmadığı sonucu çıkmaktadır. Seri yıkamalarda da 3. yıkamadan itibaren kolonda yabancı protein kalmamıştır. Elüsyon 1’de ikinci seri için 0,4 üçüncü seri için 0,375 OD280 değeri elde edilirken, sırasıyla 3,375 ve 3,251 OD450 değeri elde edilmiştir. Antikorun yine büyük oranda elüsyon 1 aşamasında kolondan alındığı gözlenmiştir. Safılaştırma sonrası antikorlar tampon değişimi için PBS içerisinde diyalize alınmıştır. Diyaliz sonrası da OD280 ve OD450 değerlerinde değişme olmamıştır. Elüsyon 1 fraksiyonlarında 5 ml hacimde ikinci seri için 321 µg/ml üçüncü seride ise 307 µg/ml antikor elde edilmiştir. Bu miktar 3K MWCO konsantratör aracılığıyla yaklaşık 2 kat konsantre edilerek sırasıyla 695 µg/ml ve 602 µg/ml konsantrasyona yükseltilmiştir.

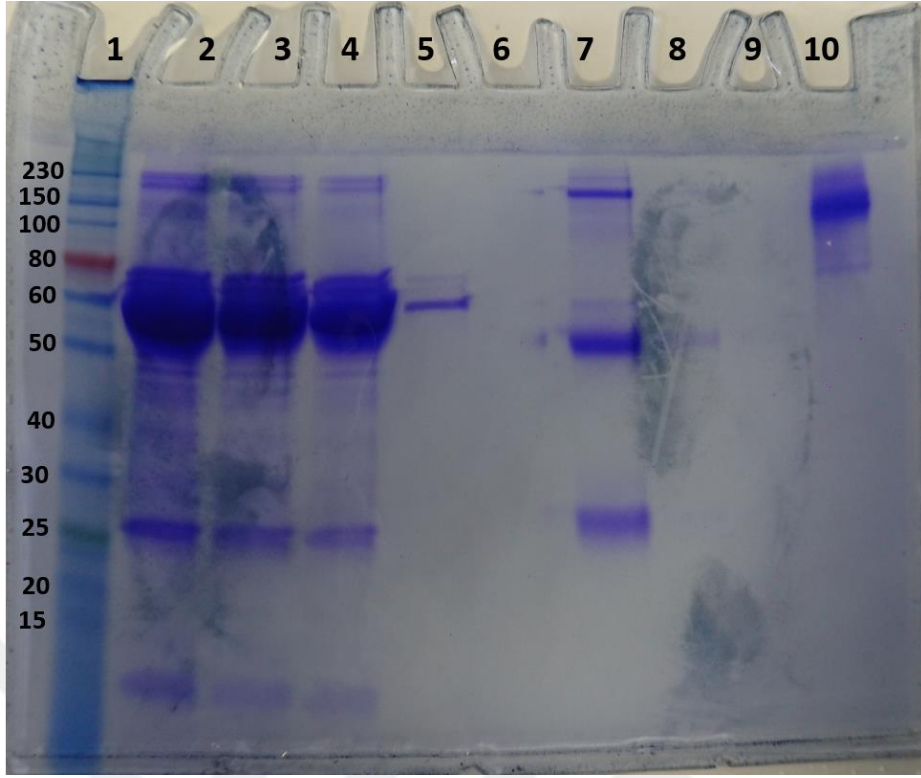


Şekil 5.30. İkinci seri antikor saflaştırma süreci fraksiyonlarının OD280 ve OD450 değerleri



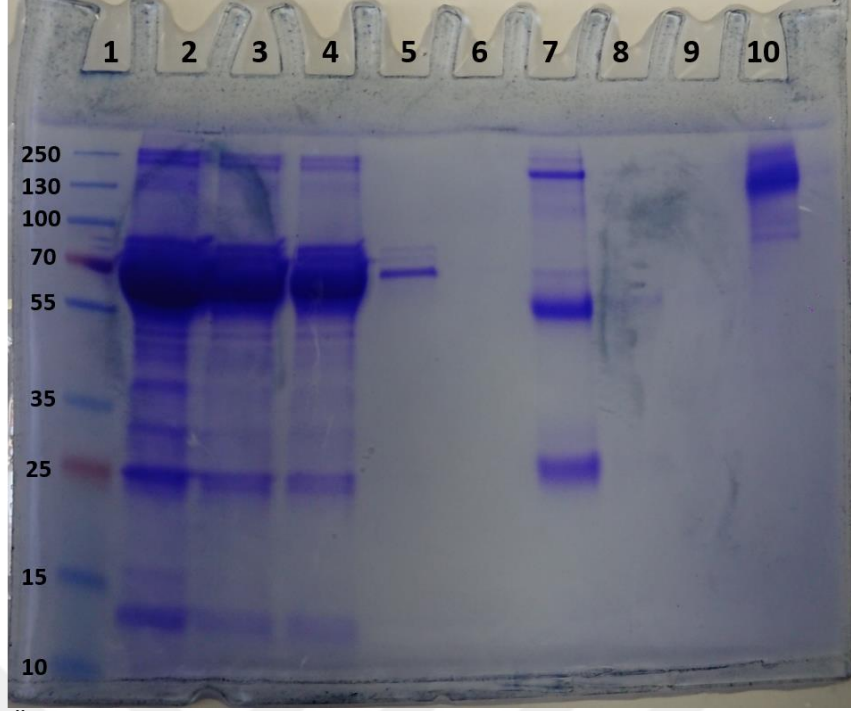
Şekil 5.31. Üçüncü seri antikor saflaştırma süreci fraksiyonlarının OD280 ve OD450 değerleri

İkinci ve üçüncü seri saflaştırma süreçlerine ait örnekler denatüre edilip SDS-PAGE jelde ayrıştırılmış ve Coomassie blue ile boyanarak analiz edilmiştir. Her iki seri saflaştırmalarda da antikorlar 25 kDa bölgede hafif zincir, 50 kDa bölgede ağır zincir bantlarını vermiştir. Aynı zamanda 10 numaralı kuyucukta non-reducing şartlarda total IgG yaklaşık 150 kDa bölgede görülmektedir.



Şekil 5.32. İkinci seri antikor saflaştırma sürecine ait fraksiyonların Coomassie blue boyaması ile analizi

- 1) Protein standardı, kDa (NEB, 7711S)
- 2) Kolona yüklenen süpernatant örneği
- 3) Kolondan geçen süpernatant (Flowthrough)
- 4) Yıkama 1
- 5) Yıkama 2
- 6) Yıkama 3
- 7) Elüsyon 1
- 8) Elüsyon 2
- 9) Elüsyon 3
- 10-) Elüsyon 1 (Non-reducing şartlar)



Şekil 5.33. Üçüncü seri antikor saflaştırma sürecine ait fraksiyonların Coomassie blue boyaması ile analizi

- 1) Protein standardı, kDa (Thermo Scientific, 26619)
- 2) Kolona yüklenen süpernatant örneği
- 3) Kolondan geçen süpernatant (Flowthrough)
- 4) Yıkama 1
- 5) Yıkama 2
- 6) Yıkama 3
- 7) Elüsyon 1
- 8) Elüsyon 2
- 9) Elüsyon 3
- 10-) Elüsyon 1 (Non-reducing şartlar)

Özetle; CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR monoklonal antikor üretici hücre hattından elde edilen süpernatantlardan protein G kolon aracılığıyla monoklonal antikor saflaştırması;

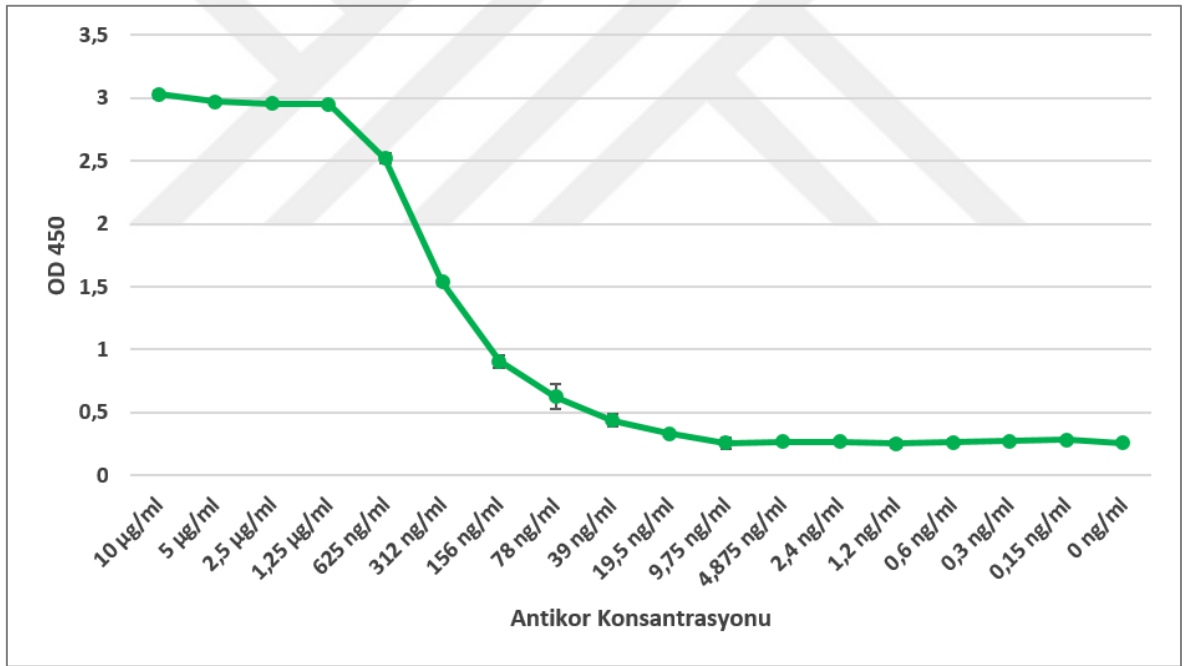
- i. **farklı pasajlardan elde edilen farklı kültürlerle,**
- ii. **farklı zaman dilimlerinde (1 yıl sonra),**
- iii. **farklı laboratuvar ortamlarında (Enstitü yeni binaya taşınmıştır),**

gerçekleştirilmiş ve tüm saflaştırmalarda aynı sonuçlar elde edilmiştir. Hibridoma hücrelerinin uzun süreli sıvı azot stoklarda beklemesi sonrası hücreler sağlıklı bir şekilde çoğalmış, salgı kapasitesinde azalma olmamış ve aynı karakterde antikor üretimine devam etmiştir. **Tüm bu sonuçlarla, antikor saflaştırma süreçlerinin optimizasyonu sağlanmıştır.**

5.3. ANTİ-EGFR MONOKLONAL ANTİKOR KARAKTERİZASYONU VE ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

5.3.1. ANTİJEN - ANTİKOR AFİNİTE TESTİ

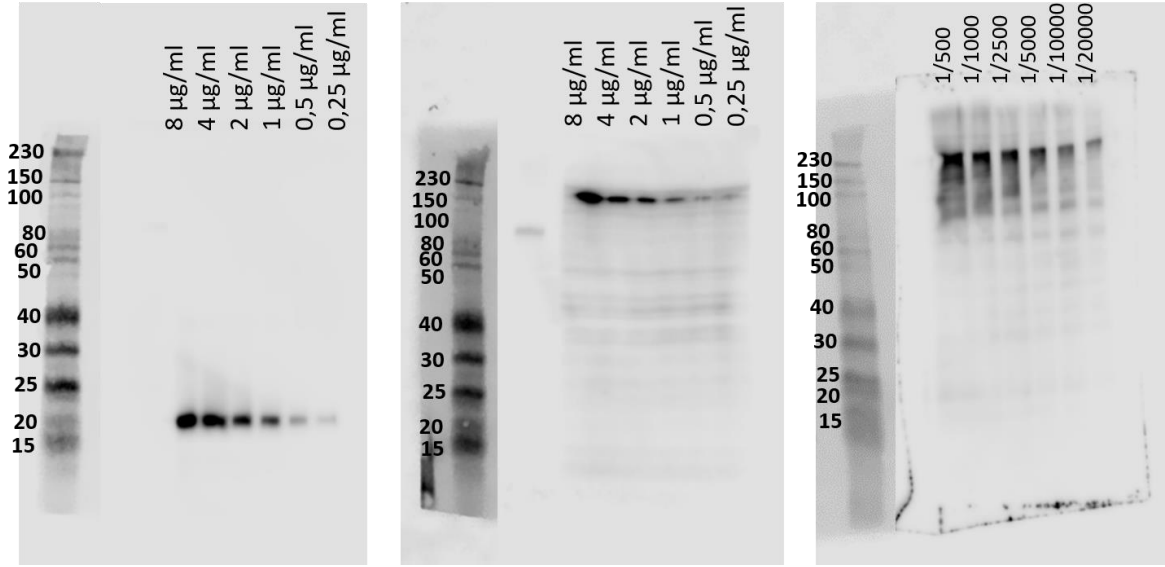
Saflaştırılan CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun rekombinant EGFRd2 antijenine olan afinitesi indirek ELISA testi ile belirlendi. Bunun için ELISA plakasının her bir kuyusu 100 µl 2 µg/ml EGFRd2 antijeni ile kaplandı. Ardından CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru 10 µg/ml konsantrasyondan başlanıp 0 ng/ml'ye kadar 2'şer kat titre edilmiş oranlarda hazırlandı, 3 teknik tekrarlı indirek ELISA testi uygulandı. Şekil 5.34'te, 1,25 µg/ml'den itibaren afinitenin azalmaya başladığı ve 19,5 ng/ml'ye dek sürdüğü görülmektedir. 9,75 ng/ml'de end-point'e ulaşılmıştır. Böylece saflaştırılan CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun EGFRd2 antijenine karşı oldukça güçlü afinite gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 5.34. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve EGFRd2 antijeni afinite eğrisi

5.3.2. CC4-B3-G3-H10 MONOKLONAL ANTİKORUNUN REKOMBİNANT VE ENDOJEN EGFR TANIMA KAPASİTESİNİN İMMUN BLOTLAMA İLE BELİRLENMESİ

Safılaştırılan CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun rekombinant EGFRd2 antijenini ve endojen EGFR'yi protein seviyesinde tanıma karakteristiği immünblotlama ile incelenmiştir. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru 8 µg/ml'den başlanarak 0,25 µg/ml konsantrasyona kadar titre edilmiş ve dilüsyonlar surf blot sistemi üzerinde 10 ng/kuyu rekombinant EGFRd2 antijeni ve 20 µg/kuyu MDA-MB-468 hücre lizatı üzerinde test edilmiştir. Şekil 5.35.'te sol ve orta panelde görüldüğü üzere hem rekombinant EGFRd2 antijenine karşı hem de endojen EGFR'ye karşı azalan antikor konsantrasyonuna paralel olarak sinyal yoğunluğu azalmıştır. Antikor geliştirme çalışmalarında başlangıç referans miktarı olarak bilinen 1 µg/ml konsantrasyonda hem antijene hem de endojen EGFR'ye karşı yeterli düzeyde tanıma gerçekleşmiştir. Bu analizlerle birlikte ticari olarak satılan anti-EGFR monoklonal antikoru (Abcam ab52894) da üreticinin tavsiye ettiği dilüsyona (1/1000) ek olarak 1/500'den başlanıp 1/20000 dilüsyona kadar titre edilmiştir. Şekil 5.35. sağ panelde görüldüğü üzere CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru, endojenik EGFR'yi en az ticari anti-EGFR monoklonal antikoru kadar başarılı tanımaktadır.



Şekil 5.35. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun rekombinant ve endojenik EGFR'yi tanıma kapasitesinin immun blotlama ile belirlenmesi

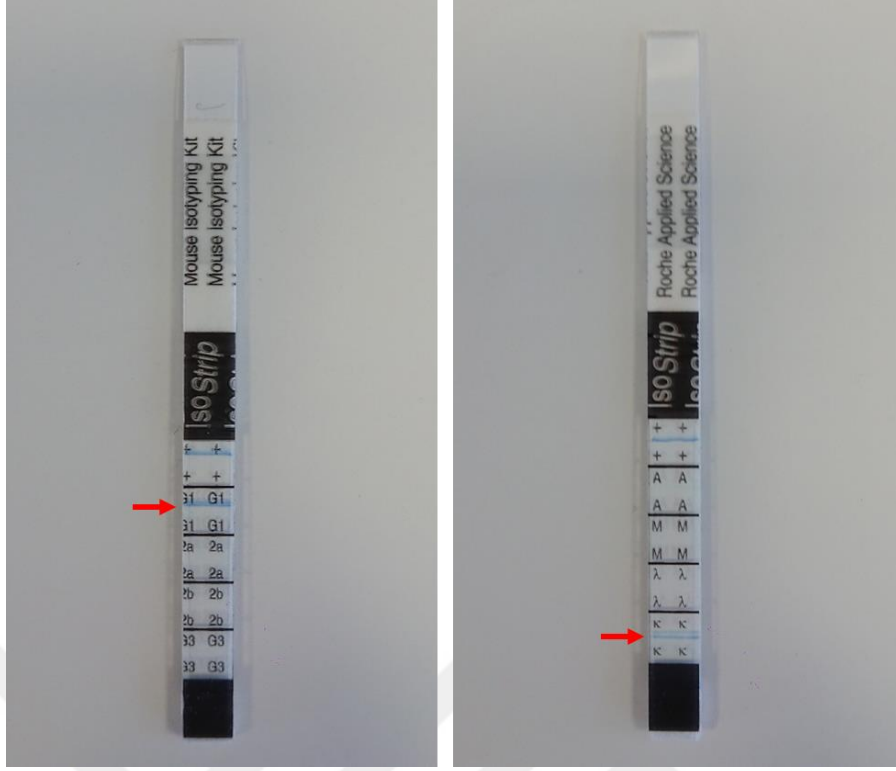
Protein Standardı, kDa: NEB, 7711S

Sol Panel: CC4-B3-G3-H10 antikorunun rekombinant EGFRd2 ile immun blotlama analizi
Orta Panel: CC4-B3-G3-H10 antikorunun MDA-MB-468 hücre lizatında endojen EGFR ile immun blotlama analizi

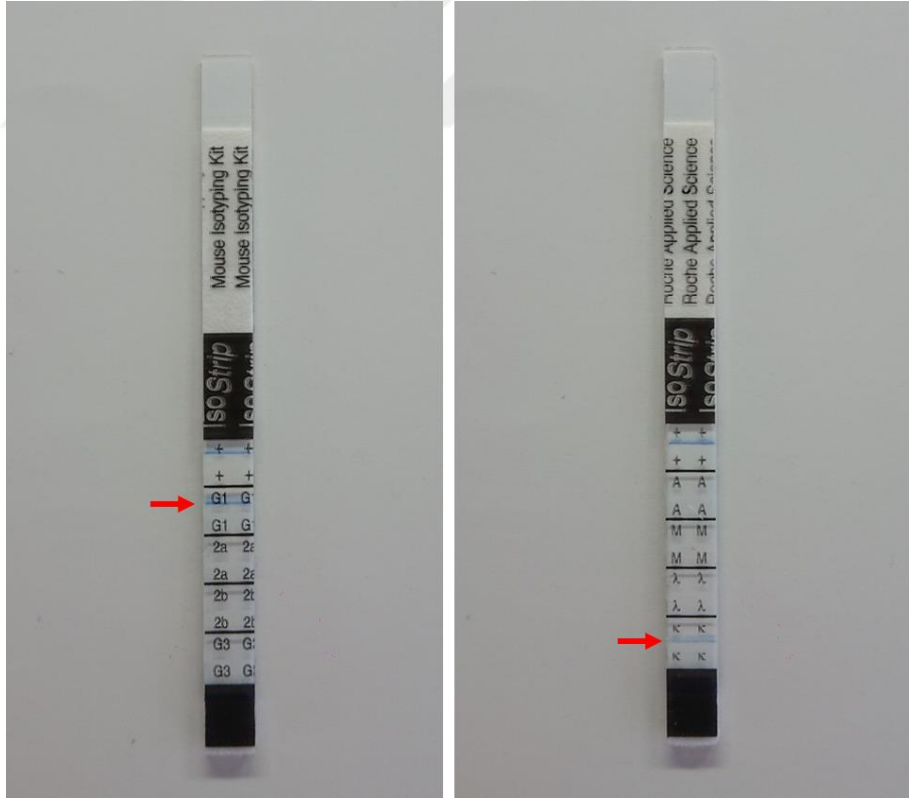
Sağ Panel: Ticari EGFR monoklonal antikorunun MDA-MB-468 hücre lizatında endojenik EGFR ile immun blotlama analizi

5.3.3. SAF ANTİKOR İZOTİPLENDİRMESİ

“5.5. Antikor Saflaştırma” bölümünde verilen ikinci ve üçüncü seri saflaştırma serilerinden sonra saflaştırılan antikor tipinin validasyonu amacıyla izotipleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bunun için Roche Isostrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche) kullanılmıştır. %1 taze hazırlanmış BSA ile dilüe edilmiş 150 µl hacimde 2 µg/ml konsantrasyonda CC4-B3-G3-H10 antikoru ile yapılan iki ayrı analizde antikorun izotipi kültür süpernatantından yapılan izotiplendirme sonucunda olduğu gibi (5.4. Antikor İzotipinin Belirlenmesi Bölümü, Şekil 5.25.) ağır zincirlerinde IgG1 hafif zincirlerinde ise Kappa olarak belirlenmiştir. Şekil 5.36. ve 5.37.’de görüldüğü üzere farklı seri saflaştırmalar sonrası elde edilen saf antikorların izotipleri de ağır zincirlerinde IgG1 hafif zincirlerinde ise Kappa olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.36. İkinci seri CC4-B3-G3-H10 antikorunun izotiplendirme sonucu



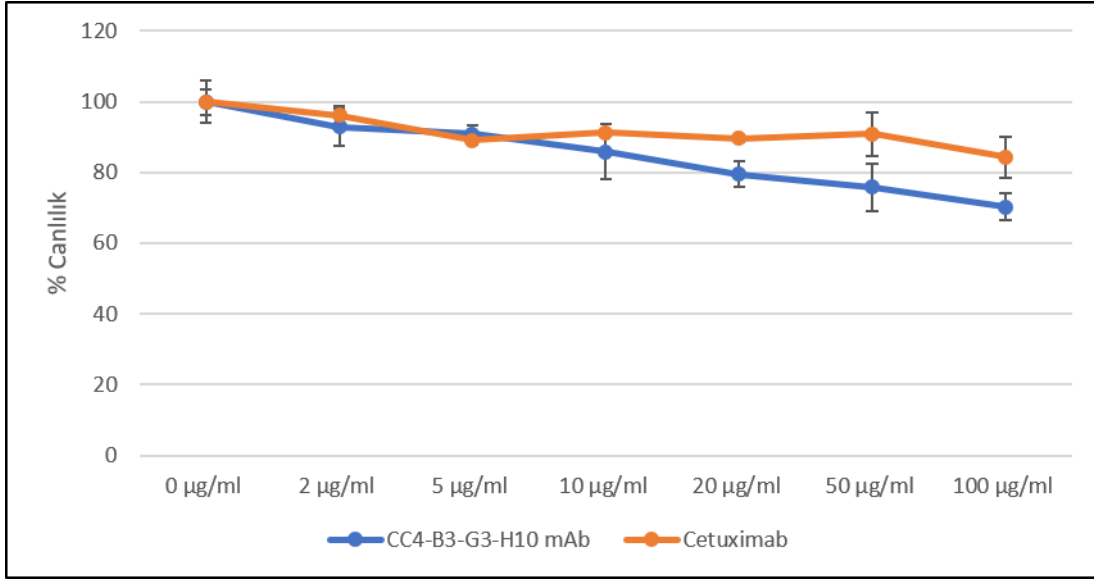
Şekil 5.37. Üçüncü seri CC4-B3-G3-H10 antikorunun izotiplendirme sonucu

5.3.4. CC4-B3-G3-H10 MONOKLONAL ANTİKORUNUN ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRE HATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

5.3.4.1. WST-1 Testi ile Nokta Zamanlı Hücre Canlılık Analizleri

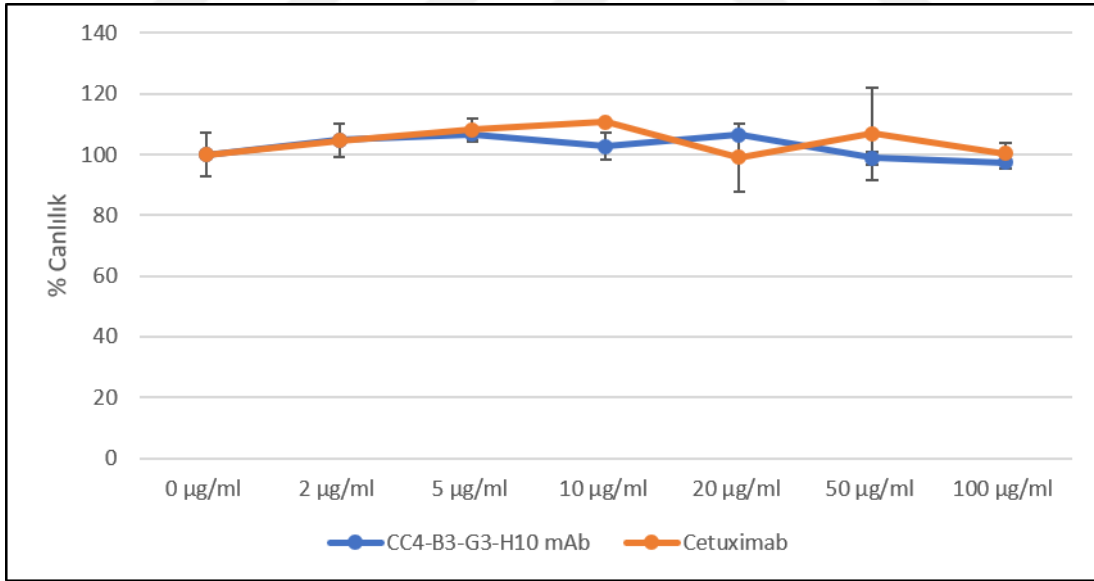
CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun EGFR ifade eden hücre hatlarındaki etkisi WST-1 testi ile incelenmiştir. Caco-2 ve HT-29 kolorektal kanser hücre hatları, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 üçlü negatif meme kanseri hücre hatları, HeLa serviks kanseri hücre hattı uygun sayılarda 96 kuyulu plakalara ekildikten 24 saat sonra CC4-B3-G3-H10 monoklonal anti-EGFR antikoru ve paralel olarak ticari terapötik anti-EGFR monoklonal antikoru Cetuximab (Erbix, Merck) 2, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml dozlarda üç teknik tekrarlı olarak hücreler üzerine uygulanmıştır. Uygulamadan 48 saat sonra hücreler üzerine 20 µl WST-1 reaktifi eklenmiş ve iki saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası plakalar çoklu plaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda okunmuş ve değerler alınmıştır. Uygulama yapılmayan hücre grubu 0 µg/ml olarak belirtilmiş, bu grup değerleri %100 canlı kabul edilerek, uygulama grupları normalize edilmiştir.

Çalışma setine dahil edilen farklı mutasyonel karakterdeki hücre hatları üzerindeki etkiler incelendiğinde direnç mutasyonları yönünden yabancı tip olan Caco-2 kolorektal kanser hücre hattında etkinlik en yüksek düzeyde gözlenmiştir. Şekil 5.38.'de görüldüğü üzere hem CC4-B3-G3-H10 antikoru hem de Cetuximab artan doza bağlı olarak hücre bölünmesini durdurmuştur. Bu noktada CC4-B3-G3-H10 antikoru 100 µg/ml dozda hücre büyümesini %30 oranında inhibe ederken, Cetuximab %16 düzeyinde inhibisyon göstermiştir. CC4-B3-G3-H10 antikoru artan doza rağmen hücreler üzerinde sitotoksite yaratmamış ve selektif inhibisyon karakteri göstermiştir.



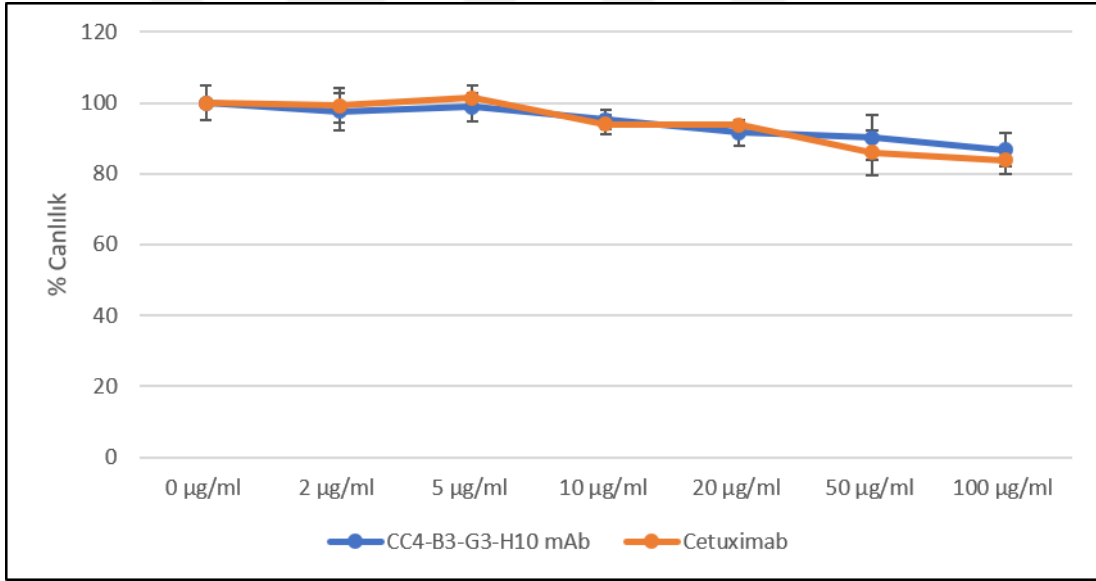
Şekil 5.38. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikor ve Cetuximab'ın Caco-2 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki etkileri

Şekil 5.39.'de KRAS mutant HT-29 kolorektal kanseri hücre hattındaki uygulamalarda ise her iki antikorda hücreler üzerinde beklendiği gibi inhibisyon etkisi göstermemiştir. KRAS mutasyonunun EGFR terapilerine karşı direnç faktörü göz önüne alındığında bu hücre hattında da antikorlar anlamsız toksisite göstermemişlerdir.

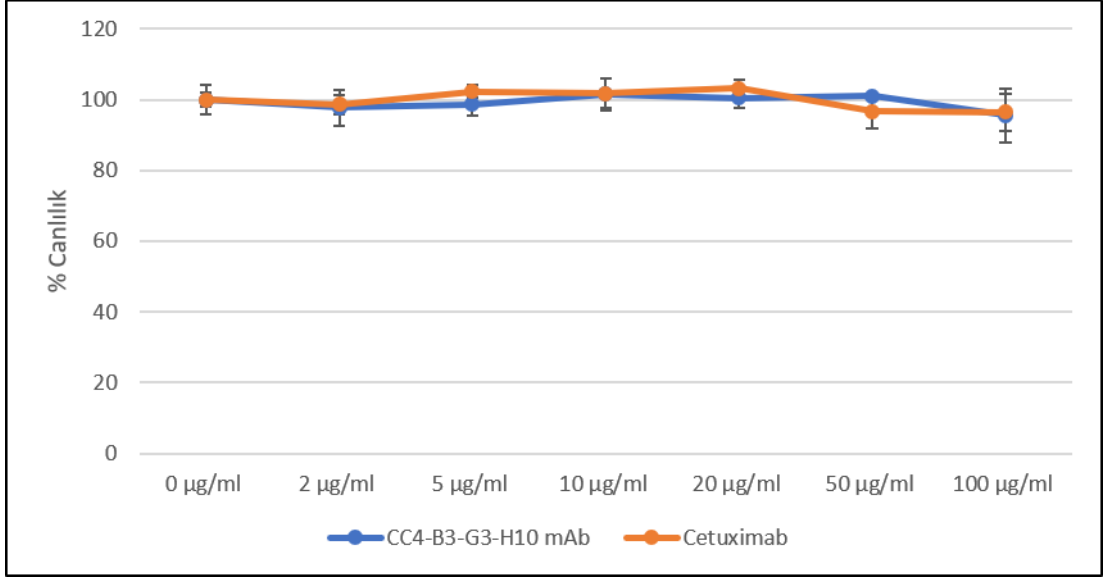


Şekil 5.39. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikor ve Cetuximab'ın HT-29 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki etkileri

EGFR antikorlarının üçlü negatif meme kanseri üzerinde de etkinliklerinin oldukça sınırlı kaldığı bilinmektedir. Çalışma setimize dahil edilen iki farklı üçlü negatif meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkinliklere ait grafikler Şekil 5.40. ve 5.41’de verilmiştir. Şekil 5.40.’da MDA-MB-468 meme kanseri hücre hattı üzerinde CC4-B3-G3-H10 antikoru ve Cetuximab doza bağımlı olarak düşük düzeyde inhibisyon göstermiştir. 100 µg/ml dozda CC4-B3-G3-H10 antikoru %14 inhibisyon gösterirken, Cetuximab %17 inhibisyon göstermiştir. PTEN mutant bu hücre hattında değerler beklendiği şekilde elde edilmiş, CC4-B3-G3-H10 antikoru Cetuximab kadar etkinlik sağlamıştır. Yüksek agresif karakteri ile bilinen BRAF ve KRAS mutant üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 üzerinde ise Şekil 5.41.’de görüldüğü üzere ise her iki antikorda etkinlik göstermemiştir. Meme kanseri hücre hatları özelinde de antikorlar seçici olmayan toksisite göstermemişlerdir. CC4-B3-G3-H10 antikorunun da tıpkı Cetuximab gibi meme kanseri direnç mutasyonlarına karşı benzer yanıtları aldığı gözlenmiştir.

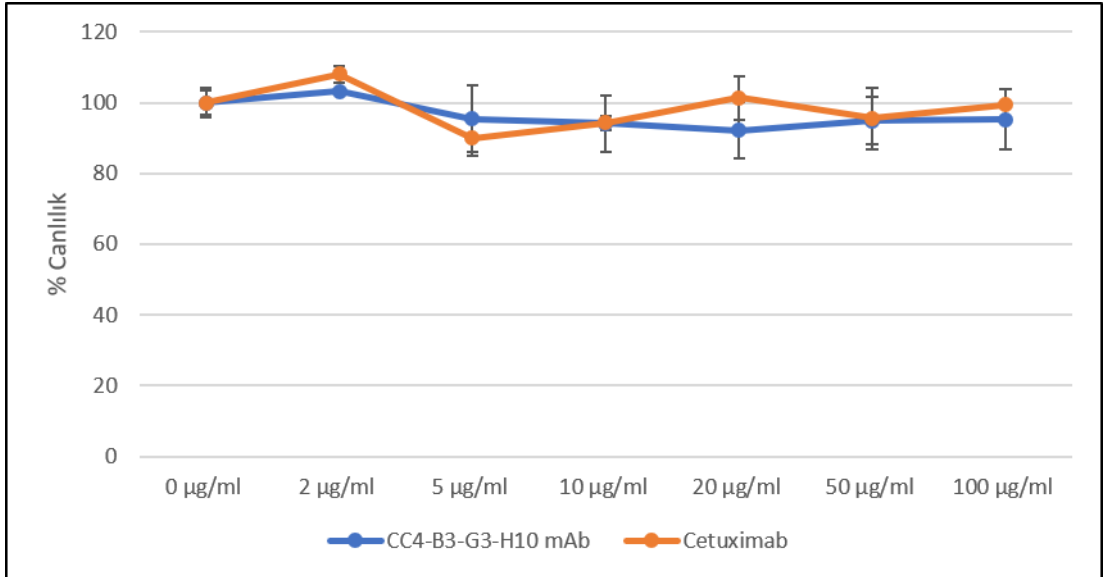


Şekil 5.40. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın MDA-MB-468 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri



Şekil 5.41. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın MDA-MB-231 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri

Şekil 5.42.'de HeLa serviks kanseri hücreleri üzerindeki antikor uygulamalarının sonuçları görülmektedir. CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab'a ait eğrilerde anlamlı bir fark bulunmamaktadır. HeLa hücre hattı direnç mekanizmalarından veya mutasyon profilinden bağımsız olarak çalışma setine dahil edilmiştir. Buradan alınan sonuçla da özellikle kolorektal kanser hücre hattı Caco-2 üzerindeki selektif inhibisyon kinetiği doğrulanmıştır.



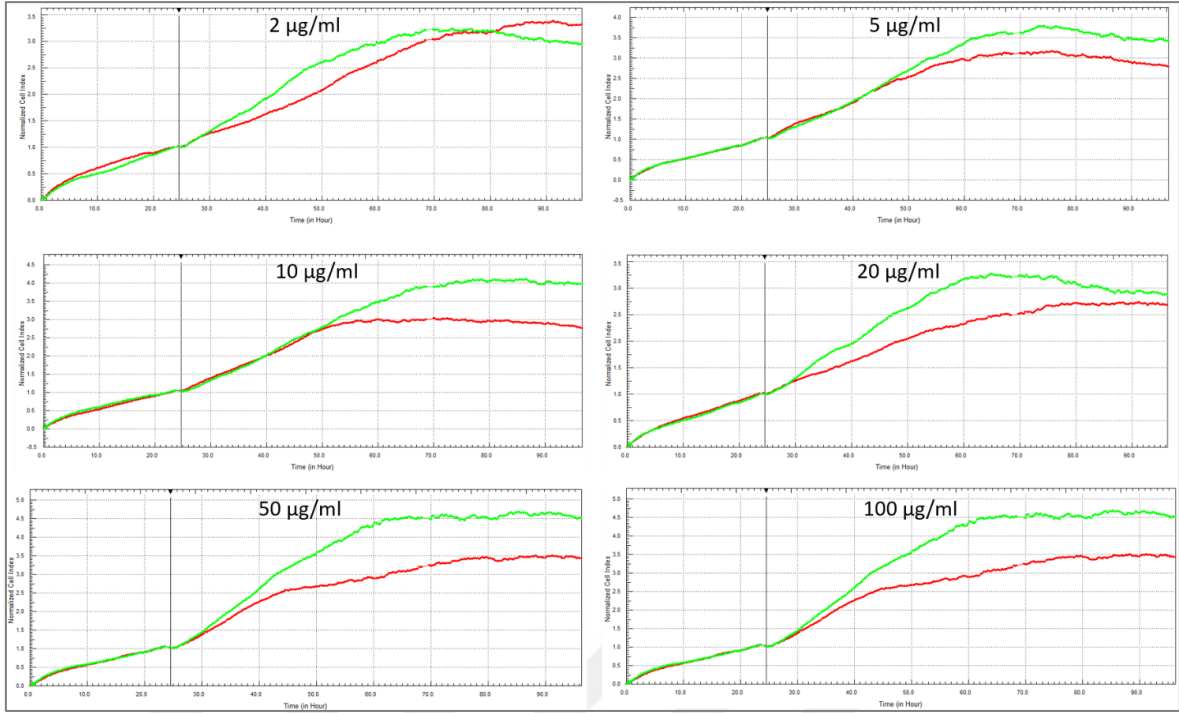
Şekil 5.42. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve Cetuximab'ın HeLa serviks kanseri hücre hattı üzerindeki etkileri

Hücre canlılık analizlerinden aldığımız sonuçlarla; CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun farklı direnç mekanizmalarının gelişmesine neden olan mutasyonlara sahip hücre seti üzerinde ticari-terapötik anti-EGFR antikoruna Cetuximab ile Caco-2 hücre hattı üzerinde en belirgin olmak kaydıyla benzer etkinlik gösterdiği gözlenmiştir.

5.3.4.2. xCELLigence Platformu ile Gerçek Zamanlı Hücre Canlılık Testi

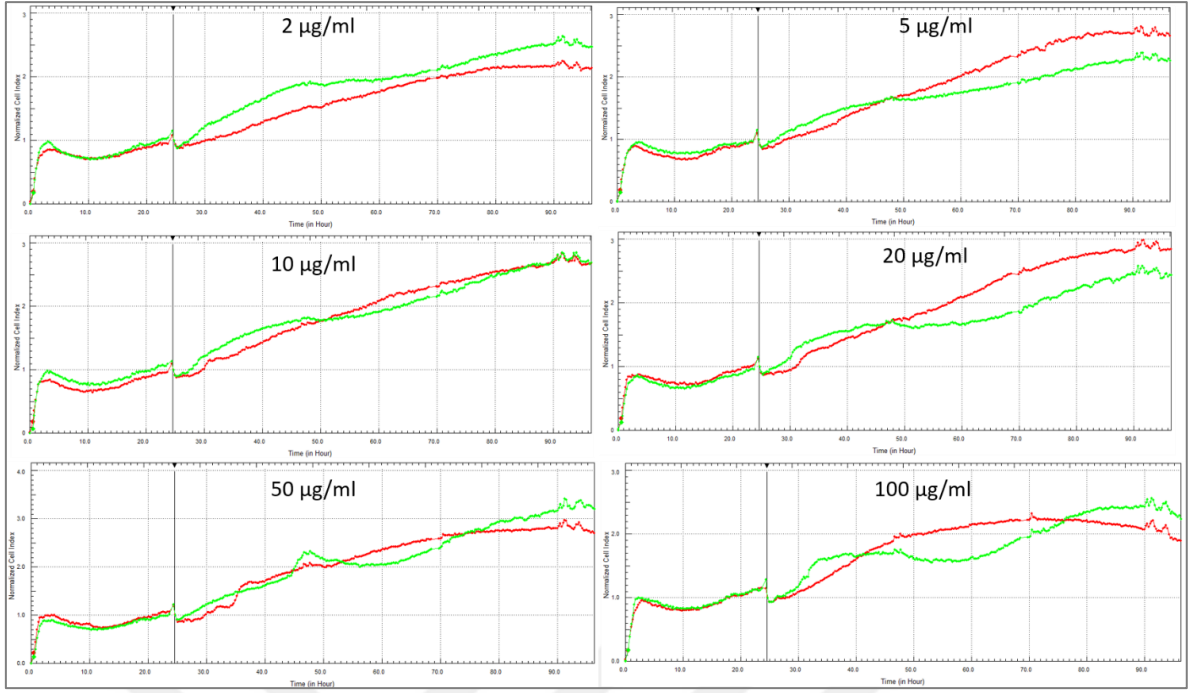
CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun EGFR ifade eden hücre hatları üzerindeki etkisi xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile de incelenmiştir. Nokta zamanlı hücre canlılık analizlerinden alınan sonuçlar üzerine üç farklı karakterde kanser hücre hattı xCELLigence platformunda değerlendirmek üzere seçilmiştir. Her iki antikorunda etkinlik gösterdiği Caco-2, düşük düzeyde etkinlik gösterdiği MDA-MB-468 ve etkinlik görülmeyen HeLa hücre hatları gerçek zamanlı hücre canlılık analizlerinde kullanılmıştır. Caco-2 kolorektal kanser hücre hattı, MDA-MB-468 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı ve HeLa serviks kanseri hücre hattı sisteme özel E-plate 16'lara ekildikten 24 saat sonra CC4-B3-G3-H10 antikoruna altı farklı dozda uygulanmış, karşılaştırma ajanı olarak klinikte kullanılan ticari anti-EGFR monoklonal antikoruna Cetuximab (Erbix) aynı dozlarda hücrelere uygulanmıştır. Antikorların uygulanmasını takiben analiz 72 saat sürdürülerek 15 dakikada bir alınan canlılık ölçümleri gerçek zamanlı olarak kaydedilmiştir. Şekil 5.43., 5.44. ve 5.45.'te CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab'a ait her bir dozun gerçek zamanlı hücre eğrileri görülmektedir. Tüm grafiklerde yeşil renkli eğriler Cetuximab uygulanan hücreleri, kırmızı renkli eğriler ise CC4-B3-G3-H10 antikoruna uygulanan hücrelerin büyüme eğrilerini göstermektedir.

Özellikle kolon kanseri hücreleri üzerinde mutasyon durumuna bağlı olarak hassas ve tedaviye yanıt verdiği bilinen Cetuximab Şekil 5.43.'teki eğrilerde artan doz miktarıyla birlikte hücre bölünmesini durdurmuş ve hücreler sabit faza geçmişlerdir. Aynı miktarda uygulanan CC4-B3-G3-H10 antikoruna ise Cetuximab'a kıyasla daha anlamlı derecede hücre bölünmesini inhibe etmiştir. Özellikle 50 ve 100 µg/ml dozlarında hücre bölünmesinin azalması antikor uygulamasını takiben başlamış, hücreler erken evrede sabit faza geçmişlerdir.



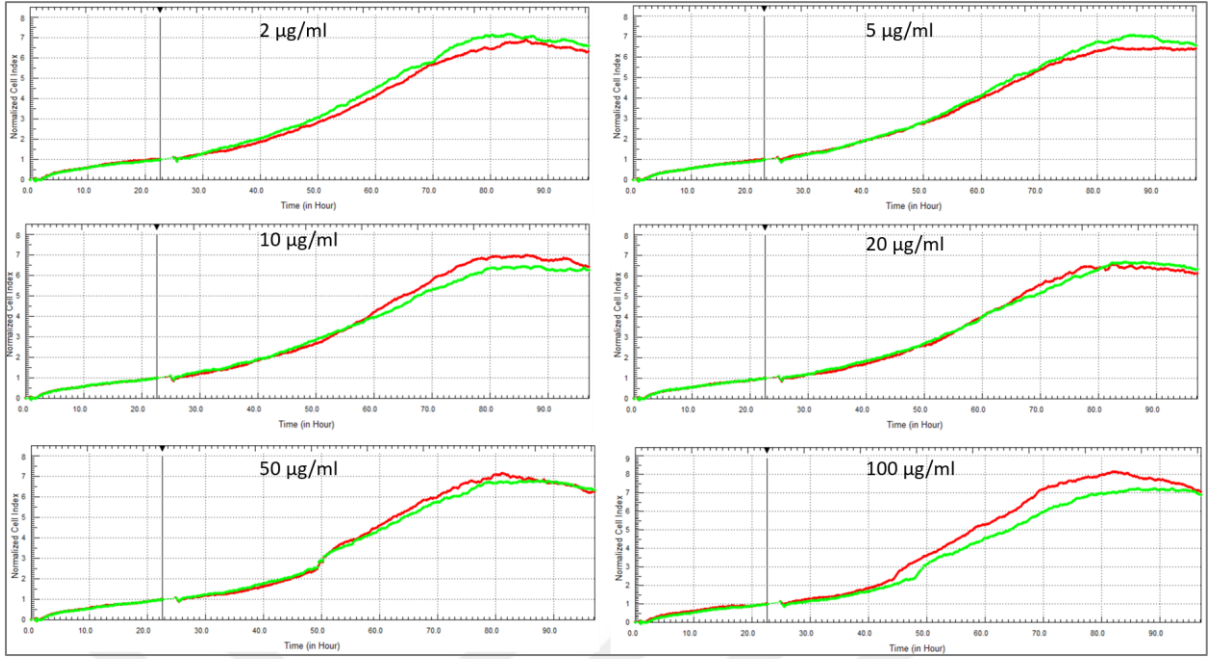
Şekil 5.43. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikor ve Cetuximab'ın Caco-2 kolorektal kanser hücre hattı üzerindeki etkilerinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz grafiği (Kırmızı eğriler: CC4-B3-G3-H10 Yeşil eğriler: Cetuximab)

Şekil 5.44.'te ise Cetuximab'a karşı dirençli olan üçlü negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-468 üzerinde CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab'ın etkileri görülmektedir. Beklendiği gibi 2, 5, 10 ve 20 µg/ml dozlarda hücre büyümesi üzerine etki sağlanmamış hücreler ancak 90. saatten sonra durağan faza maksimum proliferasyon sebebiyle girmişlerdir ancak 50 ve 100 µg/ml dozlarda hücreler durağan faza 50. saat itibariyle girmişlerdir. Bu noktada da CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab benzer etki göstermiş pek çok noktada ise yarışmalı bir inhibisyon gözlenmiştir.



Şekil 5.44. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunu ve Cetuximab'ın MDA-MB-468 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkilerinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz grafiği (Kırmızı eğriler: CC4-B3-G3-H10 Yeşil eğriler: Cetuximab)

Şekil 5.45.'te ise oldukça agresif karaktere sahip HeLa serviks kanseri hücreleri üzerinde antikorların uygulamaları görülmektedir. CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab'a ait eğrilerde anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Hücreler 24. saatteki antikor uygulamalarını takiben de normal proliferasyon eğrisi izlemiş, sabit faza ancak 80. saat sonrasında geçebilmişlerdir. Bu geçiş antikor etkinliği ile değil artan hücre sayısı ile ilişkilidir.



Şekil 5.45. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikor ve Cetuximab'ın HeLa serviks kanseri hücre hattı üzerindeki etkilerinin xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz grafiği (Kırmızı eğriler: CC4-B3-G3-H10 Yeşil eğriler: Cetuximab)

Sonuç olarak üç farklı kanser hücre hattında antikor etkinlikleri daha derin ölçekte, yüksek işlem kapasiteli ve gerçek zamanlı olarak belirlenmiştir. Bu analizlerle antikorların hücrelerin bölünme kinetiklerine etkilerinin ne zaman başladığı ve ne kadar sürdüğü gözlenebilmiştir. En etkili aktivite Caco-2 kolorektal kanser hücreleri üzerinde gözlenmiştir. Antikorlar Caco-2 hücrelerinin bölünmesini diğer hücrelere göre doza bağımlı olarak daha erken evrede durdurmaya başlamış ve hücre bölünmeleri sabit faza geçmişlerdir.

5.3.5. CC4-B3-G3-H10 MONOKLONAL ANTİKORUNUN EGFR ÜZERİNDE FOSFORİLE ETTİĞİ AMİNO ASİTLERİN BELİRLENMESİ

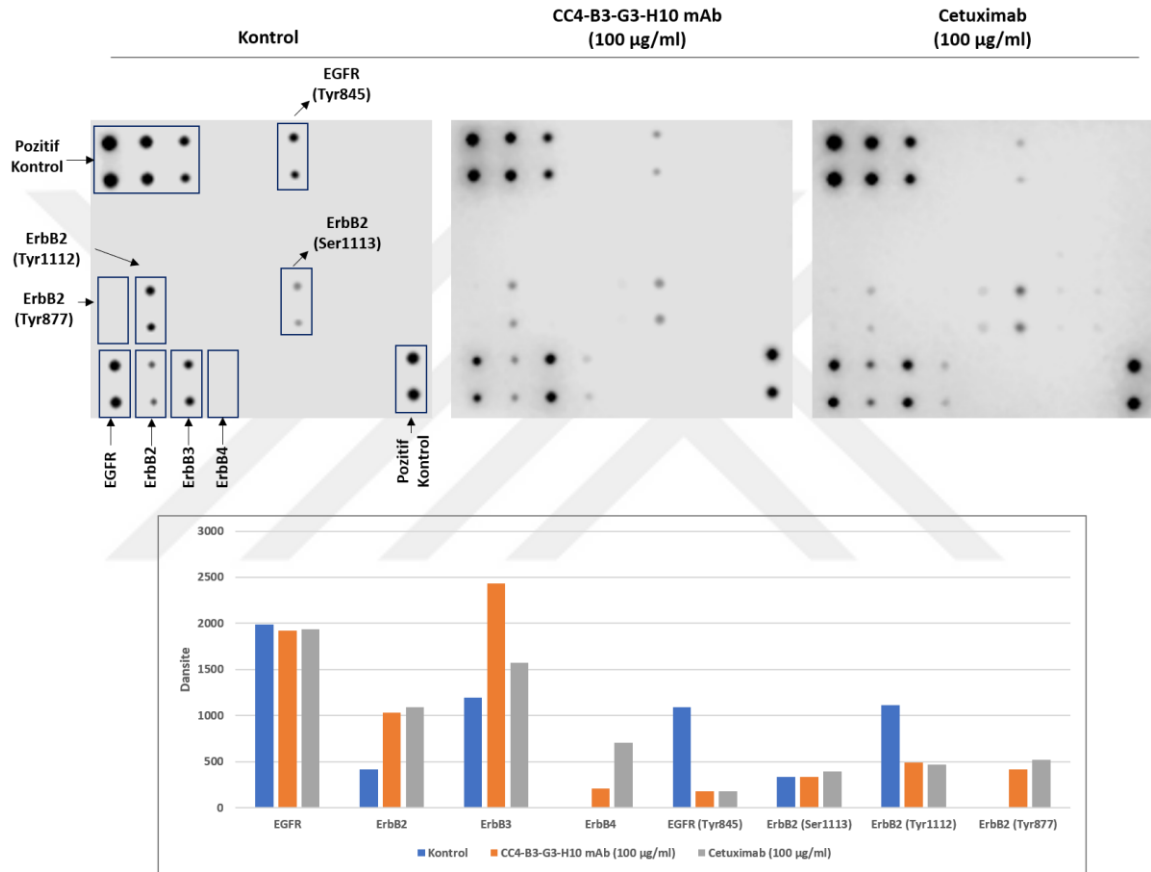
CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun EGFR üzerinde fosforile ettiği aminoasitlerin analizi için mültepleks protein tanılamasına olanak sağlayan Human EGFR Phosphorylation Antibody Array (Abcam) kullanılmıştır. Array sistemi insan EGF reseptörlerinde yer alan 17 farklı fosforilasyon bölgesinin bağıl seviyelerinin eşzamanlı tespitine olanak sağlamaktadır. Kit kompakt özellikte olup tüm deney bileşenlerini

içermektedir. Çalışmamızda altı farklı grup oluşturularak analizler gerçekleştirilmiştir. Bu gruplar;

- i. Kontrol grubu (Uygulama yapılmayan hücreler),
- ii. 100 ng/ml EGF uygulanan hücreler,
- iii. 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR antikoru uygulanan hücreler,
- iv. 100 µg/ml Cetuximab anti-EGFR antikoru uygulanan hücreler,
- v. 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR antikoru uygulaması sonrasında 100 ng/ml EGF uygulanan hücreler,
- vi. 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 Cetuximab antikoru uygulaması sonrasında 100 ng/ml EGF uygulanan hücreler şeklindedir.

Ana materyal olarak EGFR overeksprese eden ve aynı zamanda mutasyon bakımından yabanıl tip olan Caco-2 kolorektal kanser hücre hattı kullanılmıştır. Hücre canlılık analizlerinde de hem CC4-B3-G3-H10 hem de Cetuximab antikorlarına karşı yanıt alınan hattır. Hücreler 6 kuyulu plakalara ekildikten ve %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra gece boyu %2 FBS, sonrasında ise iki saat FBS içermeyen besiyerinde kültür edilmişlerdir. Serum açlığı sonrası yukarıda belirtilen gruplarda antikorlar 100'er µg/ml olarak bir saat süreyle uygulanmıştır. Bir saat sonunda EGF uygulaması olan gruplara 100 ng/ml EGF 15 dakika süreyle uygulanmış ve ardından kit prosedürlerine geçilmiştir. Hücrelerden protein izolasyonu ve kantitasyonunu takiben her bir membran 200 µg/ml hücre lizatı ile muamele edilmiştir. Tüm prosedürler tamamlandıktan sonra membranlar kemiluminesans görüntüleme ile fotoğraflanmıştır. Membran üzerinde alınan ışımlar yine her membran üzerindeki pozitif kontrol ışımlarından alınan değerlerle normalize edilmiştir. Şekil 5.46.'da kontrol grubu (Uygulama yapılmayan hücreler), 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR antikoru uygulanan hücreler ve 100 µg/ml Cetuximab anti-EGFR antikoru uygulanan hücelere ait fosforilasyon analizleri gözlenmektedir. Kontrol grubu hücrelerine ait membran incelendiğinde; Caco-2 hücrelerinde endojen olarak EGFR(Tyr845), ErbB2 (Tyr1112) ve ErbB2 (Ser1113) aminoasitlerinin fosforile olduğu görülmektedir. Total ErbB ailesi üyeleri incelendiğinde de farklı düzeylerde EGFR, ErbB2 ve ErbB3 ekspresyonları bulunduğu gözlenmiştir. Bunlar arasında en yüksek seviyeye sahip aile üyesi olarak da EGFR bulunmuştur. 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 uygulanan hücrelerde endojen fosforile olan aminoasitlerden EGFR(Tyr845) ve ErbB2 (Tyr1112) kontrole göre

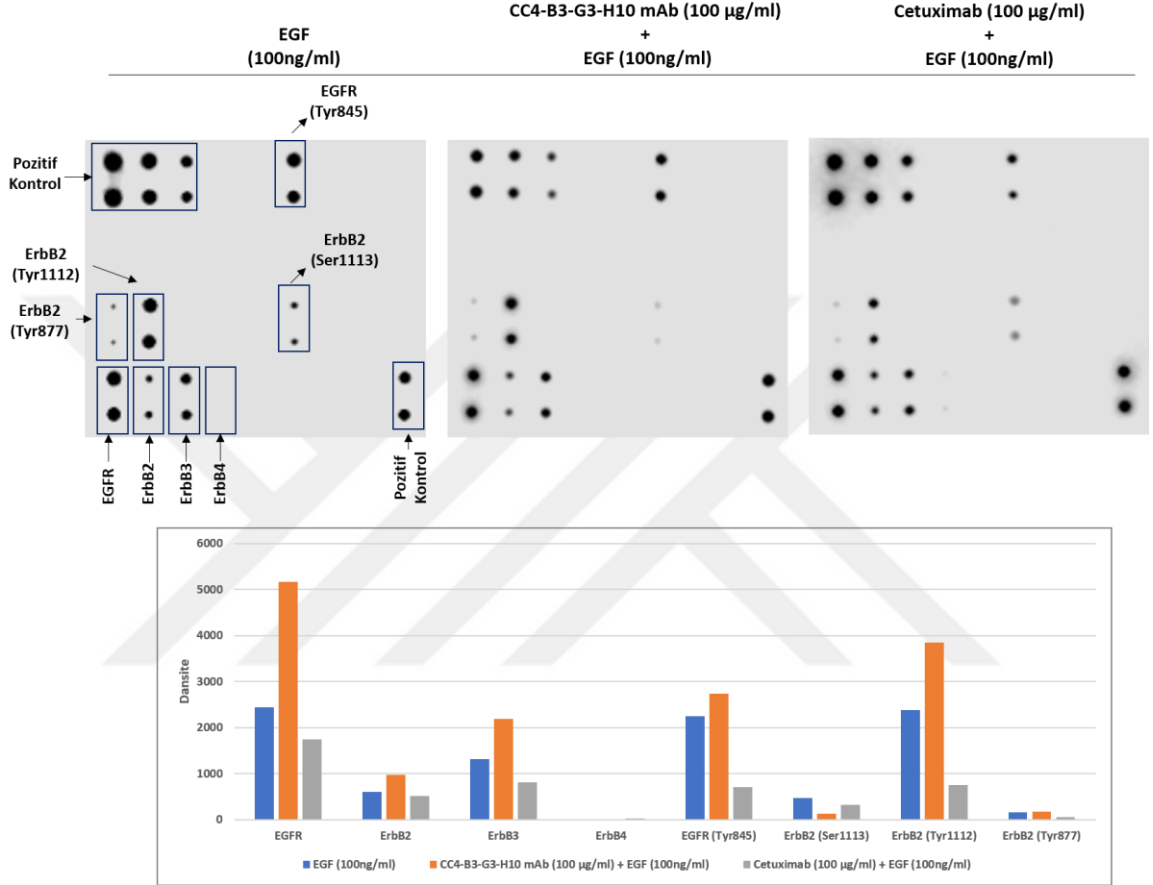
anlamli olarak azalmiştir ($p<0,05$). ErbB2 (Ser1113) aminoasit düzeyinde ise anlamli bir değişik olmamiştir. Öte yandan endojen olmayan ErbB2 (Tyr877) seviyesi ise antikor uygulamaları ile kontrole göre anlamli derecede artmiştir ($p<0,05$). 100 µg/ml Cetuximab uygulaması da endojen fosforilasyon düzeylerinde CC4-B3-G3-H10 ile aynı derecede etkinlik göstermiştir. Total ErbB aile üyelerinin seviyeleri incelendiğinde ise, antikor uygulamaları total EGFR seviyesine etki etmemiş, ErbB2 ve ErbB3 seviyelerini anlamli düzeyde artırmıştır ($p<0,05$).



Şekil 5.46. CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab monoklonal antikorlarının EGFR üzerinde fosforile ettiği aminoasitlerin analizi

Ligand overekspresyonu durumunda antikorların etkinliklerinin araştırılması için ise; hücrelere 100 ng/ml rekombinant EGF uygulaması yapılmıştır. Bununla birlikte iki grup hücreye de 100 ng/ml EGF'ne ilave olarak 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 veya 100 µg/ml Cetuximab anti-EGFR antikorları uygulanmıştır. Şekil 5.47.'de görüldüğü üzere 100ng/ml EGF uygulaması EGFR (Tyr845) ve ErbB2 (Tyr1112) endojenik fosforilasyon düzeylerini EGF uygulanmayan gruplara kıyasla iki kat artışla indüklemiştir ($p<0,05$). EGF uygulanan hücrelere 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 uygulaması ise hem total EGFR'nü hem de EGFR

(Tyr845) ve Erbb2 (Tyr1112) düzeylerini artırmıştır. 100 µg/ml Cetuximab uygulaması ise bu düzeyleri yalnızca EGF uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0,05$). Erbb2 (Ser113) fosforilasyonu ise 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 uygulaması ile hem EGF hem de 100 µg/ml Cetuximab uygulanan hücrelere göre anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir ($p<0,05$).



Şekil 5.47. CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab monoklonal antikorlarının EGF varlığında EGFR üzerinde fosforile ettiği aminoasitlerin analizi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

On yıllardır, EGFR ailesi üyelerinin kanserin ortaya çıkması ve gelişmesinde çok önemli roller oynadığını çok sayıda çalışmada rapor edilmiştir. Bu süreçte çeşitli tümörlerde nokta mutasyonları, delesyonlar ve gen amplifikasyonları dahil olmak üzere EGFR ailesi üyelerindeki genetik değişiklikler tanımlanmıştır. Ek olarak, EGFR sinyal mekanizmalarının ve moleküler yapısının daha iyi anlaşılması, EGFR gen düzensizliklerini taşıyan hastalar için moleküler hedefli tedavilerin keşfedilmesine yol açmıştır (167). Pre-klinik veriler, malign tümörlerin %70'inden fazlasının anormal EGFR ekspresyonuna sahip olduğunu göstermiştir. Ek olarak, klinik çalışmalar, kötü prognoz ve düşük sağ kalım süresi ile ilişkili olmasının yanı sıra, EGFR aşırı ekspresyonunun, tümör invazivliği ve kemoterapi ve radyoterapi direncinin ana etmenlerinden biri olduğu ortaya koyulmuştur. Böylece, EGFR kanserlerde potansiyel bir diyagnostik ve terapötik bir biyobelirteç olarak ortaya çıkmıştır (168). EGFR yolağındaki moleküler anormallikler, kanserde hedeflenen ajanlara hassasiyet veya direncin en önemli belirleyicileridir. EGFR'nün kinaz alanının ekzon 19 ve 21'indeki mutasyonları -özellikle ekzon 19 ve ekzon 21'deki delesyonlar, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde en sık görülen mutasyon kodon 858'de (L858R) değişimler- birincil ilaç direnç mekanizmalarını oluşturur. Öte yandan, bazı tümörlerin genetik yapısı, kalıtsal direnç mekanizmalarına sebep olur. Örneğin, mutant KRAS'ın varlığı, kolorektal kanser hastalarında EGFR monoklonal antikorlarına ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında tirozin kinaz inhibitörlerine karşı gelişen dirençten sorumludur. Öyle ki, şu an için KRAS mutasyon testi yapılmadan anti-EGFR monoklonal antikor tedavisine başlanamamaktadır (169–172).

Bu nedenlerden, mevcut onaylı EGFR terapötiklerinin klinik yanıtları ve direnç mekanizmaları ışığında farklı bölgelerin seçimiyle daha efektif ve özgün anti-EGFR ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Monoklonal antikorların endüstriyel pazar analizi de incelendiğinde yeni terapötikler oldukça artan bir ivme ile ortaya çıkmakta ve ekonomik olarak aynı düzeyde karşılık görmektedir. Öte yandan aday terapötikler mevcutlar ile ortak hedeflenerek veya sinerjistik aktivite etkisinden faydalanmak amacıyla da ayrıca önem arz etmektedir. Monoklonal antikorlar yalnızca terapötik amaçla değil aynı

zamanda kanser tanısında pek çok moleküler araç ile kullanım potansiyeline sahiptir. Bu nedenle yeni ve özgün anti-EGFR ürünlerinin geliştirilmesi kritik önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında mevcut terapötik antikorlardan farklı olarak EGFR dimerizasyon bölgesine karşı yeni ve özgün bir anti-EGFR monoklonal antikoru geliştirilmiştir. Mevcut antikorlar EGFR'ünde alan 3'te yer alan EGF bağlanma bölgesine bağlanırken, geliştirilen antikor homo ve heterodimerizasyondan sorumlu alan 2'yi hedeflemiştir. Antikoru karakterizasyonu ve validasyonu pek çok testle sağlanmıştır. Bu amaçla öncelikle tez danışmanı tarafından, EGFR alan 2'yi tamamen kodlayan 824-1251. nükleotidler pET-30a ifade plazmidi içerisine klonlanmış ve BL21(DE3) ve RosettaGami(DE3)pLysS suşlarında 6xHis tag ile konjuge halde, küçük ölçekte ifade ettirilmiştir.

Tez çalışmasında yukarıda belirtilen stoklar başlangıç materyali olarak kullanılmış olup, kolonilerden bakteriyel kültür ile IPTG aracılı rekombinant EGFRd2 ifadesi sağlanmıştır. 6xHis.EGFRd2 proteinin ifadesi sonrası analizi immünblotlama analizleriyle gösterilmiştir. Büyük ölçekte protein üretimi ve saflaştırma işlemine geçmeden önce ifade edilen proteinlerin çözünürlük testi yapılmıştır. Çözünürlük ve fiziksel stabilite, protein geliştirme sürecinde artefaktların ve örnek kaybının önüne geçmek, agregasyonu engellemek, proteinin ileri analizlerde kullanımını sağlamak için en önemli parametredir (173). Tüm proteinler sadece ekstrakte edilmemeli, aynı zamanda tamamen çözünebilir, etkileşen partnerlerden (protein-RNA/DNA ve protein-protein etkileşimleri, metabolitler vb.) arındırılmış olmalı ve aynı zamanda jel elektroforezi sırasında, izoelektrik noktalarına yaklaştıkça çözünür kalmalıdır (174). Bu amaçla çalışmamızda pET-30a plazmidi içine klonlanıp N terminalinde 6xHis Tag ile ifade ettirilen EGFRd2 proteinin çözünürlüğü test edilmiştir. Proteinlerin ifadesi sonrası hücre pelletleri çözünür fraksiyon, 8M ürede çözünür fraksiyon ve çözünür olmayan fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri olarak örnekler SDS-PAGE ile jelde ayrıştırılmıştır. Aynı örnekler anti-Histag antikoru ile işaretlenerek immünblotlama analizinde de incelenmiş ve EGFRd2 proteinin çözünür olduğu gözlenmiştir. Çözünürlük profillerinin görülmesinin ardından EGFRd2 proteinin pek çok kez büyük ölçekte üretilmiş ve saflaştırılmıştır. Her üretim sonrası hücre lizatlarının immünblotlama analizi ile kontrolü sağlanmıştır. Şekil 5.5.'te her bir üretim serisine ait örneklerin anti-Histag antikoru ile immünblotlama analizinde, 20.24 kDa'luk 6xhis.EGFRd2 bantları gözlenmektedir. Takip eden aşamada, bakteriyel kültürlerden

protein saflaştırmak için HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Ni-NTA kiti nitrilotriasetik asit şelat parçası ile türetilmiş ve iki değerlikli nikel iyonları (Ni^{2+}) ile yüklenmiş boncuklu agarozdan oluşmaktadır. İmmobilize metal afinite kromatografisi, rekombinant His-etiketli protein saflaştırması için yüksek oranda bağlanma kapasitesi sağlamaktadır (175). EGFRd2 proteinini ifade eden bakteriyel pelletlerden protein saflaştırması da pek çok kez geręekleřtirilmiř ve her seferinde saflaştırma basamaklarına ait ürünler SDS-PAGE analizleri ile kontrol edilmiştir. Örneklerin SDS-PAGE analizlerinde EGFRd2 protein saflaştırma işleminin başarıyla geręekleřtięi gözlenmiştir. şekil 5.6., 5.7., 5.8. ve 5.9.'da görüldüğü gibi saflaştırma sürecinde protein kolona bağlanmış, yıkamalarda örnek kaybı yaşanmamıştır. Protein kolondan başarıyla elüe edilmiş ve 20.24 kDa bölgesinde belirgin bant profili göstermiştir. Proteinin imidazol vb. tuzlarından arındırılması için geręekleřtirilen diyaliz işleminden sonra da verim kaybı yaşanmamıştır. Tüm bunlar göz önüne alındığında proteinin kolona yüksek afinite ile bağlandığı, yıkama aşamalarında ayrışma geręekleřmedięi, elüsyon aşamasında ise proteinin başarıyla kolondan indirildiği gözlenerek, optimize edilen süreç tüm saflaştırma setlerinde aynı başarıyla sürdürülmüştür. Öte yandan saf protein içerisinde herhangi bir agregat veya kalıntı gözlenmemiştir. Pellet miktarına bağlı olarak birinci elüsyonlarda 0,5 gr bakteriyel pelletten yaklaşık 300-400 mg/ml arasında protein saflaştırılmıştır. Optimal şartlarda tüm çalışmayı tamamlayacak kadar rekombinant protein saflaştırılarak, ortam şartları ve kit durumu temelinde muhtemel setler arası farklılığın önüne geçilmiştir. Bu durum hem immünizasyonlar hem de ileride geręekleřtirilecek olan indirek ELISA ve immünblotlama analizlerinin tutarlılığı ve güvenilirliği açısından kritiktir. Böylece ilk aşamada, tez çalışmasının kalan iş paketlerinde antijen olarak kullanılacak olan EGFRd2 rekombinant proteini farelerin immünizasyonları, indirek ELISA ile tarama testleri ve immünblotlama analizlerinde kullanılmak üzere saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

EGFRd2 protein saflaştırma sonrası üç adet sağlıklı, dişi ve 6-8 haftalık BALB/c fare 50 µg EGFRd2 antijeni ve Complete Freund's Adjuvan karışımının 15 gün arayla intraperitoneal enjeksiyonları ile immünize edilmiştir. İmmünizasyon öncesi ve sonrası fare kuyruk venlerinden kan toplanarak serum ayrılmış, immünizasyon seviyelerinin belirlenmesi için indirek ELISA testi ile serum titrasyon analizi yapılmıştır. Her üç fareninde EGFRd2 antijenine karşi oldukça güçlü düzeyde yanıt geliştirdiği ve 1/1600000

– 1/3200000 dilüsyonlarına kadar EGFRd2 antikorı ürettikleri belirlenmiştir. 1/6400000 dilüsyonda end-point'e ulaşılmıştır. Farklı antijen preparatları, adjuvanlar, enjeksiyon bölgeleri ve dozlama programlarının bir kombinasyonunu kullanarak immünizasyon gerçekleştirmenin birçok yolu vardır. Farklı bağışıklık kazandırma yöntemlerinin, sonuçta meydana gelen antikorların titresini ve özelliklerini etkileyen farklı bağışıklık tepkilerini uyardığı gösterilmiştir (176). Antikorlar ayrıca immünojen preparasyonundaki safsızlıklara karşı da gelişebilir. Bu nedenle, arzu edilen immünojene maruz kalmayı en üst düzeye çıkarmak için mümkün olduğunca saf bir numune kullanılması tavsiye edilmektedir. Bu sebeple çalışmamızda da spesifiteyi maksimuma çıkarmak için kanser hücresi, bakteriyel hücre veya nükleik asit vb. immünojenler değil doğrudan saf çözünür EGFRd2 proteinini kullanılmıştır. Öte yandan saf proteinlerin immünizasyonu için literatürce 10–100 µg arası doz enjeksiyonu önerilmektedir (177). Literatüre sadık kalınarak çalışmamızda 50 µg EGFRd2 ile immünizasyonlar gerçekleştirilmiştir. İmmünizasyon sürecinde farelerde olağan dışı bir fenotip gözlenmemiştir, fare ölümü yaşanmamıştır. Ayrıca immünizasyonlar öncesi ayrılan serum ile immünizasyonlar sonrası ayrılan serum örneklerinin endojen EGFR ve rekombinant EGFRd2 tanıma kapasiteleri immünblotlama ile belirlenmiştir. İmmünize fare serumu 1/1000 dilüsyonda EGFR ekprese hücre lizatı MDA-MB-468 üzerinde 170 kDa'da total EGFR, 20.24 kDa'da da rekombinant EGFRd2'yi tanıırken, EGFR'nü çok az ekprese eden MCF-7 hücre lizatı üzerinde ise tanımamıştır (Şekil 5.14.). Aynı fareden immünizasyonlar öncesi ayrılan serum örneği ise bu bölgelerde bant vermemiştir (Şekil 5.13.). Bant profilleri ticari bir anti-EGFR monoklonal antikor ile de kıyaslanmıştır. Böylelikle pozitif ve negatif kontrollü aynı zamanda aynı jelde rekombinant proteinin de gözlenebildiği deney sistemiyle immünizasyon spesifitesi belirlenmiştir. İndirek ELISA yöntemi ile belirlenen güçlü immünizasyon seviyesi, immünblotlama analizleriyle desteklenerek öncül özgünlük ortaya konmuştur.

Füzyon deneyi için EGFRd2'ye karşı en yüksek antikor titresini gösteren fare R seçilmiştir. Pek çok kez klasik yöntemle füzyon gerçekleştirilmiş, ancak başarı sağlanamayınca füzyon işlemi, ClonaCell™-HY Hybridoma Kit (Stem Cell) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit füzyondan monoklonal klon eldesine kadarki süreçte gerekli tüm bileşenleri içermektedir. Prensip olarak miyelom hücreleri ile fare B hücrelerinin PEG aracılı füzyonu sonrası yarı-katı metil-sellüloz besiyerlerinde HAT ile seleksiyonuna dayanmaktadır. Besiyerleri

füzyon ve hibridoma için gerekli tüm büyüme faktörleri, hormonlar vb. içerdiği için feeder hücre, HT gibi ek hiçbir bileşene gerek duyulmamaktadır. Böylelikle sağlıklı bir hibridoma işlemi için tüm dış artifaktlar elemine edilmektedir. Bu kompakt sistemin kullanımının çalışmamızın hibridoma deneylerinin güvenilirliğini artırmakla beraber, sağlıklı füzyonların gelişimi açısından da önemli katkılar sağladığını düşünmekteyiz. Füzyon deneyi sonrası füzyon hücrelerinin yarı-katı metil-sellüloz besiyerlerinde HAT ile idamesi ile seleksiyon sonrası toplam 240 ayrı koloni toplanmıştır. Kolonilerin idamesi sırasında 31 koloni ölmüş ve 209 sağlıklı koloni kalmıştır. 209 koloni süpernatantları EGFRd2 antijenine karşı test edilmiş 2 µg/ml EGFRd2 antijenine karşı OD450 değeri 0,5 üzeri absorbans değeri veren 21 koloni elde edilmiştir (Şekil 5.16.). 21 koloninin idamesi sonrası 2. tur ELISA testi sonucunda 13 koloni pozitif reaksiyon vermeye devam etmiştir. Bunlardan ikisi düşük ELISA sinyali verdiği için çalışma setinden çıkarılmıştır. Son olarak 11 koloni EGFRd2'ye karşı pozitif salgılayıcı olarak kabul edilmiştir. Bu 11 koloniye ait süpernatantlar surfbloz sisteminde EGFRd2 antijenine karşı immünblotlama ile test edilmiş ve 9 koloni süpernatantı saf EGFRd2 rekombinant proteinini tanımıştır. Bunlardan ikisi ELISA testinde %5 BSA ve PVC'ye karşı reaksiyon verdiği için elenmiştir. Böylelikle 7 koloni ön testleri geçerek alt klonlamalara aday koloniler olarak belirlenmiştir. Alt klonlama çalışmaları öncesi bu koloniler birkaç tur daha idame edilerek stabil salgılayıcı koloniler belirlenmiştir. 7 koloniden 3 tanesinin idameleri sırasında giderek salgı düzeyleri azalmış ve çalışmadan çıkarılmışlardır. Sonuç olarak 4 koloni stabilizasyon testlerini de geçerek alt klonlama adayları olarak belirlenmiştir. Aday 4 koloni alt klonlamalara tabi tutulmuş, bunlardan biri alt klonlamalar sonrası aktivitesini kaybederken, ikisi ise düşük salgılayıcı klonlara evrilmiştir. CC4-B3 kolonisi ise alt klonlamalar sonrası aktivitesini kaybetmezken, elde edilen CC4-B3-G3-H10 klonu hızlı, stabil ve yüksek salgılayıcı özellik göstermiştir. Süreç özeti olarak; 240 koloniden 21 tanesi EGFRd2 salgılayıcılığı sağlamak sureti ile %8,75 oranında pozitiflik alınmıştır. Antikor salgı stabilizasyon testlerinin ardından 4 koloninin alt klonlama adayı olmasıyla oran %1,66 olarak güncellenmiştir. Alt klonlamalar sonrası 1 koloni tüm kriterleri karşılayarak toplamda %0,42 oranında nihai hibridoma klonu elde edilmiştir. Literatürden benzer çalışmalar incelendiğinde, örneğin, Garrido ve arkadaşlarının EGFR'ne karşı geliştirdikleri 7A7 mAb çalışmasında büyüyen hibridomalardan gelen toplam 447 kültür süpernatantı, ELISA ile rECD-mEGFR'ye karşı reaktivite açısından taranmış ve süpernatantların sadece %0,52'si

spesifik antikorlar içerdikleri belirtilmiştir (178). Itai ve arkadaşlarının akım sitometri, immüblotlama ve immünohistokimya araçlarında kullanılmak üzere geliştirdikleri anti-EGFR EMab-51 monoklonal antikorunun hibridoma sürecinde 100 klondan 94'ü, endojen EGFR'yi eksprese eden A431 hücreleri ile reaksiyona girmiştir. Daha sonra klonlar ayrıca immüblotlama analizi üzerindeki etkilerine göre seçilmiş, bu analizler sonucunda sadece bir klon EMab-51 tanımlanmıştır (179). Bir diğer çalışmada füzyon sonrası 1920 hücreden 340 hibridoma hücresi elde edilmiştir. Bunlardan üç hibridoma kolonisi (%0,0015) pozitif stabil salgılayıcılar olarak belirlenmiştir (180). Hattori ve arkadaşlarının anti-hMCT-2 monoklonal antikoru geliştirdikleri çalışmalarında hibridoma süreci sonunda nihai antikor üreten bir klon (NhM2A1) elde ettiklerini bildirmişlerdir (181). Bu şekilde çalışmamızdaki hibridoma veri setinin literatürle uyumluluk gösterdiği görülmektedir. Her hibridoma süreci kendine özgü ve dinamik olsada, ikincil referanslarla tutarlılık önemli bir noktadır. Çalışmamız kapsamında elde edilen CC4-B3 kolonisi ve CC4-B3-G3-H10 klon süpernatantlarının endojen EGFR tanıma kapasiteleri immüblotlama ile yüksek EGFR ifadesine sahip MDA-MB-468 ve çok düşük EGFR ifadesine sahip MCF-7 hücre lizatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki süpernatant da 170 kDa'da EGFR'nü başarıyla tanımıştır. Ayrıca şekil 5.24. incelendiğinde bu iki süpernatant arasında CC4-B3-G3-H10 klonu, CC4-B3 kolonisine göre beklendiği gibi daha temiz bir tanılama fenotipi ortaya koymuştur. Fare R'ye ait serum, CC4-B3 koloni süpernatantı ve CC4-B3-G3-H10 klon süpernatantı immüblotlamaları ile kronolojik olarak artan spesifite bariz bir şekilde gözlenmektedir.

CC4-B3-G3-H10 klon süpernatantından antikor saflaştırma işlemine geçmeden önce uygun kolon materyalini seçmek için antikor izotiplendirmesi yapılmıştır. Analiz sonucu antikor izotipi IgG1 Kappa olarak belirlenmiştir (Şekil 5.25.). Bunun üzerine saflaştırmada IgG1 ailesine çok güçlü ve geniş ölçekte afinite gösteren Protein G materyali kullanılmıştır. Afinite kromatografisi, yüksek seçiciliğinden dolayı en önemli antikor saflaştırma yöntemidir. En yaygın kullanılan biçimleri, stafilokok Protein A, streptokok Protein G, Peptostreptococcus magnus'tan Protein M ve Mycoplasma'dan Protein M gibi bakteriyel olarak türetilmiş reseptörlerdir (182). Protein G, 600 amino asit rezidüsünden oluşur. Karboksi-terminali I, II ve III alanları olarak adlandırılan üç IgG bağlayıcı alan içerir. Bu alanların her biri 55'er rezidü içerir ve kısa bağlayıcı sekanslarla diğerlerinden ayrılır. Protein G, farklı kaynaklardan IgG'ler için protein A'dan daha geniş bir özgüllüğe sahiptir

ve IgG bağlayıcı alanları, türe bağlı olan afinitelerle antikor molekülünün hem Fab hem de Fc kısımlarına bağlanabilir (183). CC4-B3-G3-H10 klon kültürü saflaştırma için bölüm 5.2.4.'te belirtildiği şekilde FBS detoksu ile biriktirilmiştir. Her ne kadar kullandığımız kolon materyali albümin bağlanma bölgesinden yoksun olsa da daha yüksek saflık elde etmek için bu strateji uygulanmıştır. Süpernatant tam otomatik peristaltik pompa ile HiTrap Protein G HP (GE Healthcare) kolondan geçirilmiş ve antikor elüe edilmiştir. Saflaştırma süresince tüm fraksiyonlar için OD280 okuma değerleri alınmış aynı örnekler sonrasında indirek ELISA testi ile EGFRd2 antijenine karşı test edilmiştir. Değerler karşılaştırılarak saflaştırma süreç grafiği oluşturulmuştur (Şekil 5.27.). Böylece, antikorum kolona yüksek afinite ile bağlandığı, yıkamalarda kayıp yaşanmadığı ve elüsyon aşamasında kolondan başarıyla indirildiği gözlenmiştir. İlgili fraksiyonlarda beklenmeyen bir sinyal gözlenmezken, süreç boyunca da herhangi bir agregat oluşumu, kalıntı veya kolon tıkanıklığı durumu yaşanmamıştır. Saflaştırma sürecine ait örnekler SDS-PAGE ile jelde ayrıştırılmış ve Coomassie blue boyaması ile görüntülenmiştir. Şekil 5.28 7. kuyuda görüldüğü üzere CC4-B3-G3-H10 antikorumun 25 kDa bölgede hafif zincir, 50 kDa bölgede ağır zincirleri bulunmaktadır. Aynı zamanda non-reducing şartlarda total IgG yaklaşık 150 kDa bölgede görülmektedir. Böylelikle antikor yapısal olarak jel üzerinde görüntülenmiştir. Saflaştırılan antikorum ayrıca izotip analizi tekrar gerçekleştirilmiştir ve klon süpernatantında olduğu gibi IgG1 kappa olarak belirlenmiştir. 2.2.4. Monoklonal Antikorların Endüstriyel Pazar Analizi bölümünde detayları verildiği üzere piyasadaki tüm monoklonal antikorlar IgG alt sınıflarından birine aittir. Bunların %79'u IgG1 tipi oluşturmaktadır. %70'i ise kappa hafif zincirlerine sahiptir (140). Bu yönü ile geliştirilen antikorum piyasadaki en yaygın izotipe ait olduğu görülmektedir. IgG1, insan serumlarında en bol bulunan IgG alt sınıfıdır. Temel işlevi patojenlere karşı antikor tepkilerine aracılık etmektir. Bu işlevi farklı yollarla gerçekleştirir. Değişken alanı yoluyla çözünebilir proteinlere ve membran protein antijenlerine bağlanarak sağlayabilir. Öte yandan bağışıklık sisteminin doğuştan gelen efektör mekanizmalarını aktive edebilir. IgG1, C1q'ya bağlanarak komplemente bağlı sitotoksosite aktivitesi gösterebilir. Fc reseptörlerine de bağlanarak antikora bağlı hücre aracılı sitotoksositeye yol açabilir. Öte yandan primer antikor tepkileri de IgG1 tarafından indüklenir. IgG1 normalde en bol alt sınıf olduğundan, çeşitli primer ve sekonder antikor eksikliklerinde görülen IgG1 eksikliği, toplam IgG seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır (184,185).

Hedef antijen için optimum afiniteye sahip bir monoklonal antikor üretmek, etkili ve güvenli bir ajan elde etmedeki önemli bir faktördür (186). Bir monoklonal antikoru hedef antijene bağlanma kinetiği antikoru en önemli etkinlik parametrelerindendir. Çalışmamızda birinci basamak antijen/antikor afinite testi olarak kullanılan indirek ELISA testi kullanılmıştır. Her ne kadar mikroçip sistemleri, optik biyosensörler gibi afinite test sistemleri geliştirilmiş olsa da konvansiyonel olarak antikor geliştirme sürecinde indirek ELISA testi altın standarttır. Çalışmamızda saf CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru 2 µg/ml rekombinant EGFRd2 antijenine karşı 10 µg/ml'den ikişer kat titre edilerek afinite düzeyi belirlenmiştir (Şekil 5.34.). 1,25 µg/ml'den itibaren afinitenin azalmaya başladığı ve 19,5 ng/ml'ye dek sürdüğü görülmektedir. 9,75 ng/ml'de end-point'e ulaşılmıştır. Bu sonuç, CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru rekombinant EGFRd2 içerisinde yer alan hedef epitopuna güçlü bir afinite ile bağlandığını göstermektedir. Çalışmamızda antikoru bağlanma kinetiği immünblotlama analizleriyle de desteklenmiştir. Surfblot sisteminde hem rekombinant antijen hem de endojen EGFR tanıma kapasitesi için EGFR overeksprese eden MDA-MB-468 hücre lizati farklı konsantrasyon titrelerinde (8 µg/ml'den 2'şer kat azalarak) CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ile işaretlenmiştir (Şekil 5.35.). Konsantrasyona bağımlı bir şekilde tanıma profili gözlenirken optimal bağlanmanın 1 µg/ml konsantrasyonda olduğu görülmüştür. Zayıf da olsa 0,5 ve 0,25 µg/ml konsantrasyonlarda dahi ışına alınmıştır.

CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru farklı seviyelerde EGFR ifade eden ve mutasyonel karakterde kanser hücre hatları üzerindeki etkinliği hücre canlılık analizleri ile belirlenmiştir. Kolorektal kanser hücre hatlarından Caco-2 herhangi bir direnç mekanizmasından sorumlu mutasyon içermezken, HT-29 ise BRAF ve PIK3CA mutant hücre hatlarıdır (187). Meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-468 PTEN mutant, MDA-MB-231 ise KRAS ve BRAF mutant hücre hatlarıdır (188,189). Farklı bir soy olarak HeLa serviks kanseri hücre hattı da ayrıca çalışma setine dahil edilmiştir. Hücrelere 2, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml şeklinde artan dozlarda CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru ve ayrıca ticari terapötik Cetuximab uygulanmış ve uygulama sonrası 48. saatte hücre canlılık ölçümleri WST-1 testi ile gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlara göre en yüksek etkinlik Caco-2 hücreleri üzerinde görülmüştür (Şekil 5.38.). CC4-B3-G3-H10 antikoru 100 µg/ml dozda hücre büyümesini %30 oranında inhibe ederken, Cetuximab %16 düzeyinde inhibisyon göstermiştir. Her iki antikorda kontrolsüz bir sitotoksik profil sergilememiştir.

BRAF mutasyonu taşıyan HT-29 hücreleri üzerinde ise her iki antikorda anlamlı derecede etkinlik göstermemiştir. Literatürden benzer çalışmalar incelendiğinde; Song ve arkadaşlarının kolon kanseri hücrelerinde Cetuximab'a karşı direnç mekanizmasını araştırmak için; (SW480, HCT-116, DLD-1, HT-29, RKO, Caco-2 ve DiFi) yedi farklı kolon kanseri hücre hattında Cetuximab'ın hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. DiFi hücreleri Cetuximab'a karşı güçlü yanıt verirken diğer hücreler artan doza bağlı olarak değişken profiller sergilemiştir. Çalışmamızda kullanılan Caco-2 ve HT-29 hücrelerinden alınan sonuçlar ise çok benzerlik göstermiş, HT-29 hücreleri üzerinde hiç etkinlik gözlenmezken, Caco-2 hücrelerinde 100 µg/ml dozda yaklaşık %20 oranında inhibisyon görülmüştür (190). Narvi ve arkadaşları da Cetuximab'ın Caco-2 ve HT-29 hücre hatları üzerindeki etkin doz miktarını >100 µg/ml olarak bildirmişlerdir (191). Çalışmamızda da sonuçlar benzerdir. Daha hassas ve yüksek işlem kapasiteli hücre canlılık ölçümü için xCELLİgence gerçek zamanlı hücre analiz platformunda Caco-2 hücreleri üzerinde CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Gerçek zamanlı ölçüm sonucunda da artan doza bağlı olarak hücre bölünmesi her iki antikor tarafından yavaşlatılmış, CC4-B3-G3-H10 antikoru Cetuximab'a kıyasla daha yüksek oranda inhibisyon etkisi göstermiştir (Şekil 5.43.). Meme kanseri hücre hatları üzerindeki analizlerde ise MDA-MB-468 hücre hattı üzerinde 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab antikorları sırasıyla %14 ve %17 oranında hücre bölünmesini inhibe ederken, MDA-MB-231 hücreleri üzerinde ise etkinlik gözlenmemiştir. Bu hücre hatları ile yapılmış daha önceki çalışmalarda; El Guerrab ve arkadaşlarının 0-200 µg/ml doz aralığında Cetuximab ve ayrıca Panitumumab uygulamaları sonucu MDA-MB-468 hücre hattında %20 dolaylarında inhibisyon etkisi gözlenirken, MDA-MB-231 hücre hattında ise hiç etkinlik görülmemiştir (192). Çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-468 de gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde Caco-2 ile aynı deney kurgusu ile incelenmiş, WST-1 hücre analiz sonuçları doğrulanarak CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab arasında anlamlı farklılık görülmemiş ve her iki antikor da benzer düzeylerde büyüme eğrileri çizmiştir. Gürdal ve arkadaşlarının MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatları üzerinde Cetuximab uygulamasının gerçek zamanlı analizinde de benzer olarak MDA-MB-231 hücre hattında duyarlılık gözlenmezken, MDA-MB-468 hücre hattında %15 hücresel inhibisyon gözlenmiştir (193). Kolon ve meme kanserleri dışında çalışmamızda HeLa serviks kanseri hücreleri de kullanılmış, her iki antikorda da

etki gözlenmemiş, gözlenmeyen etkinin tekrar doğrulanması için HeLa hücreleri de gerçek zamanlı analiz sisteminde izlenmiş ve farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlarla deney sistemlerimiz literatürle uyumluluk gösterirken, CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab antikorlarının çalışma setindeki hücrelerden aldıkları yanıtların, benzer direnç mekanizmalarından kaynaklandığı ortaya çıkmıştır. Kanser hücrelerinde kazanılmış direncin geliştirilmesinden sorumlu çeşitli mekanizmalar, EGFR gen mutasyonları, diğer reseptörler tirozin kinazların aktivasyonu veya KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, MEK veya ERK gibi EGFR'ye bağlı hücre içi sinyal yollarını kodlayan genlerdeki mutasyonlar olarak açıklanmıştır. Bu gözlemler, özgün epitoplarla EGFR'nü hedefleyen, standart anti-EGFR ilaçlarından daha verimli olan ve potansiyel olarak edinilmiş direncin üstesinden gelebilen monoklonal antikor kombinasyonları da dahil olmak üzere yeni yaklaşımların tasarlanmasını ve geliştirilmesini sağlamıştır (194). Çalışmamız temelinde de EGFR'nün dimerizasyon alanına özgü geliştirilen CC4-B3-G3-H10 antikoru gerekli aşamaları geçtiği takdirde bu yaklaşımlar için yenilikçi bir araç olabilir. Örneğin klinik süreçlerde; EGFR hedefli monoklonal antikorlar Cetuximab ve Panitumumab, sırasıyla FOLFIRI ve FOLFOX ile kombinasyon halinde verildiğinde KRAS(-) metastatik kolorektal kanser hastalarında önemli bir sağkalım artışı göstermiştir. KRAS(-) metastatik kolorektal kanserde, FOLFIRI'ye Cetuximab ve FOLFOX'a Panitumumab eklenmesi, tek başına kemoterapi ile sırasıyla 19,5 ay ve 20,2 ay yerine ortalama 23,5 ay ve 25,8 ay sağkalım sağlamıştır (195). Yalnızca son bir yılda FDA tarafından hematoloji/onkoloji alanında onaylanan veya desteklenen tedavi protokollerine bakıldığında dahi, kombinasyonel tedavilerin öne çıktığı görülmektedir (196).

EGFR; çoğalma, invazyon, migrasyon ve farklılaşma gibi çeşitli hücresel işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bir ligandın EGFR'ne bağlanması dimerizasyona, ardından EGFR'nün otofosforilasyonuna ve alt sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur. EGFR'nün aktivasyonu, gen transkripsiyonu ve biyolojik bir yanıt ile sonuçlanan hücre içinde çoklu sinyalleme kaskadlarını tetikler. Liganddan bağımsız yabanıl tip EGFR aşırı ekspresyonunun tirozin fosforilasyonuna ve EGFR'nün konstitütif bir aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bu durum genellikle, EGFR'nü aktive edici gen mutasyonları olduğunda meydana gelir. Bu mutasyonlar, yapısal olarak aktif bir protein (EGFR^{vIII}) oluşturmak için EGFR hücre içi alanında veya EGFR hücre dışı alanında meydana gelebilir. Ligand olmadan da yabanıl tip EGFR'nün aşırı ekspresyonu, EGFR

fosforilasyonuna ve kanonik olmayan bir sinyal formunun aktivasyonuna yol açabilir. Özetle, EGFR ligand bağımlı veya bağımsız olmak üzere onkogenik aktivasyon gösterebilmektedir (197). Çalışmamızda CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR monoklonal antikorunun EGFR ve diğer ErbB aile üyeleri üzerindeki alt sinyal yollarını etkileyen aminoasitlere olan etkisi multipleks bir EGFR fosforilasyon array sistemi kullanılarak araştırılmıştır. EGFR hem homodimer oluşturarak hem de diğer ErbB aile üyeleri ile heterodimer oluşturarak aktivite gösterdiğinden, 4 ayrı ErbB aile üyesine ait 17 ayrı aminoasit hedefinin fosfo-protein ifade seviyelerinin değişimi tek membran üzerinde okunabilmiştir. İki ana kurguda kurulan deney sisteminden ilkinde, CC4-B3-G3-H10 ve Cetuximab antikorlarının Caco-2 hücreleri üzerinde endojen olarak fosforile olan aminoasitlere olan etkileri araştırılmıştır (Şekil 5.46.). İkinci grupta ise hücrelere EGF uygulaması ile ligand overekspresyonu sağlanarak antikorların etkinlikleri araştırılmıştır (Şekil 5.47.).

Kontrol grubu Caco-2 hücrelerinde EGFR (Tyr845), ErbB2 (Tyr1112) ve ErbB2 (Ser1113) aminositleri endojen olarak fosforile halde bulunmuştur. Hücrelere 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 veya Cetuximab uygulaması EGFR (Tyr845) ve ErbB2 (Tyr1112) aminoasit ifadelerini anlamlı düzeyde inhibe etmiştir. ErbB2 (Ser1113) düzeyinde ise anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Her iki antikorda kontrol hücre gurubunda eksprese olmayan ErbB2 (Tyr877) fosforilasyonuna neden olmuştur. Ayrıca her iki antikor total EGFR seviyesini değiştirmezken, total ErbB2 ve ErbB3 seviyelerini anlamlı derecede artırmıştır. EGFR ligandı EGF'in hücrelere uygulanmasıyla EGFR (Tyr845) ve ErbB2 (Tyr1112) aminoasitlerinin ifadesi yaklaşık iki katlık artış göstermiş, ErbB2 (Ser1113) ve ErbB2 (Tyr877) seviyeleri de anlamlı düzeyde artmıştır. EGF overeksprese hücrelere 100 µg/ml CC4-B3-G3-H10 veya Cetuximab uygulaması sonrasında ise; Cetuximab EGFR (Tyr845) ve ErbB2 (Tyr1112) ifadelerini anlamlı derecede inhibe ederken, CC4-B3-G3-H10 antikoru ise beklendiği üzere etkinlik göstermemiştir. Fakat ErbB2 (Ser1113) düzeyini ise anlamlı derecede inhibe etmiştir. Bu sonuçlarla; CC4-B3-G3-H10 antikorunun endojen fosforilasyonları inhibe etmesi ve EGF overekspresyonu durumunda etkinlik göstermemesini, antikorun dimerizasyon bölgesine spesifik olup, doğrudan dimerizasyonu engelleyerek işlev göreceği hipotezimizi desteklemektedir. Yüksek miktarda EGF varlığında antikor ligand bağlanma bölgesine hedeflenmediği için etkinlik göstermemiştir. Antikorların aminoasit fosforilasyonları üzerindeki kinetiklerinin belirlenmesi bu

aminoasitlerin tetiklediği mekanizmaların ve etkilenen hedef genlerin belirlenmesi için çok önemlidir. Çalışmamızdaki EGFR fosforilasyon analizlerinde değişim gösteren EGFR (Tyr845), ErbB2 (Tyr1112), ErbB2 (Ser1113) ve ErbB2 (Tyr877) mekanistikleri incelenerek değerli çıkarımlar elde edilebilir.

HücreSEL Src, EGFR dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörü reseptörlerinden yayılan transmembran sinyallerin yardımcı transdüseri olarak işlev görür (198). EGFR ve c-Src'nin insan epitel hücreleri başta üzere çeşitli model sistemlerde fonksiyonel olarak etkileşime girdiği gösterilmiştir. Spesifik olarak, EGFR ve c-Src'nin ektopik ekspresyonu, proliferasyon, transformasyon ve tümör oluşumunda sinerjistik artışlarla sonuçlanmaktadır. Bu durumun sinerjistik koşullar altında EGFR'nin hücre içi alanındaki 845 ve 1101 tirozinleri fosforilasyonları ile gerçekleştiği gösterilmiştir. EGFR tirozin 845, EGFR'nin kinaz alanının aktivasyon döngüsü içerisindeki konumu nedeniyle özellikle ilginçtir. Bu tirozin, diğer tirozin kinazların kinaz bölgelerinde bulunan ve bunların aktivasyonları için kritik olduğu gösterilen, otofosforillenmiş tirozinlere oldukça homologtur. Fakat, diğer kinazlardaki tirozinlerin aksine, EGFR tirozin 845 bir otofosforilasyon bölgesi değildir ve kinazın aktif olması için tirozin fosforile edilmesine gerek yoktur. Bunun yerine, EGFR tirozin 845'in fosforilasyonu, Src'nin doğrudan bir substratıdır (199–202). Ne EGFR'nün kinaz aktivitesinin uyarılmasının ne de hücre dışı ERK/MAPK aktivasyonunun, Y845F mutantının ekspresyonundan etkilenmediği, bilinmeyen, kanonik olmayan bir sinyalleme ortaya çıktığını göstermiştir. Tyr 845 fosforilasyonu, EGFR transaktivasyonu yoluyla; moleküler fonksiyonunun, DNA sentezinin ve kanser hücre proliferasyonunun değiştirilmesine neden olmaktadır. Öte yandan STAT gen ailesinin, EGFR ve Src'nin Tyr 845 fosforilasyonuna bağımlı sinerjisinin olası bir aracısı olduğu gösterilmiştir (203,204). Çoğunlukla ligand bağımsız transaktive olan Tyr845 fosforilasyonu aynı zamanda pek çok EGFR terapötiklerine karşı dirençten de sorumludur (203). Çalışmamız fosforilasyon array analizlerinde CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikorunun Caco-2 hücrelerinde endojen olarak fosforile olan EGFR Tyr845 fosforilasyonunu anlamlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Böylelikle; CC4-B3-G3-H10 EGFR-cSrc kompleks oluşumunu engelleyerek EGFR transaktivasyonunu engelleyebileceği düşünülebilir. Çalışmamızda CC4-B3-G3-H10 ile aynı düzeyde etkinliği Cetuximab da göstermiştir. Fakat Lu ve arkadaşlarının çalışmasında kolon kanseri hücrelerinde Cetuximab'a karşı gelişen direncin, Src ve Tyr 845 fosforilasyonunun

bağımsız inhibisyonu tersine döndüğü gösterilmiştir (205). Böylelikle CC4-B3-G3-H10, Tyr 845 fosforilasyonu kaynaklı anti-EGFR monoklonal antikorları ve tirozin kinaz inhibitörlerine karşı gelişen ilaç dirençlerinde kombinasyonel olarak hassasiyet sağlayabilir.

Diğer ErbB ailesi üyelerinin aksine, ErbB2 bilinen ligandlara doğrudan bağlanmaz. Bunun yerine, ErbB2 aracılı sinyal yollarının aktivasyonu, EGFR veya ErbB3 ile heterodimerizasyon veya yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduğunda homodimerizasyon yoluyla meydana gelir. ErbB2'nin aşırı ekspresyonu, öncelikle ErbB2 gen amplifikasyonuna atfedilir ve ErbB2 sinyalleme ağının konstitütif aktivasyonu ile sonuçlanır (206). Her ErbB reseptörü, çeşitli alt sinyal proteinleri için farklı bağlanma afiniteleri sergiler. EGFR ve ErbB2 tercihen hücre proliferasyonuna yol açan Ras-Raf-MEK-Erk1/2 yolunu aktive ederken, HER3 hücre sağ kalımına yol açan PI3K-Akt-mTOR yolunu aktive eder. Çeşitli ErbB reseptörleri arasındaki heterodimerizasyon, hücre sinyallemesinde esnek ve karmaşık bir rol oynamalarına izin verir (207). Çalışmamız fosforilasyon array verilerinden alınan sonuçlarda; Caco-2 hücrelerinde endojen olarak ErbB2 ve ErbB3 ekspresyonu olduğu görülmektedir. ErbB2 (Tyr1112) ve ErbB2 (Ser1113) ise fosforile olan amino asitler olarak bulunmuştur. Bu iki fosforilasyon fenotipi ErbB2'nin homodimerizasyonu veya EGFR veya ErbB3 ile heterodimerizasyonundan kaynaklandığı gözlenmektedir. Total ErbB2 seviyesinin düşük olması (EGFR'den 4,73 kat ve ErbB3'ten 2,85 kat) heterodimerizasyon durumunu öne çıkarmaktadır. Caco-2 hücrelerine CC4-B3-G3-H10 veya Cetuximab uygulamaları sonrasında hem total ErbB2 hem de ErbB2 (Tyr1112) seviyeleri anlamlı olarak düşmüştür. Her iki antikorun da heterodimerizasyonu engelleyerek ErbB2 ve bağlı fosforilasyon aktivitesini engellediği gözlenmiştir. ErbB2 (Tyr1112)'nin kinaz alanı yakınında fosforilasyonu, ErbB2'nin c-Cbl E3 ligaz ile etkileşimi yoluyla ubiquitinasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bir anti-ErbB2 monoklonal antikoru olan Trastuzumab'ın da ubiquitin ligaz c-Cbl aktivitesini artırarak reseptör internalizasyonu ve degradasyonuna neden olarak işlev gösterdiği bilinmektedir (208). Böylelikle ErbB2 (Tyr1112) fosforilasyonunu inhibe eden anti-EGFR antikorlar, bilinen ErbB2 direnç mekanizmalarını aşmak için bir alternatif olabilir. Ligand (EGF) overekspresyonu durumunda ise Cetuximab ligand bağımlı dimerizasyonu engellediği için ErbB2 (Tyr1112) fosforilasyonunu inhibe etmiş, CC4-B3-G3-H10 ise beklendiği üzere aynı etkiyi göstermemiştir. Bu durumun yüksek ligand

varlığında artan dimerizasyon gücünden kaynaklanabileceği ihtimali yüksektir. Fakat yinede, ligand overekspresyonu olmayan durumlarda gözlenen inhibisyon da oldukça umut vericidir. Antikor uygulamaları ile az da olsa fosforilasyon düzeyi artış gösteren ErbB2 (Tyr877) ise; C-src tarafından kinaz alanının aktivasyon döngüsü içinde fosforile edilerek ErbB2'nin kinaz aktivitesini artırdığı bildirilmiştir. C-Src ayrıca ErbB2-ErbB3 heterodimerizasyonunu artırarak bunların oto ve transfosforilasyonlarını ve sinyal aktivitelerini de arttırır (209,210). Artan ErbB2 (Tyr877) seviyelerinin de hem CC4-B3-G3-H10 hem de Cetuximab uygulamaları ile seviyesi artan total ErbB3 aktivitesinden kaynaklandığını düşünüyoruz.

EGFR yapısındaki son alan kalsiyum/kalmodulin bağımlı kinaz II (CamKII) bölgesine benzer; bu veya buna benzer bölgelerin serin fosforilasyonu; büyüme faktörleri, biyoaktif lipitler veya serin-treonin fosfataz inhibisyonu ile indüklenmektedir. ErbB2 (Ser1113) fosforilasyonundan sorumlu olan akış net değildir. Fakat; Ouyang ve arkadaşlarının çalışmalarında, yabancı tip ErbB2 ifadesine sahip hücrelerin büyüme faktörü uyarımıyla Ser1113 fosforile forma geldiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada ErbB2 pozitif olan 65 meme kanseri hastasının örneklerinde Ser1113 fosforilasyonu ve EGFR overekspresyonu arasında oldukça anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya konulmuştur. Bu durumun kötü prognoz ile sonuçlandığı da belirtilmiştir (211). Çalışmamız EGFR fosforilasyon array analizlerinde de Caco-2 hücrelerinin endojen olarak ErbB2 (Ser1113) fosforilasyonuna sahip olduğu fakat EGF uygulamasıyla bu aminoasit fosforilasyonunun arttığı (1,38 kat) gözlenmiştir. Büyüme faktörü uyarımı olmayan hücrelerde CC4-B3-G3-H10 veya Cetuximab antikorları ErbB2 (Ser1113) fosforilasyonu üzerinde etki göstermezken, EGF ile artan fosforilasyonu her iki antikorda anlamlı şekilde inhibe etmiştir (CC4-B3-G3-H10 3,46 kat, Cetuximab 1,43 kat). Sonuç olarak, *in vitro* verilerle ve dinamik bir test sisteminden elde edilen EGFR fosforilasyon analiz sonuçları oldukça değerli olmakla birlikte, tarafımızca öncül veriler olarak kabul edilmektedir. Verilerimizin ileri çalışmalar için daha çeşitli kanser hücre hatları ve uygulamalarına önemli temeller sağlama potansiyeli yüksektir.

6.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında hibridoma teknolojisi ile Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü dimerizasyon bölgesine spesifik anti-EGFR CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru

geliştirilmiştir. Antikoru karakterizasyonu, validasyonu ve etkinliği belirlenmiştir. CC4-B3-G3-H10 monoklonal antikoru üretici stabil ana hücre hatları özgün ve etkin bir “biyoteknolojik ürün” olarak çok sayıda stoklanmıştır.

CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR monoklonal antikoru Ankara Üniversitesi Rektörlüğü tarafından ulusal ve uluslararası patentleme süreçlerinde desteklenmiş olup, Ankara Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi aracılığıyla patent başvuruları gerçekleştirilmiştir.

CC4-B3-G3-H10 anti-EGFR monoklonal antikoru mevcut haliyle araştırma ve tanı alanlarında antikor temelli pek çok test ile kullanılabilecek değerli bir üründür. Biyoteknoloji endüstrisi için yerli, uluslararası rekabete ve gelişime açık bir kaynak konumundadır. Ayrıca bu yönü ile ciddi ekonomik potansiyele sahiptir.

Bu çalışmadan elde edilen veriler ve oluşturulan temeller, CC4-B3-G3-H10 antikorusunun daha ileri seviyelere taşınabilmesine olanak sağlamaktadır. Antikoru epitop haritalaması, *in vivo* etkinlik testleri, nötralizan etkisinin test edilmesi ve insansılaştırma çalışmaları tamamlandığı takdirde klinik deneme çalışmalarına aday olma potansiyeli oldukça yüksektir.

KAYNAKLAR

1. DeVita VT, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* 2008;68(21):8643–53.
2. Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature.* 2004;432(7015):294–7.
3. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev cancer.* 2012;12(4):237–51.
4. Gajewski TF, Woo S-R, Zha Y, Spaapen R, Zheng Y, Corrales L, vd. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(2):268–76.
5. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):265–77.
6. Bluestone JA, Tang Q. Immunotherapy: making the case for precision medicine. American Association for the Advancement of Science; 2015.
7. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2):S21–6.
8. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, vd. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 2006;366(1):2–16.
9. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* 2008;358(11):1160–74.
10. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 2001;37:9–15.
11. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16(1):15–31.

12. Ercan D, Choi HG, Yun C-H, Capelletti M, Xie T, Eck MJ, vd. EGFR mutations and resistance to irreversible pyrimidine-based EGFR inhibitors. *Clin cancer Res.* 2015;21(17):3913–23.
13. Huang L, Fu L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(5):390–401.
14. Bell DW, Gore I, Okimoto RA, Godin-Heymann N, Sordella R, Mulloy R, vd. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet.* 2005;37(12):1315–6.
15. Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol.* 2009;158(1):1–9.
16. Schiller JH. Anti-EGFR monoclonal antibodies in lung cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2015;7(16):738–9.
17. Ribatti D. From the discovery of monoclonal antibodies to their therapeutic application: An historical reappraisal. *Immunol Lett.* 2014;161(1):96–9.
18. Abbas Z, Rehman S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. İçinde: *Neoplasm.* INTECHOPEN LIMITED London; 2018.
19. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57–70.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
21. Stafman LL, Beierle EA. Cell proliferation in neuroblastoma. *Cancers (Basel).* 2016;8(1):13.
22. Ghysdael J. Growth Factor Receptors as Proto Oncogenes or Oncogene Products. *Malig Cell Secret.* 2019;33–44.
23. Piccolo SR, Frey LJ. Somatic mutation signatures of cancer. İçinde: *AMIA Annual Symposium Proceedings.* American Medical Informatics Association; 2008. s. 202.

24. Little P, Lin D-Y, Sun W. Associating somatic mutations to clinical outcomes: a pan-cancer study of survival time. *Genome Med.* 2019;11(1):1–15.
25. Kuijjer ML, Paulson JN, Salzman P, Ding W, Quackenbush J. Cancer subtype identification using somatic mutation data. *Br J Cancer.* 2018;118(11):1492–501.
26. Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu H-Y, Lin L-T, vd. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. İçinde: *Seminars in cancer biology.* Elsevier; 2015. s. S78–103.
27. Burikhanov R, Shrestha-Bhattarai T, Qiu S, Shukla N, Hebbar N, Lele SM, vd. Novel mechanism of apoptosis resistance in cancer mediated by extracellular PAR-4. *Cancer Res.* 2013;73(2):1011–9.
28. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J cancer.* 2009;124(3):511–5.
29. Green DR. Cancer and apoptosis: Who is built to last? *Cancer Cell.* 2017;31(1):2–4.
30. Rajabi M, Mousa SA. The role of angiogenesis in cancer treatment. *Biomedicines.* 2017;5(2):34.
31. Zuazo-Gaztelu I, Casanovas O. Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Frontiers in Oncology.* 2018.
32. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management.* 2006.
33. Lee S, Lee JS. Cellular senescence: A promising strategy for cancer therapy. *BMB Reports.* 2019.
34. Lee S, Schmitt CA. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology.* 2019.
35. Yaswen P, MacKenzie KL, Keith WN, Hentosh P, Rodier F, Zhu J, vd. Therapeutic targeting of replicative immortality. *Seminars in Cancer Biology.* 2015.
36. Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: The

telomerase/telomere pathway. *Clinical Cancer Research*. 2007.

37. Meirson T, Gil-Henn H, Samson AO. Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. *Oncogene*. 2020.
38. Stuelten CH, Parent CA, Montell DJ. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(5):296–312.
39. Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis. *Int J Oncol*. 2009;34(4):881–95.
40. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, vd. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. İçinde: *Seminars in cancer biology*. Elsevier; 2015. s. S244–75.
41. Amin ARM, Karpowicz PA, Carey TE, Arbiser J, Nahta R, Chen ZG, vd. Evasion of anti-growth signaling: a key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds. İçinde: *Seminars in cancer biology*. Elsevier; 2015. s. S55–77.
42. Wang L-H, Wu C-F, Rajasekaran N, Shin YK. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: An overview. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(6):2647–93.
43. Rahman N, Scott RH. Cancer genes associated with phenotypes in monoallelic and biallelic mutation carriers: new lessons from old players. *Hum Mol Genet*. 2007;16(R1):R60–6.
44. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*. 2016;279(6):541–62.
45. Bates JP, Derakhshandeh R, Jones L, Webb TJ. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer*. 2018;18(1):556.

46. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, vd. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. İçinde: *Seminars in cancer biology*. Elsevier; 2015. s. S185–98.
47. Lu B, Yang M, Wang Q. Interleukin-33 in tumorigenesis, tumor immune evasion, and cancer immunotherapy. *J Mol Med*. 2016;94(5):535–43.
48. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1167–74.
49. Zhang Y, Yang J-M. Altered energy metabolism in cancer: a unique opportunity for therapeutic intervention. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(2):81–9.
50. Dell’Antone P. Energy metabolism in cancer cells: how to explain the Warburg and Crabtree effects? *Med Hypotheses*. 2012;79(3):388–92.
51. Kim S-Y. Cancer energy metabolism: shutting power off cancer factory. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018;26(1):39.
52. Faubert B, Li KY, Cai L, Hensley CT, Kim J, Zacharias LG, vd. Lactate metabolism in human lung tumors. *Cell*. 2017;171(2):358–71.
53. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*. 2008;134(5):703–7.
54. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, vd. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459–544.
55. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.
56. Dagenais GR, Leong DP, Rangarajan S, Lanas F, Lopez-Jaramillo P, Gupta R, vd. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged

- adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10226):785–94.
57. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;
 58. GLOBOCAN 2018. Turkey Cancer Statistics [Internet]. 2018 [kaynak 23 Haziran 2020]. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>
 59. Pucci C, Martinelli C, Ciofani G. Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedalscience*. 2019;13.
 60. Hosseinzadeh E, Banaee N, Ali Nedaie H. Cancer and Treatment Modalities. *Curr Cancer Ther Rev*. 2017;13(1):17–27.
 61. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L. Current challenges in cancer treatment. *Clin Ther*. 2016;38(7):1551–66.
 62. Wyld L, Audisio RA, Poston GJ. The evolution of cancer surgery and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(2):115.
 63. Schirrmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *Int J Oncol*. 2019;54(2):407–19.
 64. Zheng Y, Yang H, Wang H, Kang K, Zhang W, Ma G, vd. Fluorescence-guided surgery in cancer treatment: current status and future perspectives. *Ann Transl Med*. 2019;7(Suppl 1).
 65. Zhao E-H, Ling T, Cao H. Current status of surgical treatment of gastric cancer in the era of minimally invasive surgery in China: Opportunity and challenge. *Int J Surg*. 2016;28:45–50.
 66. Camphausen KA, Coia LR. Principles of radiation therapy. *Brachytherapy*. 2009;
 67. Martino S, Odle T. Advanced practice in radiation therapy. *Radiat Ther J Radiat Oncol Sci*. 2007;16(2):155–62.

68. Alam A, Farooq U, Singh R, Dubey VP, Kumar S, Kumari R, vd. Chemotherapy treatment and strategy schemes: a Review. *J Toxicol*. 2018;2(7).
69. A Baudino T. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Curr Drug Discov Technol*. 2015;12(1):3–20.
70. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):59–73.
71. Galmarini D, Galmarini CM, Galmarini FC. Cancer chemotherapy: a critical analysis of its 60 years of history. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;84(2):181–99.
72. Huang C-Y, Ju D-T, Chang C-F, Reddy PM, Velmurugan BK. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. *Biomedicine*. 2017;7(4).
73. Seebacher NA, Stacy AE, Porter GM, Merlot AM. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):156.
74. Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol*. 2018;834:188–96.
75. Knowledge Base for Precision Oncology [Internet]. [kaynak 23 Haziran 2020]. Available at: <https://pct.mdanderson.org/>
76. Hojjat-Farsangi M. Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies. *Int J Mol Sci*. 2014;15(8):13768–801.
77. Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q, Wang Y. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer*. 2018;17(1):1–12.
78. Ren H. Tyrosine Kinases as Druggable Targets in Cancer. 2019;
79. Metibemu DS, Akinloye OA, Akamo AJ, Ojo DA, Okeowo OT, Omotuyi IO. Exploring receptor tyrosine kinases-inhibitors in Cancer treatments. *Egypt J Med Hum Genet*. 2019;20(1):1–16.

80. Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase–role and significance in cancer. *Int J Med Sci.* 2004;1(2):101.
81. Ho VWT, Tan HY, Wang N, Feng Y. Cancer Management by Tyrosine Kinase Inhibitors: Efficacy, Limitation, and Future Strategies. İçinde: *Tyrosine Kinases as Druggable Targets in Cancer.* IntechOpen; 2019.
82. Hartmann JT, Haap M, Kopp H-G, Lipp H-P. Tyrosine kinase inhibitors-a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab.* 2009;10(5):470–81.
83. Araki T, Yashima H, Shimizu K, Aomori T, Hashita T, Kaira K, vd. Review of the treatment of non-small cell lung cancer with gefitinib. *Clin Med Insights Oncol.* 2012;6:CMO-S7340.
84. Wirth T, Ylä-Herttuala S. Gene therapy used in cancer treatment. *Biomedicines.* 2014;2(2):149–62.
85. Amer MH. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Mol Cell Ther.* 2014;2(1):27.
86. Das SK, Menezes ME, Bhatia S, Wang X, Emdad L, Sarkar D, vd. Gene therapies for cancer: strategies, challenges and successes. *J Cell Physiol.* 2015;230(2):259–71.
87. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;93:52–79.
88. Senapati S, Mahanta AK, Kumar S, Maiti P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduct Target Ther.* 2018;3(1):1–19.
89. Disis ML. Mechanism of action of immunotherapy. İçinde: *Seminars in oncology.* Elsevier; 2014. s. S3–13.
90. Nouri RF, Shirkhoda M, Memari F, Dana H, Mahmoodi CG, Mahmoodzadeh H, vd. Immunotherapy a New Hope for Cancer Treatment: A Review. *Pak J Biol Sci.*

2018;21(3):135.

91. Koo SL, Wang WW, Toh HC. Cancer immunotherapy—the target is precisely on the cancer and also not. *Ann Acad Med Singapore*. 2018;47:381–7.
92. Pham T, Roth S, Kong J, Guerra G, Narasimhan V, Pereira L, vd. An update on immunotherapy for solid tumors: a review. *Ann Surg Oncol*. 2018;25(11):3404–12.
93. The 2018 Nobel Prize in Physiology or Medicine - Press release - NobelPrize.org [Internet]. [kaynak 23 Haziran 2020]. Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/press-release/>
94. Oiseth SJ, Aziz MS. Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead. *J Cancer Metastasis Treat*. 2017;3(10):250–61.
95. Rohaan MW, Wilgenhof S, Haanen JBAG. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch*. 2019;474(4):449–61.
96. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, Etxeberria I, Aznar MA, Pérez-Gracia JL, vd. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2019;120(1):6–15.
97. Velcheti V, Schalper K. Basic overview of current immunotherapy approaches in cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2016;36:298–308.
98. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang X-Y. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. İçinde: *Advances in cancer research*. Elsevier; 2013. s. 421–75.
99. Mougél A, Terme M, Tanchot C. Therapeutic cancer vaccine and combinations with antiangiogenic therapies and immune checkpoint blockade. *Front Immunol*. 2019;10:467.
100. Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ vaccines*. 2019;4(1):1–10.
101. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The intriguing history of cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10:2965.

102. Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *J Cancer*. 2018;9(10):1773.
103. Chiocca EA, Rabkin SD. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(4):295–300.
104. Raja J, Ludwig JM, Gettinger SN, Schalper KA, Kim HS. Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *J Immunother cancer*. 2018;6(1):140.
105. Pol J, Kroemer G, Galluzzi L. First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. Taylor & Francis; 2016.
106. Bridle BW, Stephenson KB, Boudreau JE, Koshy S, Kazdhan N, Pullenayegum E, vd. Potentiating cancer immunotherapy using an oncolytic virus. *Mol Ther*. 2010;18(8):1430–9.
107. Guo ZS, Thorne SH, Bartlett DL. Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Reviews Cancer*. 2008;1785(2):217–31.
108. Mahmuda A, Bande F, Al-Zihiry KJK, Abdulhaleem N, Abd Majid R, Hamat RA, vd. Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects. *Trop J Pharm Res*. 2017;16(3):713–22.
109. Buss NAPS, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, De Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(5):615–22.
110. Steinitz M. Three decades of human monoclonal antibodies: past, present and future developments. *Hum Antibodies*. 2009;18(1–2):1–10.
111. Posner J, Barrington P, Brier T, Datta-Mannan A. Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future. *Concepts Princ Pharmacol 100 Years Handb Exp Pharmacol*. 2019;81–141.
112. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-J, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J, vd. Development of

- therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27(1):1–30.
113. Waldmann TA. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science* (80-). 1991;252(5013):1657–62.
 114. Chakhtoura M, Abdelnoor AM. Monoclonal antibodies used as prophylactic, therapeutic and diagnostic agents. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2010;32(4):533–42.
 115. Gao Y, Huang X, Zhu Y, Lv Z. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *J Immunoass Immunochem.* 2018;39(4):351–64.
 116. Moorthy BS, Xie B, Moussa EM, Iyer LK, Chandrasekhar S, Panchal JP, vd. Structure of monoclonal antibodies. İçinde: *Biobetters*. Springer; 2015. s. 81–9.
 117. Saeed A, Awan SA. Advances in monoclonal antibodies production and cancer therapy. *MOJ Immunol.* 2016;3(4):99.
 118. Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, Astier A, Sautou V. Physicochemical stability of monoclonal antibodies: a review. *J Pharm Sci.* 2020;109(1):169–90.
 119. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *CPT pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2017;6(9):576–88.
 120. van der Burgt YEM, Kilgour DPA, Tsybin YO, Srzentić K, Fornelli L, Beck A, vd. Structural analysis of monoclonal antibodies by ultrahigh resolution MALDI in-source decay FT-ICR mass spectrometry. *Anal Chem.* 2018;91(3):2079–85.
 121. Golay J, Introna M. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. *Arch Biochem Biophys.* 2012;526(2):146–53.
 122. Strohl WR, Strohl LM. Therapeutic antibody engineering: current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry. Elsevier; 2012.

123. Weiner GJ. Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunol Res.* 2007;39(1–3):271–8.
124. Zhou Y, Marks JD. Mechanism of Action for Therapeutic Antibodies. *Biosimilars Monoclon Antibodies A Pract Guid to Manuf Preclin Clin Dev* Hoboken, NJ Wiley. 2016;85–111.
125. Nigro C Lo, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med.* 2019;7(5).
126. Zahavi D, AlDeghaither D, O’Connell A, Weiner LM. Enhancing antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a strategy for improving antibody-based immunotherapy. *Antib Ther.* 2018;1(1):7–12.
127. Li Y, Liu PC, Shen Y, Snavely MD, Hiraga K. A cell-based internalization and degradation assay with an activatable fluorescence–quencher probe as a tool for functional antibody screening. *J Biomol Screen.* 2015;20(7):869–75.
128. Belleudi F, Marra E, Mazzetta F, Fattore L, Giovagnoli MR, Mancini R, vd. Monoclonal antibody-induced ErbB3 receptor internalization and degradation inhibits growth and migration of human melanoma cells. *Cell Cycle.* 2012;11(7):1455–67.
129. Henriksen L, Grandal MV, Knudsen SLJ, van Deurs B, Grøvdal LM. Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands. *PLoS One.* 2013;8(3):e58148.
130. Carvalho LS, da Silva OB, de Almeida GC, de Oliveira JD, Parachin NS, Carmo TS. Production Processes for Monoclonal Antibodies. *Ferment Process.* 2017;182–98.
131. Pandey S. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. *Hybridoma.* 2010;1(2):17.
132. Tomita M, Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production.

- Immunotherapy. 2011;3(3):371–80.
133. Listek M, Hönow A, Gossen M, Hanack K. A novel selection strategy for antibody producing hybridoma cells based on a new transgenic fusion cell line. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–12.
 134. Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Hum Vaccin Immunother.* 2012;8(12):1817–28.
 135. Liu JKH. The history of monoclonal antibody development—progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg.* 2014;3(4):113–6.
 136. Brüggemann M, Osborn MJ, Ma B, Hayre J, Avis S, Lundstrom B, vd. Human antibody production in transgenic animals. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2015;63(2):101–8.
 137. Mompó SM, González-Fernández Á. Antigen-specific human monoclonal antibodies from transgenic mice. *Içinde: Human Monoclonal Antibodies.* Springer; 2014. s. 245–76.
 138. Tiller T. Single B cell antibody technologies. *N Biotechnol.* 2011;28(5):453–7.
 139. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *Içinde: MAb.* Taylor & Francis; 2015. s. 9–14.
 140. Grilo AL, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends Biotechnol.* 2019;37(1):9–16.
 141. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM. Antibodies to watch in 2020. *Içinde: MAb.* Taylor & Francis; 2020. s. 1703531.
 142. Kovacs E, Zorn JA, Huang Y, Barros T, Kuriyan J. A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor. *Annu Rev Biochem.* 2015;84:739–64.
 143. Rowinsky EK. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer

- and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Med.* 2004;55:433–57.
144. Tebbutt N, Pedersen MW, Johns TG. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(9):663–73.
 145. Appert-Collin A, Hubert P, Crémel G, Bennasroune A. Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion. *Front Pharmacol.* 2015;6:283.
 146. Roskoski Jr R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res.* 2014;79:34–74.
 147. Chen J, Zeng F, Forrester SJ, Eguchi S, Zhang M-Z, Harris RC. Expression and function of the epidermal growth factor receptor in physiology and disease. *Physiol Rev.* 2016;96(3):1025–69.
 148. EGFR Gene - GeneCards | EGFR Protein | EGFR Antibody [Internet]. [kaynak 23 Haziran 2020]. Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EGFR&keywords=EGFR>
 149. Lee NY, Hazlett TL, Koland JG. Structure and dynamics of the epidermal growth factor receptor C-terminal phosphorylation domain. *Protein Sci.* 2006;15(5):1142–52.
 150. Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez R, Morgado-Pascual JL, Valentijn F, Valdivielso JM, Goldschmeding R, vd. Role of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and its ligands in kidney inflammation and damage. *Mediators Inflamm.* 2018;2018.
 151. Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel).* 2017;9(5):52.
 152. van Bueren JJL, Bleeker WK, Brännström A, von Euler A, Jansson M, Peipp M, vd. The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra-and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(16):6109–14.

153. You B, Chen EX. Anti-EGFR monoclonal antibodies for treatment of colorectal cancers: development of cetuximab and panitumumab. *J Clin Pharmacol.* 2012;52(2):128–55.
154. Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(9):777–92.
155. Gerber DE. EGFR inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer. *Drug Dev Res.* 2008;69(6):359–72.
156. Noor ZS, Goldman JW. EGFR Targeted Therapy. İçinde: *Targeted Therapies for Lung Cancer.* Springer; 2019. s. 1–30.
157. Ayati A, Moghimi S, Salarinejad S, Safavi M, Pouramiri B, Foroumadi A. A review on progression of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors as an efficient approach in cancer targeted therapy. *Bioorg Chem.* 2020;103811.
158. Solassol I, Pinguet F, Quantin X. FDA-and EMA-approved tyrosine kinase inhibitors in advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer: safety, tolerability, plasma concentration monitoring, and management. *Biomolecules.* 2019;9(11):668.
159. Le T, Gerber DE. Newer-generation egfr inhibitors in lung cancer: how are they best used? *Cancers (Basel).* 2019;11(3):366.
160. Capdevila J, Elez E, Macarulla T, Ramos FJ, Ruiz-Echarri M, Tabernero J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(4):354–63.
161. FDA. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION: ERBITUX [Internet]. [kaynak 23 Haziran 2020]. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/125084s273lbl.pdf
162. FDA. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION: VECTIBIX [Internet]. [kaynak 23 Haziran 2020]. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125147s080lbl.pdf

163. Kono SA, Haigentz M, Yom SS, Saba N. EGFR monoclonal antibodies in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck: a view beyond cetuximab. *Chemother Res Pract.* 2012;2012.
164. FDA. PORTRAZZA (necitumumab) injection, for intravenous use [Internet]. [kaynak 23 Haziran 2020]. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/125547s000lbl.pdf
165. Daiichi Sankyo Announces Discontinuation of Phase 3 Clinical Trial in Japan of Nimotuzumab (DE-766) in Lung Cancer - Media & Investors - Daiichi Sankyo [Internet]. [kaynak 23 Haziran 2020]. Available at: https://www.daiichisankyo.com/media_investors/media_relations/press_releases/detail/006115.html
166. Schmiedel J, Blaukat A, Li S, Knöchel T, Ferguson KM. Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell.* 2008;13(4):365–73.
167. Yamaoka T, Ohba M, Ohmori T. Molecular-targeted therapies for epidermal growth factor receptor and its resistance mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2420.
168. Chen W, Shen B, Sun X. Analysis of progress and challenges of EGFR-targeted molecular imaging in cancer with a focus on affibody molecules. *Mol Imaging.* 2019;18:1536012118823473.
169. Dienstmann R, De Dosso S, Felip E, Tabernero J. Drug development to overcome resistance to EGFR inhibitors in lung and colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2012;6(1):15–26.
170. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, vd. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350(21):2129–39.
171. Lievre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, vd. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer.

Cancer Res. 2006;66(8):3992–5.

172. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, vd. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med.* 2005;2(1):e17.
173. Johnson DH, Wilson WW, DeLucas LJ. Protein solubilization: A novel approach. *J Chromatogr B.* 2014;971:99–106.
174. Leimgruber RM. Extraction and solubilization of proteins for proteomic studies. İçinde: *The Proteomics Protocols Handbook*. Springer; 2005. s. 1–18.
175. HisPur™ Ni-NTA Spin Purification Kit, 3 mL [Internet]. [kaynak 30 Haziran 2020]. Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88229#/88229>
176. Asensio MA, Lim YW, Wayham N, Stadtmiller K, Edgar RC, Leong J, vd. Antibody repertoire analysis of mouse immunization protocols using microfluidics and molecular genomics. İçinde: *Mabs*. Taylor & Francis; 2019. s. 870–83.
177. Liddell JE. Immunization of Mice for Monoclonal Antibody Production. e LS. 2001;
178. Garrido G, Sanchez B, Rodriguez HM, Lorenzano P, Alonso D, Fernandez LE. 7A7 MAb: a new tool for the pre-clinical evaluation of EGFR-based therapies. *Hybrid Hybridomics.* 2004;23(3):168–75.
179. Itai S, Kaneko MK, Fujii Y, Yamada S, Nakamura T, Yanaka M, vd. Development of EMab-51, a sensitive and specific anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in flow Cytometry, Western blot, and immunohistochemistry. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2017;36(5):214–9.
180. Palma BA, Gelman PL, Ríos MM, Nieves JCC, Ortuño RA, Ortega MEM, vd. Generation of a novel monoclonal antibody that recognizes the alpha (α)-amidated isoform of a valine residue. *BMC Neurosci.* 2015;16(1):65.
181. Hattori T, Yamada T, Morikawa H, Marutani T, Tsutsumi K, Nishino K, vd. Generation of monoclonal antibodies against mitocryptide-2: toward a new strategy

- to investigate the biological roles of cryptides. *J Pept Sci.* 2017;23(7–8):610–7.
182. Murphy C, Devine T, O’Kennedy R. Technology advancements in antibody purification. *Antib Technol J.* 2016;6:17–32.
 183. Kato K, Lian L-Y, Barsukov IL, Derrick JP, Kim H, Tanaka R, vd. Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. *Structure.* 1995;3(1):79–85.
 184. Thomson CA. IgG Structure and Function. İçinde: *Encyclopedia of Immunobiology.* Elsevier Inc.; 2016. s. 15–22.
 185. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:520.
 186. Bee C, Abdiche YN, Pons J, Rajpal A. Determining the binding affinity of therapeutic monoclonal antibodies towards their native unpurified antigens in human serum. *PLoS One.* 2013;8(11):e80501.
 187. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, vd. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013;2(9):e71–e71.
 188. Patra S, Young V, Llewellyn L, Senapati JN, Mathew J. BRAF, KRAS and PIK3CA mutation and sensitivity to trastuzumab in breast cancer cell line model. *Asian Pacific J cancer Prev APJCP.* 2017;18(8):2209.
 189. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo W-L, Davies M, vd. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68(15):6084–91.
 190. Song N, Liu S, Zhang J, Liu J, Xu L, Liu Y, vd. Cetuximab-induced MET activation acts as a novel resistance mechanism in colon cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):5838–51.
 191. Narvi E, Vaparanta K, Karrila A, Chakroborty D, Knuutila S, Pulliainen A, vd.

Different responses of colorectal cancer cells to alternative sequences of cetuximab and oxaliplatin. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–13.

192. El Guerrab A, Bamdad M, Kwiatkowski F, Bignon Y-J, Penault-Llorca F, Aubel C. Anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors as combination therapy for triple-negative breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(45):73618.
193. Gurdal H, Tuglu MM, Bostanabad SY, Dalkiliç B. Partial agonistic effect of cetuximab on epidermal growth factor receptor and Src kinase activation in triple-negative breast cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2019;54(4):1345–56.
194. Napolitano S, Martini G, Martinelli E, Corte CM Della, Morgillo F, Belli V, vd. Antitumor efficacy of triple monoclonal antibody inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) with MM151 in EGFRdependent and in cetuximab-resistant human colorectal cancer cells. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [kaynak 30 Haziran 2020];8(47):82773–83. Available at: /pmc/articles/PMC5669927/?report=abstract
195. De Pauw I, Lardon F, Van den Bossche J, Baysal H, Pauwels P, Peeters M, vd. Overcoming intrinsic and acquired cetuximab resistance in RAS wild-type colorectal cancer: An in vitro study on the expression of HER receptors and the potential of afatinib. *Cancers (Basel).* 2019;11(1):98.
196. Hematology/Oncology (Cancer) Approvals & Safety Notifications | FDA [Internet]. [kaynak 30 Haziran 2020]. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/hematologyoncology-cancer-approvals-safety-notifications>
197. Guo G, Gong K, Wohlfeld B, Hatanpaa KJ, Zhao D, Habib AA. Ligand-independent EGFR signaling. *Cancer Res.* 2015;75(17):3436–41.
198. Wu W, Graves LM, Gill GN, Parsons SJ, Samet JM. Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on tyrosine 845 is required for zinc-induced Ras activation. *J Biol Chem.* 2002;277(27):24252–7.
199. Mueller KL, Powell K, Madden JM, Eblen ST, Boerner JL. EGFR tyrosine 845

- phosphorylation-dependent proliferation and transformation of breast cancer cells require activation of p38 MAPK. *Transl Oncol.* 2012;5(5):327-IN1.
200. Dimri M, Naramura M, Duan L, Chen J, Ortega-Cava C, Chen G, vd. Modeling breast cancer-associated c-Src and EGFR overexpression in human MECs: c-Src and EGFR cooperatively promote aberrant three-dimensional acinar structure and invasive behavior. *Cancer Res.* 2007;67(9):4164–72.
 201. Maa M-C, Leu T-H, McCarley DJ, Schatzman RC, Parsons SJ. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(15):6981–5.
 202. Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, Parsons SJ. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96(4):1415–20.
 203. Sato K. Cellular functions regulated by phosphorylation of EGFR on Tyr845. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):10761–90.
 204. Kloth MT, Laughlin KK, Biscardi JS, Boerner JL, Parsons SJ, Silva CM. STAT5b, a mediator of synergism between c-Src and the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2003;278(3):1671–9.
 205. Lu Y, Li X, Liang K, Luwor R, Siddik ZH, Mills GB, vd. Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Res.* 2007;67(17):8240–7.
 206. Hsu JL, Hung M-C. The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(4):575–88.
 207. Maadi H, Nami B, Tong J, Li G, Wang Z. The effects of trastuzumab on HER2-mediated cell signaling in CHO cells expressing human HER2. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1–14.
 208. Claret FX, Vu TT. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in

- breast cancer. *Front Oncol.* 2012;2:62.
209. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene.* 2007;26(45):6469–87.
210. Xu W, Yuan X, Beebe K, Xiang Z, Neckers L. Loss of Hsp90 association up-regulates Src-dependent ErbB2 activity. *Mol Cell Biol.* 2007;27(1):220–8.
211. Ouyang X, Gulliford T, Zhang H, Smith G, Huang G, Epstein RJ. Association of ErbB2 Ser1113 phosphorylation with epidermal growth factor receptor co-expression and poor prognosis in human breast cancer. *Mol Cell Biochem.* 2001;218(1–2):47–54.



EKLER

EK 1: ÇALIŞMA İÇİN ETİK KURUL KARARI

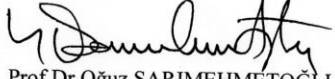
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ : 26/08/2015
TOPLANTI NO : 2015-13
DOSYA NO : 2015-110
KARAR NO : 2015-13-150

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Arzu Atalay'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Prof.Dr.Hakan Gürdal, Doç.Dr.Erkan Yılmaz ve Yrd.Doç.Dr.Doruk Engin'in katıldığı "Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Dimerizasyon Bölgesine Nötralizan Monoklonal Anti-EGFR Antikoru Geliştirilmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılması oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 3
Geçerlilik Süresi : 01/03/2016-01/09/2017

ASLININ AYNIĞIR
26/08/2015


Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU
A.Ü. HADYEK Başkanı



Aslım Aynıdır
Emine EROĞLU
Enstitü Sekreteri



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 26/08/2015
TOPLANTI NO : 2015-13
DOSYA NO : 2015-110
KARAR NO : 2015-13-150

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr.Arzu Atalay'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Prof.Dr.Hakan Gürdal, Doç.Dr.Erkan Yılmaz ve Yrd.Doç.Dr.Doruk Engin'in katıldığı "Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Dimerizasyon Bölgesine Nötralizan Monoklonal Anti-EGFR Antikoru Geliştirilmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılması oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 3
Geçerlilik Süresi : 01/03/2016-01/09/2017

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünler Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA **Tel:** 0 (312) 212 60 40 / 2064 **Faks:** 0 (312) 212 60 49

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Onur BENDER
Doğum Yeri : Niğde
Doğum Tarihi : 18/09/1989
e-mail : onurbender@gmail.com
Akademik Kimlikler: [ORCID \(0000-0003-0691-3508\)](https://orcid.org/0000-0003-0691-3508)
[ResearcherID \(D-5917-2018\)](https://pubs.rsos.royalsocietypublishing.org/author/Onur-Bender/1234567)
[Scopus \(56642615400\)](https://scopus.com/authid/detail.uri?authorid=56642615400)
[Google Scholar](https://scholar.google.com/citations?user=onurbender)
[ResearchGate](https://www.researchgate.net/profile/Onur-Bender)

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans: Turgut Özal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara (2012 - 2015)

Lisans : Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya (2008 - 2012)

Lise : İncirli Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi, Ankara (2003 - 2007)

Akademik Çalışmalar

Patent, Tescil, Faydalı Model, Yayılım

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Dimerizasyon Bölgesine Spesifik Anti-EGFR Monoklonal Antikoru, Buluş sahibi, Ulusal Patent Başvurusu, Başvuru no: 2019/06941, Başvuru tarihi: 9.5.2019

Anti_EGFR Monoclonal Antibody Specific to the Dimerization Region of the Epidermal Growth Factor Receptor, Buluş sahibi, Uluslararası Patent Başvurusu, Başvuru no: PCT/TR2019/000074, Başvuru tarihi: 12.11.2019

Türkiye Teknoloji Geliştirme Vakfı (TTGV), Biyoteknoloji Sektörel İnovasyon Sistemi, Başarılı Uygulamalardaki Ortak Bulgular ve Türkiye Çalıştayı Çıktıları, Katılımcı, Ed.:Mahmut Kiper, 2012

Kitap veya Kitap Bölümleri

Bender O, Atalay A. Polyphenol chlorogenic acid, antioxidant profile and breast cancer. Cancer, 2e: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. Edited by Victor Preedy and Vinood Patel, 2020; Elsevier., In Press

Hatipoglu OF, **Bender O**, Gunduz E, Gunduz M. Pharmacogenomics in Acute Myeloid Leukemia. Omics for Personalized Medicine, Edited by Debmalya Barh, 01/2013; Springer., ISBN: 978-81-322-1183-9

Uluslararası İndekslerce Taranan Makaleler

Mahomoodally MF, Atalay A, Nancy Picot MC, **Bender O**, Celebi E, Mollica A, Zengin G. Chemical, biological and molecular modelling analyses to probe into the pharmacological potential of *Antidesma madagascariense* Lam.: A multifunctional agent for developing novel therapeutic formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 161:425-435 (2018) doi: 10.1016/j.jpba.2018.09.002

Bender O, Llorent-Martínez EJ, Zengin G, Mollica A, Ceylan R, Molina-García L, Fernández-de Córdova ML, Atalay A. Integration of in vitro and in silico perspectives to explain chemical characterization, biological potential and anticancer effects of *Hypericum salsugineum*: A pharmacologically active source for functional drug formulations. **PloS One** 13(6):e0197815 (2018) doi: 10.1371/journal.pone.0197815

Bender O, Atalay A. Evaluation of anti-proliferative and cytotoxic effects of chlorogenic acid on breast cancer cell lines by real-time, label-free and high-throughput screening. **Journal of Research in Pharmacy** 22(2):173-179 (2018) doi: 10.12991/mpj.2018.54

Mocan A, Moldovan C, Zengin G, **Bender O**, Locatelli M, Simirgiotis M, Atalay A, Vodnar DC, Rohn S, Crişan G. UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory and real-time cytotoxicological evaluation. **Food and Chemical Toxicology** 115:414-424 (2018) doi: 10.1016/j.fct.2018.01.054

Bender O, Gunduz M, Cigdem S, Hatipoglu OF, Acar M, Kaya M, Grenman R, Gunduz E, Ugur KS. Functional analysis of ESM1 by siRNA knockdown in primary and metastatic head and neck cancer cells. **Journal of Oral Pathology and Medicine** 47(1):40-47. (2017) doi: 10.1111/jop.12648.

Picot MCN, **Bender O**, Atalay A, Zengin G, Loffredo L, Hadji-Minaglou F, Mahomoodally MF. Multiple pharmacological targets, cytotoxicity, and phytochemical profile of *Aphloia theiformis* (Vahl.) Benn. **Biomedicine & Pharmacotherapy** 89:342-350 (2017) doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.031.

Llorent-Martínez EJ, Zengin G, Fernández-de Córdova ML, **Bender O**, Atalay A, Ceylan R, Mollica A, Mocan A, Uysal S, Guler GO, Aktumsek A. Traditionally Used Lathyrus Species: Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, Enzyme Inhibitory Properties, Cytotoxic Effects, and in silico Studies of *L. czeczottianus* and *L. nissolia*. **Frontiers in Pharmacology** 27(8):83 (2017) doi: 10.3389/fphar.2017.00083.

Bender O, Celebi E, Atalay A. RNA interference and current clinical applications. **Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences** 36(1):53-60 (2016). doi: 10.5336/medsci.2015-49055

Hatipoglu OF, Yaykasli KO, Dogan M, Yaykasli E, **Bender O**, Yasar T, Tapan S, Gunduz M: NF- κ B and MAPKs are involved in resistin-caused ADAMTS-5 induction in human chondrocytes. **Clinical and Investigative Medicine** 38(4):E248-E254 (2015)

Lazarova I, Zengin G, **Bender O**, Zheleva-Dimitrova D, Uysal S, Ceylan R, Gevrenova R, Aktumsek A, Acar A, Gunduz M: A comparative study of Bulgarian and Turkish *Asphodeline lutea* root extracts: HPLC-UV profiles, enzyme inhibitory potentials and anti-proliferative activities against MCF-7 and MCF-10A cell lines. **Journal of Functional Foods** 15(2015):254-263 (2015) doi:10.1016/j.jff.2015.03.032

Bildiriler (20)

Bender O, Atalay A. Real-time cell analysis improves the quality of natural product-based drug screening studies. 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences. 06/2019 Ankara/Turkey

Bender O, Atalay A. Evaluation of Anti-Proliferative and Cytotoxic Properties of Chlorogenic Acid against Breast Cancer Cell Lines by Real Time Monitoring. 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy. 11/2017 Kayseri/Turkey Published in: Nutrients

Mocan A, Zengin G, **Bender O**, Atalay A, Simirgiotis MJ, Locatelli M, Crişan G ,Rohn S. HR-ESI-QTOF-MS characterization of bioactive components from two goji (Lycium Barbarum L.) berry cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory and cytotoxicological evaluation. 3rd International Conference on Natural Products Utilization. 10/2017 Bansko/Bulgaria

Bender O, Ceylan R, Zengin G, Aktumsek A, Atalay A. Hypericum salsugineum inhibits proliferation, migration and colony formation ability of triple-negative and estrogen receptor-positive breast cancer cells. 2nd International Gazi Pharma Symposium Series. 10/2017. Ankara

Bender O, Ceylan R, Zengin G, Aktumsek A, Atalay A. Screening the Anti-Proliferative Effects of Some Hypericum Species in MCF-7 Human Breast Cancer Cells by Using Real Time Cellular Impedence Technology. 6. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 01/2017 Konya, Published in: Turkish Journal of Biochemistry

Bender O, Picot MCN, Mahomoodally MF, Zengin G, Loffredo L, Hadji-Minaglou F, Atalay A. Real time and label-free monitoring of cytotoxic activity of Aphloia theiformis on HEK293 Cell Line. International Conference on Biological Sciences (ICBS) 10/2016 Konya, Turkey

Bender O, Picot MCN, Mahomoodally MF, Zengin G, Loffredo L, Hadji-Minaglou F, Celebi E, Atalay A. Investigation of Antidesma madagascariense cytotoxicity on HEK293 Cells by using iCELLigence biosensor technology. International Conference on Biological Sciences (ICBS) 10/2016 Konya, Turkey

Oznur M, Dede S, **Bender O**, Ugur KS, Tarcan Z, Ercan UG, Dogan B, Kilic N, Gunduz M. Role of ESM1 Gene in Cancer. Gevher Nesibe Medical Genetics and Clinical Applications 02/2016 Published in: Erciyes Medical Journal

Bender O, Gunduz M, Hatipoglu OF, Acar M, Kaya M, Grenman R, Gunduz E, Ugur KS. Functional analysis of ESM1 by siRNA knockdown in primary and metastatic head and neck cancer cells. IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey 10/2015

Ciftci-Yilmaz S, Akpınar Z, Ceylan R, Gunduz E, **Bender O**, Zengin G, Aktumsek A. Investigating and comparing antioxidant capacity of different region's propolis and their effect on chromosome instability 1st International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy Istanbul/Turkey 08/2015 Published in: Anti-Cancer Drugs

Hatipoglu OF, Oznur M, Demir E, **Bender O**, Acar M, Yilmaz B, Cevik MO, Gunduz E, Gunduz M: Isolation and Characterization of Cancer Stem Cell in Glioma. The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience "iPS Cells for Regenerative Medicine" "CiRA International Symposium", Osaka, Japan; 01/2015

Bavbek N, Akdeniz D, Yilmaz H, Yildirim U, **Bender O**, Firat Z, Acar M, Hatipoglu OF, Bilgic AM, Gunduz E, Akcay A: Overexpression of microRNAs May Be Key to Decreased Autophagy and PRR in the Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. The American Society of Nephrology Kidney Week 2014, Philadelphia, USA; 11/2014 Published in: Journal of the American Society of Nephrology

Bender O, Zengin G, Lazarova I, Celik A, Ceylan R, Aktumsek A, Gevrenova R, Gunduz E, Gunduz M: Bulgaristan ve Türkiye Orjinli Asphodeline lutea (L.) Köklerinin Normal

(MCF-10A) ve Kanserli (MCF-7) Hücre Hatları Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Kullanılarak Araştırılması. 11. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İstanbul; 09/2014

Acar M, Sahin H, Oznur M, **Bender O**, Surgit O, Gunduz E, Gunduz M: 958: Effect of Survivin gene –1547 A>G (rs3764383) polymorphism in Turkish breast cancer patients. 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research 07/2014; Published in: European Journal of Cancer

Bender O, Zengin G, Lazarova I, Ceylan R, Uysal S, Aktümsek A, Gevrenova R: Bulgaristan ve Türkiye Orjinli Asphodeline lutea (L.) Reichb. Köklerinin xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi Kullanılarak MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antiproliferatif Etkilerinin Gözlemlenmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, Turkey; 06/2014

Bender O, Hatipoglu OF, Hirohata S, Gunduz E, Gunduz M, Ninomiya Y: ADAMTS1'in Embriyo Gelişimindeki Rollerinin ADAMTS1 Knockout Fareler Üzerinde Gösterilmesi. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, Turkey; 06/2014

Gunduz E, Gunduz M, Acar M, **Bender O**, Moroski-Erkul C, Hatipoglu OF: Investigation of the Role of ING1 splice variants (p24ING1 and p33ING1) in carcinogenesis and metastasis of head and neck cancer. EACR- Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress & 5th Multidisciplinary Cancer Research Congress, Bodrum, Turkey; 04/2014

Oznur M, **Bender O**, Nas G, Yilmaz B, Yasar T, Gunduz E, Gunduz M: Bioinformatic Databases Used in Medical Genetics. 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Aydın, Türkiye; 10/2013

Uctepe E, Maral S, **Bender O**, Yasar T, Gunduz E, Gunduz M: Matrix metalloproteinase 2, 3, 9, 10, 13 gene polymorphisms and risk for polycythemia and essential thrombocytosis patients. American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, Boston, USA; 10/2013

Uctepe E, Maral S, Işık MI, **Bender O**, Yaşar T, Gündüz E, Gündüz M: Primer ve Sekonder Polistemili, Esansiyel Trombositozlu Hastalarla Matriks Metalloproteinaz 2, 3, 9, 10, 13 Polimorfizmleri Arasındaki İlişki. 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Bursa, Türkiye; 12/2012

Katıldığı Kongreler

- EACR 2020 Virtual Congress, 2020
- 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Erciyes Üniversitesi, Kayseri, 2017
- 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS), Gazi Üniversitesi, 2017, Ankara
- International Conference on Biological Sciences (ICBS), Selçuk Üniversitesi, Konya, 2016
- IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, Middle East Technical University, Ankara, 2015
- Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Osaka, Japonya, 2015
- 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, 2014
- 13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Pine Bay Hotel, Aydın, 2013
- 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, 2012
- 18. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2010
- 17. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2009
- 16. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Niğde Üniversitesi, Niğde, 2008

Üyelikler

- Türkiye Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği (2016 - Devam ediyor)
- Hücre Ölümü Araştırma Derneği (2016 - Devam ediyor)
- The European Association for Cancer Research: EACR (2014 - Devam ediyor)
- Moleküler Kanser Araştırma Derneği – MOKAD (2014 - Devam ediyor)
- Türkiye Tıbbi Genetik Derneği (2012 - Devam ediyor)

Diğer Görevler

- Ankara Üniversitesi Öğrenci Konseyi, 2017-2020 Dönemi Kurultay Divan Başkanı
- Ankara Üniversitesi Öğrenci Konseyi, Biyoteknoloji Enstitüsü Öğrenci Temsilcisi (2017-2020)
- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Moleküler Hücre Biyolojisi Araştırma Grubu Öğrenci Temsilcisi (2016-Devam Ediyor)

Profesyonel Gelişim Etkinlikleri

- Bilkent Üniversitesi, Bilkent UNAMBG Synthetic Biology Day, 2016
- Bilkent Üniversitesi, Bilgent Genetics Society Molecular Medicine and Immunology Days, 2016
- Kırıkkale Üniversitesi Pedagojik Formasyon Eğitimi, Biyoloji Öğretmenliği, 2015
- Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyogüvenlik Eğitimi, 2015
- Abcam, ChIP ve ELISA Optimizasyonları Eğitimi, 2015
- Hacettepe Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma Topluluğu, Biyoteknolojik Prosesler ve Güncel Uygulamaları Semineri, 2015
- GENOKS, Temel Düzey Biyoinformatik Uygulamalı Eğitimi, 2014
- ODTÜ ARGE Topluluğu, Altın Anahtar ARGE Semineri, 2012
- İncekaralar A.Ş Eğitim Seminerleri: Spektrofotometre, Pipet, Laminar Flow, CO2 İnkübatör, PCR, Katılım ve Sertifikası, (2012-2015)
- Selçuk Üniversitesi, Kariyer Günleri '12, 2012
- Konya Teknokent, Toplam Kalite Yönetimi Eğitimi, 2012
- Gazi Üniversitesi, Kariyer Günleri '10
- Feyhan Aras Ulusal Öğrenci Gelişim Projesi, 2010
- Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Gönüllü Staj, 2008

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Patent Başvuruları

1- Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Dimerizasyon Bölgesine Spesifik Anti-EGFR Monoklonal Antikoru, Buluş sahibi, Ulusal Patent Başvurusu, Başvuru no: 2019/06941, Başvuru tarihi: 9.5.2019

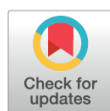
2- Anti-EGFR Monoclonal Antibody Specific to the Dimerization Region of the Epidermal Growth Factor Receptor, Buluş sahibi, Uluslararası Patent Başvurusu, Başvuru no: PCT/TR2019/000074, Başvuru tarihi: 12.11.2019



RESEARCH ARTICLE

Integration of *in vitro* and *in silico* perspectives to explain chemical characterization, biological potential and anticancer effects of *Hypericum salsugineum*: A pharmacologically active source for functional drug formulations

Onur Bender¹, Eulogio J. Llorent-Martínez², Gokhan Zengin^{3*}, Adriano Mollica⁴, Ramazan Ceylan³, Lucia Molina-García², Maria Luisa Fernández-de Córdoba², Arzu Atalay^{1*}



1 Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey, **2** Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, Campus Las Lagunillas S/N, Jaén, Spain, **3** Department of Biology, Science Faculty, Selcuk University, Campus, Konya, Turkey, **4** Department of Pharmacy, University "G. d'Annunzio" of Chieti-Pescara, Chieti-Italy

* gokhanzengin@selcuk.edu.tr (GZ); arzu.atalay@ankara.edu.tr (AA)

OPEN ACCESS

Citation: Bender O, Llorent-Martínez EJ, Zengin G, Mollica A, Ceylan R, Molina-García L, et al. (2018) Integration of *in vitro* and *in silico* perspectives to explain chemical characterization, biological potential and anticancer effects of *Hypericum salsugineum*: A pharmacologically active source for functional drug formulations. PLoS ONE 13(6): e0197815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815>

Editor: Gabriel Agbor, Institute of Medical Research and Medicinal Plant Studies, CAMEROON

Received: December 25, 2017

Accepted: March 27, 2018

Published: June 4, 2018

Copyright: © 2018 Bender et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are with the paper. There are no ethical or legal restrictions on sharing data sets.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The genus *Hypericum* is one of the most popular genera in both traditional medicine and scientific platform. This study is designed to provide conceptual insights on the biological potential and chemical characterization of *H. salsugineum*, which is endemic to Turkey. The qualitative and quantitative phenolic content of the extracts was characterized by HPLC-ESI-MSⁿ. Biological efficiency was investigated by enzyme inhibitory assays (cholinesterases, tyrosinase, amylase, and glucosidase) and anti-cancer efficacy tests (anti-proliferative activities with the iCELLigence technology, colony formation and wound healing scratch assays). Phenolic acids (3-*O*-caffeoylquinic, 5-*O*-caffeoylquinic, and 4-*O*-caffeoylquinic acids) were the predominant group in the studied extracts, although several flavonoids were also detected and quantified. The extracts exhibited good inhibitory effects on tyrosinase and glucosidase, while they had weak ability against cholinesterases and amylase. Computational studies were also performed to explain the interactions between the major phenolics and these enzymes. The extracts displayed significant anti-cancer effects on breast carcinoma cell lines. Our findings suggest that *Hypericum salsugineum* could be valued as a potential source of biologically-active compounds for designing novel products.

Introduction

The plant kingdom usually presents high levels of polyphenols, which are known for their high biological properties such as antioxidant, antimicrobial, and anticancer. Hence, although the health benefits of phenolic compounds have been reported for decades, studies on this area are still a significant concern for many fields of research, including analytical chemistry, biochemistry, biomedicine, etc. Within this framework, uninvestigated wild plant species are also widely studied

to find new sources of valuable phytochemicals and, hence, to combat global health problems including cancer, Alzheimer disease, and diabetes mellitus. In many cases, researchers focus on plants commonly used in folk medicine. However, the information of these species is usually extensive, and focusing on less-known species from the same genus is an interesting option, as their composition and bio(chemical) activity may be similar. From this point, new studies could open further avenues in the design of potential phytopharmaceuticals.

The genus *Hypericum* (Hypericaceae) comprehends nearly 500 species which are widely distributed around the world. These species occur as herbs, shrubs and, infrequently trees. Among them, *H. perforatum* L. is the best-known species, used in traditional medicine and in the preparation of dietary supplements [1, 2]. Several authors have recently investigated potential medicinal applications of other *Hypericum* species, such as *H. androsaemum*, *H. comnatum*, *H. olympicum*, and *H. adenotrichum*, among others [3–5], mainly studying their biological activity. Phenolic compounds usually account for many of the bio(chemical) properties of plant extracts, so exhaustive investigation of the phytochemical composition of the plant extracts is mandatory. Different phenolics have been reported in *Hypericum* species, including catechin, quercetin derivatives, phenolic acids, etc. [6, 7], each of these compounds presenting specific chemical properties. In this work, we aimed to study the phytochemical profile and bioactivity of *H. salsugineum* N. Robson & Hub.-Mor., an uncommon species in this genus, providing exhaustive information in order to propose an alternative source of bio-(active) phytochemicals.

Hypericum salsugineum Rabson & Hub.-Mor. is among the least studied *Hypericum* species. We have found only a small number of scientific reports regarding this species. To our knowledge, only a little information was provided concerning the phenolic composition (chlorogenic acid, kaempferol, myricetin, quercetin, and quercetin glycosides) [8] and antihyperpetic activity [9] of this plant. Maltas et al. carried out more experiments and provided additional data regarding the antioxidant and antibacterial activity of *H. salsugineum*, among other *Hypericum* species [10]. This research aims to provide a complete study on this species to date, including identification and quantification of the main polyphenols, enzyme inhibitory assays, and evaluation of anti-cancer effects.

Materials and methods

Plant material

Aerial parts of *Hypericum salsugineum* were collected from Konya (Cihanbeyli-Gölyazı, 38° 28'31.08"N, 33° 7'36.74"E, 950 m) (at the flowering season in 2015 summer) and air dried at room temperature. Taxonomic identification was confirmed by the senior taxonomist Dr. Murad Aydın Sanda, from the Department of Biology, Selcuk University, Turkey. The dried aerial parts were ground to a fine powder (about 0.2 mm) using a laboratory mill. Then, the air-dried aerial parts (10 g) were macerated with 200 mL of methanol at room temperature (25°C ± 1°C) for 24 hours. The extracts were concentrated to dryness under vacuum at 40 °C by using a rotary evaporator and stored at + 4°C in the dark until use.

For the collection of plants, no specific permits were required for the described field studies. For any locations/activities, no specific permissions were required. All locations where the plants were collected were not privately-owned or protected in any way and the field studies did not involve endangered or protected species.

Chemicals and reagents

All reagents and standards were of analytical reagent (AR) grade unless stated otherwise. We purchased all phenolic standards from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and prepared

individual stock solutions in ethanol (HPLC grade; Sigma). LC–MS grade acetonitrile (CH_3CN , 99%; LabScan; Dublin, Ireland) and ultrapure water (Milli-Q Waters purification system; Millipore; Milford, MA, USA) were used for the HPLC–MS analyses.

Chromatographic conditions

For HPLC analysis, 5 mg of dried extract was re-dissolved in 1 ml of methanol, filtered through 0.45 μm PTFE membrane filters, and ten μL of the solution was injected.

The HPLC system was an Agilent Series 1100, composed of a vacuum degasser, an auto-sampler, a binary pump, and a G1315B diode array detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). We used a reversed phase Luna Omega Polar C_{18} analytical column of 150 $\times$ 3.0 mm and 5 μm particle size (Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a Polar C_{18} Security Guard cartridge (Phenomenex) of 4 $\times$ 3.0 mm. The best separation was achieved with a mobile phase of water–formic acid (100:0.1, v/v) and CH_3CN . The following program was used: a) initial mobile phase, 10% CH_3CN ; b) linear increase from 10% to 25% CH_3CN (0–25 min); c) 25% CH_3CN (25–30 min); d) linear increase from 25% to 50% CH_3CN (30–40 min); e) linear increase from 50% to 100% CH_3CN (40–42 min); f) 100% CH_3CN (42–47 min). Then, CH_3CN percentage was returned to the initial mobile phase, with a 7 min stabilization time. The flow rate was 0.4 ml min^{-1} .

The HPLC system was connected to an ion trap mass spectrometer (Esquire 6000, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with an electrospray interface. The scan range was set at m/z 100–1200 with a speed of 13,000 Da/s. The ESI conditions were: drying gas (N_2) flow rate and temperature, 10 mL/min and 365 $^\circ\text{C}$; nebulizer gas (N_2) pressure, 50 psi; capillary voltage, 4500 V; capillary exit voltage, -117.3 V. We used the auto MS^n mode for the acquisition of MS^n data, with isolation width of 4.0 m/z , and fragmentation amplitude of 0.6 V (MS^n up to MS^4). Esquire control software and Data Analysis were used for data acquisition and data processing, respectively.

Quantification of polyphenols

Calibration curves (0.5–100 $\mu\text{g/ml}$ in MeOH) were prepared using the corresponding analytical standards when available in our laboratory. In other cases, an appropriate analytical standard was selected: quercetin, apigenin and mirycetin for the corresponding glycosides; 3-O-caffeoylquinic acid for caffeoylquinic acids and derivatives; and p-coumaric acid for its derivative. The quantitation was carried out at 320 nm for phenolic acids and 350 nm for flavonoids, using peak area at the analytical signal in the corresponding UV chromatograms. Total individual phenolic content (TIPC) was defined as the sum of the quantified phenolic compounds.

Enzyme inhibitory effects

Anti-cholinesterases, anti-tyrosinase, anti-amylase, and anti-glucosidase effects were tested for detecting enzyme inhibitory effects. Detailed experimental procedures were given in the below:

For Cholinesterase (ChE) inhibitory activity assay: Sample solution (2 mg/mL ; 50 μL) was mixed with DTNB (5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid, Sigma, St. Louis, MO, USA) (125 μL) and AChE (acetylcholinesterase (Electric eel acetylcholinesterase, Type-VI-S, EC 3.1.1.7, Sigma)), or BChE (butyrylcholinesterase (horse serum butyrylcholinesterase, EC 3.1.1.8, Sigma)) solution (25 μL) in Tris–HCl buffer (pH 8.0) in a 96-well microplate and incubated for 15 min at 25 $^\circ\text{C}$. The reaction was then initiated with the addition of acetylthiocholine iodide (ATCI, Sigma) or butyrylthiocholine chloride (BTCL, Sigma) (25 μL). Similarly, a blank was prepared by adding sample solution to all reaction reagents without enzyme (AChE or

BChE) solution. The sample and blank absorbances were read at 405 nm after 10 min incubation at 25 °C. The absorbance of the blank was subtracted from that of the sample and the cholinesterase inhibitory activity was expressed as galanthamine equivalents (mgGALAE/g extract) [11].

For Tyrosinase inhibitory activity assay: Sample solution (2 mg/mL; 25 μ L) was mixed with tyrosinase solution (40 μ L, Sigma) and phosphate buffer (100 μ L, pH 6.8) in a 96-well microplate and incubated for 15 min at 25 °C. The reaction was then initiated with the addition of L-DOPA (40 μ L, Sigma). Similarly, a blank was prepared by adding sample solution to all reaction reagents without enzyme (tyrosinase) solution. The sample and blank absorbances were read at 492 nm after a 10 min incubation at 25 °C. The absorbance of the blank was subtracted from that of the sample and the tyrosinase inhibitory activity was expressed as kojic acid equivalents (mgKAE/g extract) [12].

For α -amylase inhibitory activity assay: Sample solution (2 mg/mL; 25 μ L) was mixed with α -amylase solution (ex-porcine pancreas, EC 3.2.1.1, Sigma) (50 μ L) in phosphate buffer (pH 6.9 with 6 mM sodium chloride) in a 96-well microplate and incubated for 10 min at 37 °C. After pre-incubation, the reaction was initiated with the addition of starch solution (50 μ L, 0.05%). Similarly, a blank was prepared by adding sample solution to all reaction reagents without enzyme (α -amylase) solution. The reaction mixture was incubated 10 min at 37 °C. The reaction was then stopped with the addition of HCl (25 μ L, 1 M). This was followed by addition of the iodine-potassium iodide solution (100 μ L). The sample and blank absorbances were read at 630 nm. The absorbance of the blank was subtracted from that of the sample and the α -amylase inhibitory activity was expressed as acarbose equivalents (mmol ACE/g extract) [13].

For α -glucosidase inhibitory activity assay: Sample solution (2 mg/mL; 50 μ L) was mixed with glutathione (50 μ L), α -glucosidase solution (from *Saccharomyces cerevisiae*, EC 3.2.1.20, Sigma) (50 μ L) in phosphate buffer (pH 6.8) and PNPG (4-N-trophenyl- α -D-glucopyranoside, Sigma) (50 μ L) in a 96-well microplate and incubated for 15 min at 37 °C. Similarly, a blank was prepared by adding sample solution to all reaction reagents without enzyme (α -glucosidase) solution. The reaction was then stopped with the addition of sodium carbonate (50 μ L, 0.2 M). The sample and blank absorbances were read at 400 nm. The absorbance of the blank was subtracted from that of the sample and the α -glucosidase inhibitory activity was expressed as acarbose equivalents (mmol ACE/g extract) [14].

Molecular modelling

Enzymes preparation. For the computational studies, the following crystal structures have been downloaded from the Protein Data Bank RCSB PDB [15]: AChE (pdb:4X3C) [16] in complex with tacrine-nicotinamide hybrid inhibitor, BChE (pdb:4BDS) [17] in complex with tacrine, α -amylase (pdb:1VAH) [18] in complex with r-nitrophenyl- α -D-maltoside, α -glucosidase (pdb:3AXI) [19] in complex with maltose, and tyrosinase (pdb:2Y9X) [20] in complex with tropolone. The enzymes have been prepared for docking by removing the non-catalytic waters, the inhibitors, and all the other molecules present in the pdb files, as previously reported in our recent publications [11, 21–23]. The proteins were neutralized at pH 7.4 by PROPKA; seleno-cysteines, and seleno-methionines, if present, were converted respectively to cysteines and methionines. All the missing fragments and other errors present in the crystal structures were automatically solved by the Wizard Protein Preparation implemented in Maestro 10.2 suite [24]; the crystallographic ligands were used to generate the docking grid.

Ligands preparation. 3-O-caffeoylquinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, myricetin-O-glucoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-galactoside,

quercetin-3-O-rhamnoside, myricetin, and quercetin were selected as representative compounds to carry out molecular docking studies because these are well known bioactive compounds and are well represented in the extracts of *H. salsugineum*. The chemical structures have been downloaded from Zinc database [25] or drawn by Chemdraw software, and used for molecular modelling experiments after preparation. The ligands were prepared by the Lig-Prep tool embedded in Maestro 10.2, neutralized at pH 7.4 by Epik, and minimized by force field OPLS3 [26].

Molecular docking. The performance of Glide XP to dock for ligand docking and scoring on the selected enzymes, was judged by its ability to reproduce the docking poses found of the crystallographic inhibitor. Thus, a series of self-docking experiments were performed previously to run the docking experiments, by preparing the native inhibitors by the Ligand Preparation tool as described above, and by docking them to the respective enzymes. Glide has shown to be largely able to perform a reliable docking for all the selected enzymes by producing a pose within maximum 1.5 Angstroms of RMSD calculated by comparing them with the crystallographic pose [27]. Dockings of the selected substances have been performed for each selected enzyme employed for the *in vitro* enzymatic inhibition tests in this work. Glide [28] has been employed for the docking calculations by using the eXtra Precision scoring function for all the enzymes; the binding pocket was determined automatically by centering the grid on the crystallographic inhibitor, extended in a box of 20 Angstroms for each side. The best pose for each compound docked to the selected enzymes was the best ranked.

Cell lines and culture conditions

Human estrogen receptor-positive MCF-7 and triple negative MDA-MB-231 breast cancer cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ humidified incubator. Cells were routinely passaged every two to three days per week (1:3 ratio). When the cells reached 80% confluency, they were first washed with phosphate buffered saline (PBS), and then trypsinized with 0.25% trypsin-EDTA solution. Total cells were counted using trypan blue dye exclusion method on a hemocytometer before seeding on E-plate L8 or 6-well plate.

Cytotoxicity and anti-proliferative activity assay using the iCELLigence system

Dynamic monitoring of cytotoxicity and anti-proliferative activity were determined by using iCELLigence real-time cell analysis technology (ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA) as previously described [29]. Briefly, after a background reading with 200 µl growth medium on iCELLigence E-plate L8, 100 µl of MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded at a density of 5.0×10^4 per well. The system was then set to take impedance measurements every 30 min for 72 h. After culturing the cells for 24 h, they were treated with *H. salsugineum* methanolic extract between the range of 62.5–2000 µg/ml. The extract was dissolved in growth medium containing 0.1% DMSO for each experiment and all doses were prepared by serial dilution from a 2 mg/ml stock concentrate. In all experiments, 0.1% DMSO and 5% DMSO were used as negative control and positive controls, respectively. The data was recorded and analyzed by iCELLigence software integrated within the system. IC₅₀ values (µg/ml) were calculated according to the values at the end of 72 h of all treatment doses. Each assay was performed in duplicate and the IC₅₀ values shown are the average of at least three independent experiments.

Colony formation assay

Colony formation assay allows testing long-term effects of experimental therapeutics on cell colonies [30]. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were plated into 6-well tissue culture plates (3.0×10^3 per well) and allowed to adhere for 24h. The cells were then treated with 62.5, 125, 250, and 350 $\mu\text{g/ml}$ of *H. salsugineum* methanolic extract. 0.1% DMSO was used as control. Following treatment, plates were incubated for 14 days at 37°C in 5% CO_2 humidified incubator. Next, the cells were gently washed with ice-cold PBS and fixed with MeOH:acetic acid (3:1, v: v) solution for 5 min at room temperature. Following removal of the fixative solution, they were stained with 0.05% crystal violet for 15 min at room temperature. The plates were washed with double-distilled water and left to dry overnight at room temperature. Colonies containing >50 cells were counted under a stereomicroscope Leica MZI6 A (Wetzlar, Germany).

Wound healing scratch assay

Wound healing assay is performed to test the migration ability of cells by measuring their motility [31]. MCF-7 and MDA-MB-231 cells were seeded in 6-well tissue culture plates at a density of 1.0×10^6 cells/well and cultured in growth medium for 24h. Then, the cells were scratched by a sterile 200 μl pipette tip. Cellular debris was removed and cells were washed with fresh growth medium gently. The cells were incubated with 350 $\mu\text{g/ml}$ *H. salsugineum* methanolic extract for 48h. 0.1% DMSO was used as control. Wounded areas were photographed under an inverted microscope Leica DM IL LED (Wetzlar, Germany) at time points 0 and 48 h after scratching. Images were processed and quantified using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA).

Statistical analysis

IC_{50} values were calculated using the iCELLigence software. IC_{50} values, colony formation, and wound closure rates are shown as means $\pm$ standard deviations (means $\pm$ SD). The statistical analyses were performed using the t-test to compare differences in results between the control and treatment groups. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results and discussion

HPLC-ESI-MSⁿ

We carried out the identification of phenolics (and other minor compounds) in *H. salsugineum* by HPLC-ESI-MSⁿ using negative ionization mode. Three independent solutions of the dried extract were analyzed, obtaining similar profiles (see characterization in Table 1). The base peak chromatogram of the methanolic extract of the plant is shown in Fig 1.

The initial step for the characterization of each compound consisted in the determination of its molecular weight: the base peak corresponded to the deprotonated molecular ion $[\text{M}-\text{H}]^-$, except for one formate adduct. For the identification of the flavonoid glycosides, we compared the mass spectra of the aglycones with analytical standards when available (apigenin, kaempferol, luteolin, and quercetin). Rutin and caffeoylquinic acids were identified by comparison with analytical standards. When reference compounds were not available, we compared the experimental spectra with data from scientific literature.

Phenolic acids. Four caffeoylquinic acids were present in the analyzed extracts. Compounds 4, 6, and 7 exhibited deprotonated molecular ions at m/z 353. We characterized them by comparison with analytical standards. Compounds 4 and 6, with the typical $353 \rightarrow 191$ transition, corresponded to neochlorogenic acid (trans-5-*O*-caffeoylquinic acid) and chlorogenic acid (3-*O*-caffeoylquinic acid), respectively. Compound 7 presented $\text{MS}^2[353]$ base peak at m/z

Table 1. Characterization of methanol extract of *H. salsugineum*.

N°.	t _R (min)	[M-H] ⁺ m/z	m/z (% base peak)	Assigned identification
1	1.8	377	MS ² [377]: 341 (100) MS ³ [377→341]: 179 (100), 161 (70), 131 (7), 119 (72)	Saccharide (derivative)
2	1.8	191	MS ² [191]: 173 (20), 127 (12), 111 (100)	Quinic acid *
3	2.0	451	MS ² [451]: 449 (48), 353 (100) MS ³ [451→353]: 191 (100), 179 (19), 173 (16), 135 (12)	Caffeoylquinic acid derivative
4	4.6	353	MS ² [353]: 191 (100)	trans-5-O-caffeoylquinic acid *
5	7.0	337	MS ² [337]: 163 (100) MS ³ [337→163]: 119 (100)	3- <i>p</i> -coumaroylquinic acid
6	7.5	353	MS ² [353]: 191 (100)	3-O-caffeoylquinic acid *
7	8.0	353	MS ² [353]: 191 (26), 179 (61), 173 (100) MS ³ [353→173]: 111 (100)	4-O-caffeoylquinic acid *
8	9.7	431	MS ² [431]: 385 (100) MS ³ [431→385]: 223 (59), 205 (100), 161 (50), 153 (79)	Roseoside (formate adduct)
9	10.0	609	MS ² [609]: 463 (69), 447 (88), 301 (100) MS ³ [609→301]: 271 (100), 179 (48), 151 (99)	Quercetin-O-hexoside-O-deoxyhexoside
10	11.4	337	MS ² [337]: 173 (100), 191 (29) MS ³ [337→173]: 111 (100)	4- <i>p</i> -coumaroylquinic acid
11	12.2	371	MS ² [371]: 249 (100), 231 (7) MS ³ [371→249]: 231 (54), 113 (100), 111 (38)	Unknown
12	12.8	367	MS ² [367]: 191 (100), 173 (30) MS ³ [367→191]: 127 (100)	5-feruloylquinic acid
13	12.9	631	MS ² [631]: 479 (100) MS ³ [631→479]: 317 (100), 316 (54), 179 (9) MS ⁴ [631→479→317]: 271 (100), 179 (72), 151 (55)	Myricetin-O-(O-galloyl)hexoside
14	14.7	479	MS ² [479]: 317 (100), 316 (93) MS ³ [479→317]: 271 (100), 179 (83), 151 (65)	Myricetin-O-hexoside
15	15.1	367	MS ² [367]: 191 (28), 179 (100), 135 (67) MS ³ [367→179]: 135 (100)	Methyl-caffeoyl-quinic acid
16	15.9	479	MS ² [479]: 313 (100) MS ³ [479→313]: 241 (19), 169 (100), 125 (20)	Gallic acid derivative
17	16.3	593	MS ² [593]: 503 (95), 485 (19), 473 (37), 413 (25), 383 (100) MS ³ [593→383]: 355 (100)	Vicenin-2*
18	16.5	521	MS ² [521]: 359 (100) MS ³ [521→359]: 344 (100) MS ⁴ [521→359→344]: 329 (26), 313 (28), 300 (49), 189 (78), 159 (100)	Polymethoxylated flavonoid-O-hexoside
19	16.6	563	MS ² [563]: 443 (8), 413 (100), 293 (85) MS ³ [563→413]: 293 (100) MS ⁴ [563→413→293]: 175 (100)	Apigenin-C-hexoside-O-pentoside
20	16.9	549	MS ² [549]: 503 (100), 371 (45) MS ³ [549→503]: 371 (100), 161 (13) MS ⁴ [549→503→371]: 161 (100), 113 (17)	Unknown
21	17.0	641	MS ² [641]: 479 (100), 317 (25) MS ³ [641→479]: 317 (100) MS ⁴ [641→479→317]: 179 (65), 151 (100)	Myricetin-O-dihexoside
22	17.7	609	MS ² [609]: 301 (100), 300 (20) MS ³ [609→301]: 271 (100), 255 (54), 179 (51)	Rutin *
23	17.9	463	MS ² [463]: 317 (76), 316 (100) MS ³ [463→316]: 271 (100), 179 (80), 151 (56)	Myricetin-O-deoxyhexoside
24	17.9	323	MS ² [323]: 323 (100), 242 (51), 241 (24) MS ³ [323→242]: 240 (100), 172 (39)	Unknown
25	18.6	463	MS ² [463]: 301 (100), 300 (20) MS ³ [463→301]: 179 (69), 151 (100)	Quercetin-O-hexoside

(Continued)

Table 1. (Continued)

N°.	t _R (min)	[M-H] ⁻ m/z	m/z (% base peak)	Assigned identification
26	19.2	463	MS ² [463]: 301 (100) MS ³ [463→301]: 255 (21), 179 (79), 151 (100)	Quercetin-O-hexoside
27	19.5	415	MS ² [415]: 225 (43), 179 (100), 161 (23), 149 (12) MS ³ [415→179]: 161 (100), 143 (24), 131 (44), 119 (44)	Saccharide (derivative)
28	20.4	517	MS ² [517]: 209 (100)	Unknown
29	20.8	415	MS ² [415]: 179 (100) MS ³ [415→179]: 161 (100), 143 (86), 131 (84), 119 (23)	Saccharide (derivative)
30	21.3	433	MS ² [433]: 301 (100), 300 (70) MS ³ [433→301]: 271 (100), 255 (78), 179 (56), 151 (84)	Quercetin-O-pentoside
31	21.3	447	MS ² [447]: 285 (100), 284 (96), 255 (21), 151 (7)	Kaempferol-O-hexoside
32	22.9	447	MS ² [447]: 301 (100), 300 (17) MS ³ [447→301]: 179 (100), 151 (58)	Quercetin-O-deoxyhexoside
33	23.8	445	MS ² [445]: 269 (100), MS ³ [445→269]: 225 (100)	Apigenin glucuronide
34	25.6	317	MS ² [317]: 179 (100), 151 (38)	Myricetin
35	26.5	559	MS ² [559]: 433 (100)	Unknown
36	27.0	431	MS ² [431]: 285 (100) MS ³ [431→285]: 241 (100)	Luteolin-O-deoxyhexoside
37	27.3	625	MS ² [625]: 479 (100), 317 (15), 316 (15) MS ³ [625→479]: 317 (91), 316 (100) MS ⁴ [625→479→316]: 271 (100), 179 (24), 151 (52)	Myricetin-O-deoxyhexoside-O-hexoside
38	29.4	523	MS ² [523]: 313 (100) MS ³ [523→313]: 169 (100) MS ⁴ [523→313→169]: 125 (100)	Gallic acid derivative
39	30.4	543	MS ² [543]: 417 (100)	Unknown
40	34.0	301	MS ² [301]: 179 (71), 151 (100)	Quercetin *
41	35.5	547	MS ² [547]: 313 (100) MS ³ [547→313]: 169 (100), 125 (25) MS ⁴ [547→313→169]: 125 (100)	Gallic acid derivative
42	38.6	327	MS ² [327]: 291 (32), 229 (100), 211 (44), 171 (75)	Oxo-dihydroxy-octadecenoic acid
43	40.1	329	MS ² [329]: 229 (76), 211 (100), 171 (39)	Trihydroxy-octadecenoic acid
44	41.0	537	MS ² [537]: 443 (100), 417 (8), 385 (50), 151 (39)	Biflavone
45	42.1	537	MS ² [537]: 443 (34), 417 (14), 399 (15), 375 (100) MS ³ [537→375]: 331 (100)	Amentoflavone

*Identified by comparison with analytical standards

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.t001>

z 173, which is characteristic of 4-O-caffeoylquinic acid [32]. Compound 3 displayed MS³ [451→353] base peak at m/z 191, so we characterized it as a caffeoylquinic acid derivative. Finally, compound 15, with [M-H]⁻ at m/z 367, was characterized as a methylated derivative according to bibliographic information [33].

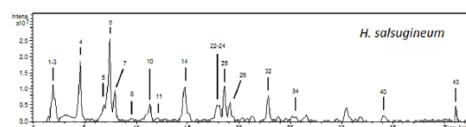


Fig 1. HPLC-ESI/MSⁿ base peak chromatogram (BPC) of the methanolic extract from *H. salsugineum*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.g001>

We observed two coumaroylquinic acids and identified them according to the hierarchical scheme proposed by Clifford, Johnston (32). Both compounds (**5** and **10**) presented $[M-H]^-$ at m/z 337, but different fragmentations. Compound **5** corresponded to 3-*p*-coumaroylquinic acid (MS^2 base peak at m/z 163), whereas **10** was 4-*p*-coumaroylquinic acid (MS^2 base peak at m/z 173).

Compound **12** exhibited deprotonated molecular ion at m/z 367 and base peak at m/z 191, a fragmentation pattern that corresponds to 5-feruloylquinic acid [32].

We detected three gallic acid derivatives, compounds **16**, **38**, and **41**—all of them presented the characteristic 169→125 fragmentation of gallic acid—but a complete identification could not be carried out.

Flavonoids. A high number of the identified compounds were flavonoids, most of them *O*-glycosides, which we will classify by the aglycone. The identification of the attached moieties (sugars) to the aglycone was based on the observed neutral losses such as hexosyl (162 Da), deoxyhexosyl (146 Da), glucuronyl (176 Da), and pentosyl (132 Da).

Six quercetin glycosides were detected. Compound **40** corresponded to the aglycone (comparison with an analytical standard). Compound **9** suffered neutral losses of 162 Da and 146 Da, so it corresponded to quercetin-*O*-hexoside-*O*-deoxyhexoside. Compounds **25** and **26** were quercetin-*O*-hexoside isomers due to the loss of 162 Da. Similarly, we identified compounds **30** and **32** as quercetin-*O*-pentoside and quercetin-*O*-deoxyhexoside, respectively.

Five myricetin conjugates were characterized, with myricetin aglycone— $[M-H]^-$ at m/z 317 and characteristic fragment ions at m/z 179 and 151—corresponding to compound **34**. Compound **13**, with a deprotonated molecular ion at m/z 631, suffered neutral losses of galloyl (152 Da) and hexosyl moieties 152 Da; it was myricetin-*O*-(*O*-galloyl)hexoside according to bibliography [34]. We characterized compound **14** as myricetin-*O*-hexoside, **21** as myricetin-*O*-dihexoside, **23** as myricetin-*O*-deoxyhexoside, and **37** as myricetin-*O*-deoxyhexoside-*O*-hexoside.

We detected three apigenin glycosides. Compound **17** presented deprotonated molecular ion at m/z 593, and its fragmentation pattern agreed with that of 6,8-di-*C*-glycosyl apigenin (vicenin-2) [35]. Compound **19**, with $[M-H]^-$ at m/z 563, presented fragment ions at m/z 413 and 293; we thus characterized it as an apigenin-*C*-hexoside-*O*-pentoside [36]. Finally, compound **33** displayed the neutral loss of 176 Da (glucuronide) to yield the aglycone at m/z 269, so we identified it as apigenin-*O*-glucuronide.

Compound **18** presented $[M-H]^-$ at m/z 521, and suffered neutral losses of hexosyl (521→359) and methoxyl (359→344, 344→329) moieties. This fragmentation pattern is consistent with polymethoxylated flavonoid hexosides.

Compound **31** and **36** corresponded to kaempferol-*O*-hexoside and luteolin-*O*-deoxyhexoside, respectively. The aglycones were characterized by comparison with analytical standards.

Finally, two biflavones were characterized. Compounds **43** and **45** presented the deprotonated molecular ions at m/z 537. On the one hand, the fragmentation pattern of compound **45** agreed with amentoflavone [37]. On the other hand, compound **44** was characterized as a biflavone, possibly biapigenin [38].

Other compounds. Compounds **1**, **27**, and **29** presented MS^n fragment ions at m/z 179, 161, 119, and 131, which have been previously reported in saccharides [39, 40]. We thus characterized these compounds as saccharides or saccharide derivatives.

Compound **8** was a formate adduct and presented the same fragmentation pattern than drovomifoliol-*O*-β-D-glucopyranoside, a terpenoid described by Li, Zhang [41], and reported as vomifoliol glucoside or roseoside by other authors [34].

We characterized tentatively compounds **42** and **43** as oxo-dihydroxy-octadecenoic and tri-hydroxy-octadecenoic acids, respectively, considering data from the scientific literature [42, 43].

Quantification of polyphenols

The concentrations of individual and total phenolics (TIPC) found in the analyzed extracts are shown in Table 2. It can be observed that phenolic acids represented the highest levels of phenolic compounds in *H. salsugineum* methanolic extract (approximately 80% of TIPC). The most abundant compounds were 3-*O*-caffeoylquinic acid (73 mg/g DE), 5-*O*-caffeoylquinic acid (51 mg/g DE) and a caffeoylquinic acid derivative (67 mg/g DE). The second most abundant group of compounds corresponded to flavonols, which were mainly composed of myricetin-*O*-hexoside (12.5 mg/g DE) and quercetin-*O*-hexoside isomers (19.2 mg/g DE). Finally, TIPC was 249 mg/g DE.

The concentrations of phenolic acids, as well as TIPC, compare favorably with the levels found in other *Hypericum* species. Jabeur, Tobaldini [44] reported a TIPC value of 110 mg/g in *H. androsaemum* extracts, approximately half the levels here observed. For 3-*O*-caffeoylquinic acid (3-CQA) and 5-*O*-caffeoylquinic acid, they observed concentrations of 11.6 and 40.1 mg/g extract, lower than the ones here observed. The levels of quercetin-*O*-hexoside isomers were similar in both cases. However, both the TIPC and phenolic acid concentrations reported in our studies are higher than those found in *H. androsaemum*. In *H. undulatum* [45], the levels of 3-CQA were also significantly lower (10–16 mg/g) than in the analyzed extracts of *H. salsugineum*. In *H. perforatum* shoots, only 3.1 mg/g of 3-CQA were reported [46], whereas quercetin hexoside and total flavonoid levels were also lower. Finally, 3-CQA levels in aerial parts of *H. origanifolium*, *H. montbretii*, and *H. perforatum* [47] were lower than the levels found in the present work, except for leaves of *H. montbretii*, which were 180 mg/g.

Table 2. Quantification of phenolic compounds in *H. salsugineum* (mg g⁻¹ DE).

N°.	Assigned identification	Concentration (mg g ⁻¹ DE)
<i>Phenolic acids</i>		
3	Caffeoylquinic acid derivative	67 ± 4
4	5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	51 ± 2
6	3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	73 ± 2
7	4- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	10.5 ± 0.7
10	4- <i>p</i> -coumaroylquinic acid	5.1 ± 0.5
Total		207 ± 5
<i>Flavonols</i>		
14	Myricetin- <i>O</i> -hexoside	12.5 ± 0.9
25	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	15.4 ± 0.8
26	Quercetin- <i>O</i> -hexoside	3.8 ± 0.3
32	Quercetin- <i>O</i> -deoxyhexoside	6.4 ± 0.3
34	Myricetin	0.83 ± 0.07
40	Quercetin	1.7 ± 0.1
Total		41 ± 1
<i>Flavones</i>		
33	Apigenin	0.3 ± 0.1
43	Biflavone	0.64 ± 0.05
Total		0.9 ± 0.1
TIPC		249 ± 6

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.t002>

Enzyme inhibitory effects and molecular modelling

Natural enzyme inhibitors are gaining interest to combat global health problems including Alzheimer's disease, Diabetes mellitus, hyperpigmentation, and hypertension. The prevalence of these diseases is critically increasing worldwide, and thus effective strategies are required to control these diseases. With this in mind, the discovery of natural and safe enzyme inhibitors is one of the most investigated subjects in the scientific platform. For this purpose, we tested enzyme inhibitory effects of *H. salsugineum* extract against cholinesterase, tyrosinase, amylase, and glucosidase. The results are illustrated in Table 3. The tested extract possessed considerable inhibitory potential on tyrosinase and glucosidase. However, the extract exhibited weak ability on cholinesterases and amylase. Although several studies were performed on the enzyme inhibitory properties of some *Hypericum* species [48–50], this work provides the first information concerning *H. salsugineum*. The observed activity of the extract might be explained taking into account its phytochemical composition. Apparently, the phytochemical analysis of the extract evidenced the presence of several bioactive compounds. In this context, molecular docking was performed to understand possible interactions between phytochemicals and enzymes. The most abundant substances were selected as targets in the molecular modelling studies.

The best docking scores for all the selected substances docked into the enzymatic pocket of our enzyme pool are reported in Table 4. We focused the *in silico* experiments only on the most involved enzymes, namely α -glucosidase and tyrosinase. The analysis of the docking scores revealed that the best fitting on tyrosinase was given by the selected flavonols, and partially by the caffeoylquinic acids. We have found caffeoylquinic acid derivatives to give poor interactions with this enzyme by the leaving open to the hypothesis that isoquercitrin, quercetin, isoquercetin, and myricetin-3-*O*-glucoside may be responsible for the excellent inhibition activity found for the extract (Fig 2). Moreover, also the docking study on α -glucosidase, have shown the limited interaction of caffeoylquinic acids to the enzymatic pocket and high docking scores for quercetin, isoquercitrin, quercetin, and myricetin-3-*O*-glucoside (Fig 3). This observation is in agreement with the literature data which reports a good antidiabetic activity of several herbals extracts containing high amount of quercetin [51], isoquercitrin [52], myricetin [53, 54] and their glucosides, by the inhibition of α -glucosidase, and the inhibition of tyrosinase by isoquercitrin and isoquercetin [55, 56].

Evaluation of anti-cancer efficacy

Hypericum species are one of the most intensely studied groups in the research area of drug design and discovery of natural products for their effective pharmacological contents [57]. Many different *Hypericum* species' anti-neoplastic effects have been reported in various cancer

Table 3. Enzyme inhibitory effects of *H. salsugineum*.

Assays	Results
Acetylcholinesterase (mgGALAE/g)	1.689 $\pm$ 0.150*
Butyrylcholinesterase (mgGALAE/g)	0.244 $\pm$ 0.029
Tyrosinase (mgKAE/g)	65.29 $\pm$ 0.41
α -Amylase (mmolACAE/g)	0.616 $\pm$ 0.073
α -Glucosidase (mmolACAE/g)	19.466 $\pm$ 0.704

* Values expressed are means $\pm$ S.D. of three parallel measurements. GALAE: Galantamine equivalent; KAE: Kojic acid equivalent; ACAE: Acarbose equivalent.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.t003>

Table 4. Docking scores obtained by Glide XP.

Compounds	α -Glucosidase	Tyrosinase
	Docking Score	Docking Score
Myricetin	-6.11	-6.898
Quercetin	-5.525	-6.959
3-O-caffeoylquinic a.	-7.147	-6.091
4-O-caffeoylquinic a.	-6.396	-6.698
5-O-caffeoylquinic a.	-8.034	-6.060
Myricetin-O-hexoside	-7.391	-9.221
Quercetin-O-hexoside	-8.221	-7.681
Quercetin	-5.384	-7.198
Isoquercitrin	-7.869	-8.290

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.t004>

types, and specific phytochemical libraries were generated for new drug formulations [58–63]. In this study, anti-neoplastic effects of *H. salsugineum* were evaluated for the first time.

Breast cancer, which is a heterogeneous and complex disease, is the most common malignancy among women worldwide [64, 65]. Due to variable tissue and receptor activities, patients cannot benefit from the same treatment protocol. Although surgery, chemotherapy, and radiotherapy are the primary treatment modalities in breast cancer, hormone and targeted treatment options are being added according to the progression and type of the disease [66–71]. Despite all these advanced treatment options, efforts are underway to reduce the side effects of the drugs and to develop more effective agents. We investigated the effects of *H. salsugineum* on the cellular phenotype of cell lines for the two major molecular subtypes of breast cancer, luminal and basal. MCF-7 and MDA-MB-231, are well known for their clinical, pathological, and immunological characteristics, and are widely used model cell lines in breast cancer research [72]. MCF-7 is a luminal-type breast cancer cell line expressing estrogen receptor and MDA-MB-231 is basal-type cell line and has no hormone receptors such as estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor-2. MDA-MB-231 was also reported to be in the Claudin-low class during recent classification studies [73–75].

We initially investigated the time and dose-dependent effects of *H. salsugineum* methanolic extract on the cells by using a real-time, label-free iCELLigence cell analysis system. Platform measures the impedance via gold microelectrodes placed at the bottom of the system-specific E plate L8 and monitors the values in real time, resulting in quantitative high-throughput cellular data [76, 77]. In our study, cells were treated between the range of 62.5 and 2000 $\mu\text{g/ml}$ of *H. salsugineum* extract and the effects were recorded in a total of 72 h. According to the obtained cell index values, cells were not viable following 2000 and 1000 $\mu\text{g/ml}$ of *H. salsugineum* treatment, whereas an inhibition profile was observed between the range of 500 to 62.5 $\mu\text{g/ml}$ treatments compared to the control (Fig 4). The IC₅₀ values were calculated as 365.3 $\pm$ 19.2 and 368 $\pm$ 4.2 $\mu\text{g/ml}$ for MCF-7 and MDA-MB-231, respectively. These results demonstrated that *H. salsugineum* displayed anti-proliferative effects on cells that were dynamically screened in a serial dose range and obtained IC₅₀ values indicated that it was not cytotoxic to cells.

To observe the long-term effects of *H. salsugineum* on breast cancer cell lines, colony formation assay was performed. Based on the proliferation data, the cells were treated with doses close to and below the IC₅₀ value of *H. salsugineum* extract for 14 days to determine the effect on the colony forming ability. Colony formation in both cell lines was significantly reduced with 62.5 and 125 $\mu\text{g/ml}$ of *H. salsugineum* treatment and was completely inhibited with 250

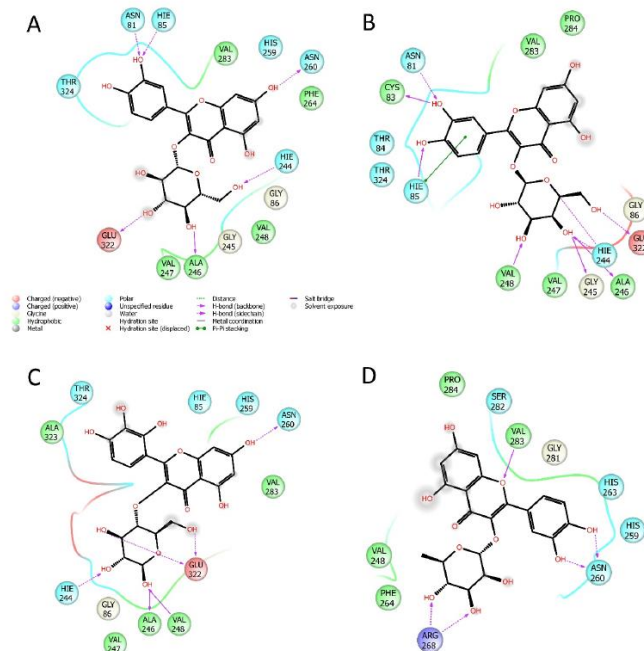


Fig 2. 2D representation of the best pose of (A) isoquercitrin, (B) isoquercetin, (C) myricetin-3-O-glucoside, (D) quercitrin docked in the catalytic pocket of tyrosinase.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.g002>

and 350 $\mu\text{g/ml}$ of the extract. *H. salsugineum* was more effective on MCF-7 cells than MDA-MB-231 cells for inhibition of colony formation (Fig 5) which may be explained by the more invasive and metastatic characteristics of MDA-MB-231 cell line. However, at 350 $\mu\text{g/ml}$, which is close to the determined IC_{50} values, *H. salsugineum* displayed evident stochastic effects in both cell lines.

For observing the effects of *H. salsugineum* on the migration capabilities of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, *in vitro* wound healing scratch assay was performed. Fig 6(A) shows the formed wounds at 0 h and the healing progression at 48 h. Cell migration was significantly reduced by 350 $\mu\text{g/ml}$ *H. salsugineum* treatment in both cell lines, 21.06 $\pm$ 3.9% in MCF-7 and 44.6 $\pm$ 2.2% in MDA-MB-231, compared to control (Fig 6B and 6C). Similar to the results of colony formation assay, *H. salsugineum* was less effective in MDA-MB-231 cells in reducing the ability to migrate.

The results of our three consecutive assays -proliferation, colony formation, and wound healing- clearly confirmed that *H. salsugineum* significantly inhibited cellular growth in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. We believe that the inhibition effects of *H. salsugineum* on breast cancer cell lines are due to the compounds that we have identified (Table 2). *H. salsugineum* contains chlorogenic acid derivatives as major phenolic compounds, and myricetin and quercetin derivatives as major flavonols. All these phenolic compounds' chemopreventive properties and mechanisms of action are well-described in the literature [78].

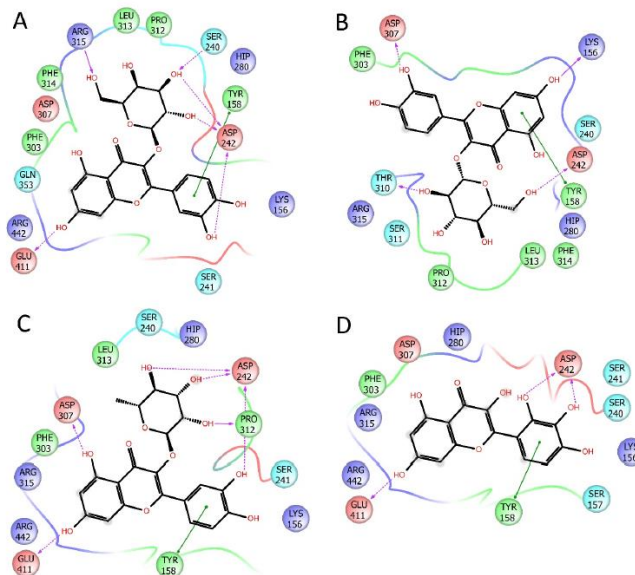


Fig 3. 2D representation of the best pose of (A) isoquercetin, (B) isoquercitrin, (C) quercitrin, (D) myricetin docked in the catalytic pocket of α -glucosidase.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.g003>

Focusing on recent breast cancer research, Jiao et al. reported that, myricetin suppressed the cell viability of MCF-7 cells mainly through p21-activated kinase 1 through downstream signaling of the β -catenin pathway [79]. In another study, Ranganathan et al. demonstrated that quercetin induces apoptosis in breast cancer cells through suppression of Twist via p38MAPK pathway [80]. Steiner, Davis [81] reported the dose-dependent positive effects of quercetin in transgenic mouse model of human breast cancer and identified the specific gene expression signature related to quercetin treatment. Chlorogenic acid, which is found in the human diet as one of the major active ingredients of many foods, was shown to suppress the proliferative and invasive phenotype of breast cancer cells [82–84]. The results of this study demonstrate that *H. salsugineum* methanolic extract has anti-cancer effects on the variable type of breast cancer cell lines with different comprehensive assays. Our findings and earlier research indicate that the inhibitory effects of *H. salsugineum* on breast cancer cells may be associated with these compounds and *H. salsugineum* can be used for new drug formulations with its bioactive content.

Conclusion

In recent years, biologically-active compounds have provided great potential as therapeutic agents to control significant health problems, such as Alzheimer's disease, type II diabetes, and cancer. Within the framework of this information, we focused on the biological potential and chemical characterization of *Hypericum salsugineum*. The tested extract possessed promising biological abilities with high levels of phenolic acids including 3-O-caffeoylquinic, 5-O-

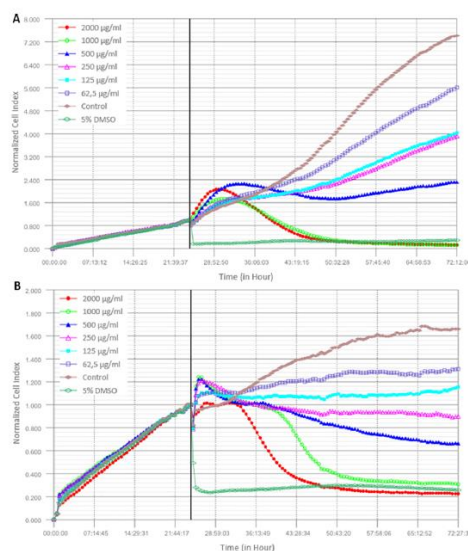


Fig 4. Anti-proliferative and cytotoxic effects of *H. salsugineum* methanolic extract on breast cancer cell lines via iCELLigence real time cell analysis system. (A) MCF-7 and (B) MDA-MB-231 cells were treated with varying concentrations (62.5 to 2000 µg/ml) of *H. salsugineum* methanolic extract. Charts were represented impedance measurements for 72h in real time and without any additional labelling. IC50 values are the means $\pm$ standard deviation of three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.g004>

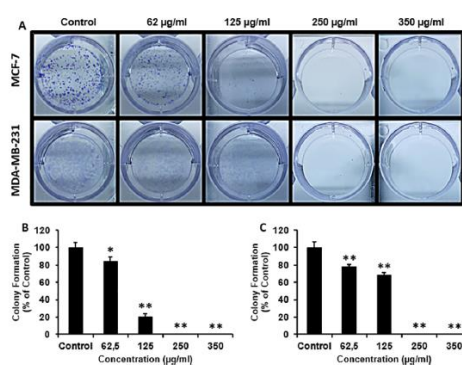


Fig 5. Colony formation ability of breast cancer cell lines by *H. salsugineum* methanolic extract treatment. (A) Representative images were showing colony formations for breast cancer cells which were treated with increasing concentrations (62.5 to 350 µg/ml) of *H. salsugineum* methanolic extract for 14 days. Histograms show the mean number of colonies in (B) MCF-7 and (C) MDA-MB-231. Values are the means $\pm$ standard deviation of three independent experiments. $P < 0.05$ is considered as statistically significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared to control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.g005>

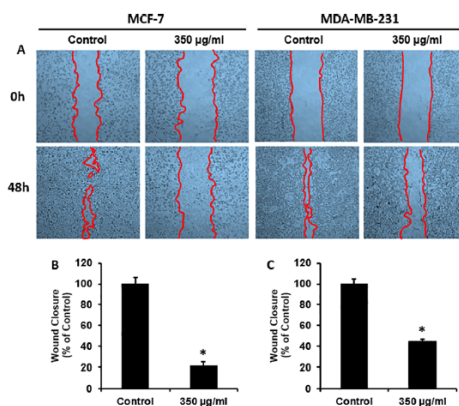


Fig 6. Inhibition of cell migration in breast cancer cell lines by wound healing assay after *H. salsugineum* methanolic extract treatment. Cells were scratched and treated with 350 µg/ml *H. salsugineum* methanolic extract for 48h. (A) Representative images were indicating wounded areas before and after treating of the cells. Closure rates were analyzed with ImageJ software. Bar graphs shows the mean of closure rates in (B) MCF-7 and (C) MDA-MB-231. The mean values and the $\pm$ standard deviation were obtained from three independent experiments. $P < 0.05$ is considered as statistically significant. * $P < 0.01$ compared to control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197815.g006>

caffeoylquinic, and 4-O-caffeoylquinic acids. It significantly inhibited cellular growth in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. The current findings add to a growing body of literature on the genus *Hypericum* and the promising results here reported can provide a basis to design new phytopharmaceuticals and cosmeceuticals from *H. salsugineum*. However, further experimental studies (animal or bioavailability studies, etc.) into *H. salsugineum* are strongly recommended.

Author Contributions

Conceptualization: Onur Bender, Gokhan Zengin, Ramazan Ceylan.

Data curation: Onur Bender, Eulogio J. Llorent-Martínez, Gokhan Zengin, Adriano Mollica, Ramazan Ceylan.

Formal analysis: Onur Bender, Eulogio J. Llorent-Martínez, Gokhan Zengin, Adriano Mollica, Ramazan Ceylan, Lucia Molina-García, Maria Luisa Fernández-de Córdoba, Arzu Atalay.

Methodology: Onur Bender, Eulogio J. Llorent-Martínez, Gokhan Zengin, Adriano Mollica, Ramazan Ceylan.

Resources: Eulogio J. Llorent-Martínez, Gokhan Zengin, Arzu Atalay.

Software: Adriano Mollica.

Supervision: Onur Bender, Gokhan Zengin, Arzu Atalay.

Validation: Onur Bender, Eulogio J. Llorent-Martínez, Gokhan Zengin, Adriano Mollica, Ramazan Ceylan, Lucia Molina-García, Maria Luisa Fernández-de Córdoba, Arzu Atalay.

Visualization: Onur Bender, Eulogio J. Llorent-Martínez, Gokhan Zengin, Adriano Mollica.

Writing – original draft: Onur Bender, Eulogio J. Llorent-Martínez, Gokhan Zengin, Adriano Mollica, Ramazan Ceylan, Lucia Molina-García, Maria Luisa Fernández-de Córdova, Arzu Atalay.

Writing – review & editing: Eulogio J. Llorent-Martínez, Gokhan Zengin, Arzu Atalay.

References

1. Bruňáková K, Čellárová E. Conservation strategies in the genus *Hypericum* via cryogenic treatment. *Frontiers in plant science*. 2016; 7:558. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00558> PMID: 27200032
2. Crockett SL, Robson NK. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Medicinal and aromatic plant science and biotechnology*. 2011; 5(Special Issue 1):1.
3. Antognoni F, Lianza M, Poli F, Buccioni M, Santinelli C, Caprioli G, et al. Polar extracts from the berry-like fruits of *Hypericum androsaemum* L. as a promising ingredient in skin care formulations. *Journal of ethnopharmacology*. 2017; 195:255–65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.029> PMID: 27864112
4. Aztopal N, Erkisa M, Celiker S, Ulukaya E, Ari F. Antigrowth and apoptosis inducing effects of *Hypericum olympicum* L. and *Hypericum adenotrichum* Spach. on lung cancer cells in vitro: Involvement of DNA damage. *Journal of Food Biochemistry*. 2016; 40(4):559–66.
5. Scheggi S, Marandino A, Del Monte D, De Martino L, Pelliccia T, del Rosario Fusco M, et al. The protective effect of *Hypericum connatum* on stress-induced escape deficit in rat is related to its flavonoid content. *Pharmaceutical biology*. 2016; 54(9):1782–92. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1127979> PMID: 26731632
6. Jiang L, Numonov S, Bobakulov K, Qureshi MN, Zhao H, Aisa HA. Phytochemical Profiling and Evaluation of Pharmacological Activities of *Hypericum scabrum* L. *Molecules*. 2015; 20(6):11257–71. <https://doi.org/10.3390/molecules200611257> PMID: 26096433
7. Sentkowska A, Biesaga M, Pyrzynska K. Effects of brewing process on phenolic compounds and antioxidant activity of herbs. *Food Science and Biotechnology*. 2016; 25(4):965–70.
8. Sakar M. Polyphenolic constituents of *Hypericum salsugineum*. *Fitoterapia*. 1990; 61(5).
9. Duman R. Antiherpetic activity of some endemic *Hypericum* species in Turkey. *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11(5):1240–4.
10. Maltas E, Uysal A, Yildizdagay E, Aladag MO, Yildiz S, Kucukoduk M. Investigation of antioxidant and antibacterial activities of some *Hypericum* species. *Fresenius Environ Bull*. 2013; 22:862–9.
11. Mocan A, Zengin G, Crişan G, Mollica A. Enzymatic assays and molecular modeling studies of *Schisandra chinensis* lignans and phenolics from fruit and leaf extracts. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016; 31(sup4):200–10. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1222585> PMID: 27595863
12. Mocan A, Zengin G, Simirgiotis M, Schafberg M, Mollica A, Vodnar DC, et al. Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017; 32(1):153–68. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1243535> PMID: 28095717
13. Savran A, Zengin G, Aktumsek A, Mocan A, Glamoclija J, Ćirić A, et al. Phenolic compounds and biological effects of edible *Rumex scutatus* and *Pseudosempervivum sempervivum*: potential sources of natural agents with health benefits. *Food & function*. 2016; 7(7):3252–62.
14. Llorent-Martínez E, Ortega-Barralés P, Zengin G, Uysal S, Ceylan R, Guler G, et al. *Lathyrus aureus* and *Lathyrus pratensis*: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of their enzyme inhibitory and antioxidant activities. *RSC Advances*. 2016; 6(92):88996–9006.
15. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. *Nucleic acids research*. 2000; 28(1):235–42. PMID: 10592235
16. Pesaresi A, Lamba D. Torpedo Californica Acetylcholinesterase In Complex With A Tacrine-Nicotinamide Hybrid Inhibitor.
17. Nachon F, Carletti E, Ronco C, Trovaslet M, Nicolet Y, Jean L, et al. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal*. 2013; 453(3):393–9. <https://doi.org/10.1042/BJ20130013> PMID: 23679855
18. Zhuo H, Payan F, Qian M. Crystal structure of the pig pancreatic α -amylase complexed with p-nitrophenyl- α -D-maltoside-flexibility in the active site. *The protein journal*. 2004; 23(6):379–87. PMID: 15517985

19. Yamamoto K, Miyake H, Kusunoki M, Osaki S. Steric hindrance by 2 amino acid residues determines the substrate specificity of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bio-engineering*. 2011; 112(6):545–50. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.08.016> PMID: 21925939
20. Ismaya WT, Rozeboom HJ, Weijn A, Mes JJ, Fusetti F, Wichers HJ, et al. Crystal structure of Agaricus bisporus mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*. 2011; 50(24):5477–86. <https://doi.org/10.1021/bi200395t> PMID: 21598903
21. Mocan A, Zengin G, Uysal A, Gunes E, Mollica A, Degirmenci NS, et al. Biological and chemical insights of *Morina persica* L.: A source of bioactive compounds with multifunctional properties. *Journal of Functional Foods*. 2016; 25:94–109.
22. Zengin G, Ceylan R, Katanić J, Mollica A, Aktumsek A, Boroja T, et al. Combining in vitro, in vivo and in silico approaches to evaluate nutraceutical potentials and chemical fingerprints of *Molikia aurea* and *Molikia coerulea*. *Food and Chemical Toxicology*. 2017.
23. Zengin G, Uysal A, Aktumsek A, Mocan A, Mollica A, Locatelli M, et al. *Euphorbia denticulata* Lam.: A promising source of phyto-pharmaceuticals for the development of novel functional formulations. *Bio-medicine & Pharmacotherapy*. 2017; 87:27–36.
24. Maestro S. Version 9.2. LLC, New York. 2011.
25. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *Journal of chemical information and modeling*. 2012; 52(7):1757–68. <https://doi.org/10.1021/ci3001277> PMID: 22587354
26. Shelley JC, Cholleti A, Frye LL, Greenwood JR, Timlin MR, Uchimaya M. Epik: a software program for pK a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of computer-aided molecular design*. 2007; 21(12):681–91. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9133-z> PMID: 17899391
27. Hevener KE, Zhao W, Ball DM, Babaoglu K, Qi J, White SW, et al. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropterolate synthase. *Journal of chemical information and modeling*. 2009; 49(2):444–60. <https://doi.org/10.1021/ci800293n> PMID: 19434845
28. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of medicinal chemistry*. 2006; 49(21):6177–96. <https://doi.org/10.1021/jm051256o> PMID: 17034125
29. Picot MCN, Bender O, Atalay A, Zengin G, Loffredo L, Hadji-Minaglou F, et al. Multiple pharmacological targets, cytotoxicity, and phytochemical profile of *Aphloia theiformis* (Vahl.) Benn. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017; 89:342–50.
30. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006; 1(5):2315. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339> PMID: 17406473
31. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007; 2(2):329–33. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30> PMID: 17406593
32. Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(10):2900–11. <https://doi.org/10.1021/jf026187q> PMID: 12720369
33. Simirgiotis MJ. Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules*. 2013; 18(2):2061–80. <https://doi.org/10.3390/molecules18022061> PMID: 23385342
34. Spínola V, Llorent-Martínez EJ, Gouveia S, Castilho PC. Myrica faya: A new source of antioxidant phytochemicals. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2014; 62(40):9722–35. <https://doi.org/10.1021/jf503540s> PMID: 25266067
35. Ferreres F, Silva BM, Andrade PB, Seabra RM, Ferreira MA. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*. 2003; 14(6):352–9. <https://doi.org/10.1002/pca.727> PMID: 14667061
36. Santos J, Oliveira M, Ibanez E, Herrero M. Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1327:118–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.085> PMID: 24438834
37. Wang J, Liu S, Ma B, Chen L, Song F, Liu Z, et al. Rapid screening and detection of XOD inhibitors from *S. tamariscina* by ultrafiltration LC-PDA-ESI-MS combined with HPCCC. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2014; 406(28):7379–87. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8132-x> PMID: 25240932
38. Zhang Y, Liu C, Zhang Z, Wang J, Wu G, Li S. Comprehensive separation and identification of chemical constituents from *Apocynum venetum* leaves by high-performance counter-current chromatography and high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2010; 878(30):3149–55.

39. Brudzynski K, Miotto D. Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chemistry*. 2011; 127(3):1023–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.075> PMID: 25214092
40. Verardo G, Duse I, Callea A. Analysis of underivatized oligosaccharides by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with post-column addition of formic acid. *Rapid communications in mass spectrometry*. 2009; 23(11):1607–18. <https://doi.org/10.1002/rcm.4047> PMID: 19408275
41. Li X, Zhang Y, Zeng X, Yang L, Deng Y. Chemical profiling of bioactive constituents in *Sarcandra glabra* and its preparations using ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011; 25(17):2439–47. <https://doi.org/10.1002/rcm.5123> PMID: 21818803
42. Levandi T, Püssa T, Vahter M, Toomik P, Kaljurand M. Oxidation products of free polyunsaturated fatty acids in wheat varieties. *European journal of lipid science and technology*. 2009; 111(7):715–22.
43. Van Hoyweghen L, De Bosscher K, Haegeman G, Deforce D, Heyerick A. In Vitro Inhibition of the Transcription Factor NF- κ B and Cyclooxygenase by Bamboo Extracts. *Phytotherapy Research*. 2014; 28(2):224–30. <https://doi.org/10.1002/ptr.4978> PMID: 23559516
44. Jabeur I, Tobaldini F, Martins N, Barros L, Martins I, Calhelha RC, et al. Bioactive properties and functional constituents of *Hypericum androsaemum* L.: A focus on the phenolic profile. *Food Research International*. 2016; 89:422–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.040> PMID: 28460934
45. Rainha N, Koci K, Coelho AV, Lima E, Baptista J, Fernandes-Ferreira M. HPLC–UV–ESI–MS analysis of phenolic compounds and antioxidant properties of *Hypericum undulatum* shoot cultures and wild-growing plants. *Phytochemistry*. 2013; 86:83–91. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.006> PMID: 23141168
46. Tusevski O, Stanoeva JP, Stefova M, Pavkovic D, Simic SG. Identification and quantification of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. transgenic shoots. *Acta physiologiae plantarum*. 2014; 36(10):2555–69.
47. Öztürk N, Tunçel M, Potoğlu-Erkara İ. Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. perforatum*. *Pharmaceutical biology*. 2009; 47(2):120–7.
48. Bejaoui A, Ben Salem I, Rokbeni N, M'Rabet Y, Boussaid M, Boullia A. Bioactive compounds from *Hypericum humifusum* and *Hypericum perforatum*: inhibition potential of polyphenols with acetylcholinesterase and key enzymes linked to type-2 diabetes. *Pharmaceutical Biology*. 2017; 55(1):906–11. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1270973> PubMed PMID: WOS:000395131900019. PMID: 28147885
49. Mandrone M, Lorenzi B, Venditti A, Guarcini L, Bianco A, Sanna C, et al. Antioxidant and anti-collagenase activity of *Hypericum hircinum* L. *Industrial Crops and Products*. 2015; 76:402–8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.012> PubMed PMID: WOS:000364890600050.
50. Zheleva-Dimitrova D, Nedialkov P, Momkov G. Benzophenones from *Hypericum elegans* with antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory potential. *Pharmacognosy Magazine*. 2013; 9(36):1–5. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.117846> PubMed PMID: WOS:000330987200001. PMID: 24143038
51. Kumar S, Narwal S, Kumar V, Prakash O. α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy reviews*. 2011; 5(9):19. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79096> PMID: 22096315
52. Lobo JFR, Vinther JM, Borges RM, Staerk D. High-resolution α -glucosidase inhibition profiling combined with HPLC–HRMS–SPE–NMR for identification of antidiabetic compounds in *Eremanthus crotonoides* (Asteraceae). *Molecules*. 2016; 21(6):782.
53. Kang S-J, Park J-HY, Choi H-N, Kim J-I. α -glucosidase inhibitory activities of myricetin in animal models of diabetes mellitus. *Food Science and Biotechnology*. 2015; 24(5):1897–900.
54. Meng Y, Su A, Yuan S, Zhao H, Tan S, Hu C, et al. Evaluation of total flavonoids, myricetin, and quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. As inhibitors of α -amylase and α -glucosidase. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2016; 71(4):444–9. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0581-2> PMID: 27787697
55. Arung ET, Furuta S, Ishikawa H, Tanaka H, Shimizu K. Melanin Biosynthesis Inhibitory and Antioxidant Activities of Quercetin-3'-O- β -D-glucoside Isolated from *Allium cepa*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2011; 66(5–6):209–14.
56. de Freitas MM, Fontes PR, Souza PM, Fagg CW, Guerra ENS, de Medeiros Nóbrega YK, et al. Extracts of *morus nigra* L. Leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: Tyrosinase inhibition and cytotoxicity. *PloS one*. 2016; 11(9):e0163130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163130> PMID: 27655047
57. Wölflle U, Seelinger G, Schempp CM. Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta medica*. 2014; 80(02/03):109–20.

58. Haefeli WE, Carls A. Drug interactions with phytotherapeutics in oncology. Expert opinion on drug metabolism & toxicology. 2014; 10(3):359–77.
59. Kleemann B, Loos B, Scriba TJ, Lang D, Davids LM. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photo-medicine: Hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death. PLoS one. 2014; 9(7):e103762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103762> PMID: 25076130
60. Madunić J, Matulić M, Friščić M, Pilepić KH. Evaluation of the cytotoxic activity of *Hypericum* spp. on human glioblastoma A1235 and breast cancer MDA MB-231 cells. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 2016; 51(13):1157–63.
61. Sarimahmut M, Balıkcı N, Celikler S, Ari F, Ulukaya E, Guleryuz G, et al. Evaluation of genotoxic and apoptotic potential of *Hypericum adenotrichum* Spach. in vitro. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2016; 74:137–46. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.010> PMID: 26617407
62. Xavier CP, Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. *Hypericum androsaemum* water extract inhibits proliferation in human colorectal cancer cells through effects on MAP kinases and PI3K/Akt pathway. Food & function. 2012; 3(8):844–52.
63. Zhao J, Liu W, Wang JC. Recent advances regarding constituents and bioactivities of plants from the genus *Hypericum*. Chemistry & biodiversity. 2015; 12(3):309–49.
64. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer. 2015; 136(5).
65. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015; 65(2):87–108.
66. Bange J, Zwick E, Ullrich A. Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. Nature medicine. 2001; 7(5):548. <https://doi.org/10.1038/87872> PMID: 11329054
67. Collaborators MWS. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. The Lancet. 2003; 362(9382):419–27.
68. Group EBCTC. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. The Lancet. 2005; 365(9472):1687–717.
69. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. The Journal of clinical investigation. 2011; 121(7):2750. <https://doi.org/10.1172/JCI45014> PMID: 21633166
70. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. The Journal of clinical investigation. 2011; 121(10):3786. <https://doi.org/10.1172/JCI60534> PMID: 21965334
71. Shao W, Brown M. Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. Breast Cancer Research. 2003; 6(1):39. <https://doi.org/10.1186/bcr742> PMID: 14680484
72. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast cancer research. 2011; 13(4):215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889> PMID: 21884641
73. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. Cancer cell. 2006; 10(6):515–27. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008> PMID: 17157791
74. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van De Rijn M. Molecular portraits of human breast tumours. nature. 2000; 406(6797):747. <https://doi.org/10.1038/35021093> PMID: 10963602
75. Sabatier R, Finetti P, Guille A, Adelaide J, Chaffanet M, Viens P, et al. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization. Molecular cancer. 2014; 13(1):228.
76. Bird C, Kirstein S. Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system. Nature methods. 2009; 6(8).
77. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. 2011:33–43.
78. Siddiqui JA, Singh A, Chagtoo M, Singh N, Godbole MM, Chakravarti B. Phytochemicals for breast cancer therapy: current status and future implications. Current cancer drug targets. 2015; 15(2):116–35. Epub 2014/12/30. PMID: 25544650.
79. Jiao D, Zhang XD. Myricetin suppresses p21-activated kinase 1 in human breast cancer MCF-7 cells through downstream signaling of the β -catenin pathway. Oncology reports. 2016; 36(1):342–8. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4777> PMID: 27122002
80. Ranganathan S, Halagowder D, Sivasithambaram ND. Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. PLoS one. 2015; 10(10):e0141370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141370> PMID: 26491966

81. Steiner J, Davis J, McClellan J, Enos R, Carson J, Fayad R, et al. Dose-dependent benefits of quercetin on tumorigenesis in the C3 (1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer. *Cancer biology & therapy*. 2014; 15(11):1456–67.
82. Mileo AM, Di Venere D, Linsalata V, Fraioli R, Miccadei S. Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB231. *Journal of cellular physiology*. 2012; 227(9):3301–9. <https://doi.org/10.1002/jcp.24029> PMID: 22170094
83. Noratto G, Porter W, Byrne D, Cisneros-Zevallos L. Identifying peach and plum polyphenols with chemopreventive potential against estrogen-independent breast cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009; 57(12):5219–26. <https://doi.org/10.1021/jf900259m> PMID: 19530711
84. Zhang L, Liu R, Niu W. Phytochemical and antiproliferative activity of proso millet. *PloS one*. 2014; 9(8): e104058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104058> PMID: 25098952