

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

REKOMBİNANT ROR1 TİROZİN KİNAZ ANTİJENİNİN ÜRETİLMESİ

Merve Samur

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Arzu Atalay

Haziran

2022

ETİK BEYAN

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

Merve Samur

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Arzu Atalay danışmanlığında Merve Samur tarafından hazırlanan bu çalışma 21/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr.Hakan Gürdal

İmza:

Üye: Doç.Dr.Fusun Özmen

İmza:

Üye: Doç.Dr.Arzu Atalay

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Rekombinant ROR1 Tirozin Kinaz Antijeninin Üretilmesi

Merve Samur

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman Öğretim Üyesi Doç. Dr. Arzu Atalay

Reseptör tirozin kinaz benzeri orphan reseptör 1 (ROR1), tirozin kinaz reseptör ailesinin bir üyesi, onkoembriyonik transmembran proteindir. Emriyogenez sırasında normal ifade edilmekte, sağlıklı yetişkin dokularda ifadesi baskılanırken birçok hematolojik ve solid malignitede kanser hücre yüzeyinde aşırı ifade edilmektedir. ROR1 ligand bağlanma alanına Wnt5a endojen ligandın bağlanması ile ROR1 aktive edilir ve aktivasyon artan hücre içi sinyalleşme, tümör büyümesi, hayatta kalması, terapi direnci gibi tümör gelişimi ve ilerlemesine katkı sağlayan hücresel süreçler ile sonuçlanır. ROR1'in kanser gelişimi ve ilerlemesine sağladığı fonksiyonel katkının anlaşılması ROR1'i, yeni immünoterapiler için potansiyel bir hedef haline getirmiştir. Klinik öncesi ve klinik çalışmalarda ROR1'i hedefleyen antikor bazlı immünoterapiler geliştirilmiş ve yenileri geliştirilmeye devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında ROR1 hücre dışı alanının tamamını kapsayan ve ROR1 hücre dışı alanında bulunan fzd+kringle alanlarını kapsayan iki bölgeye karşı Histidin taq konjuge rekombinant protein üretilmiştir. Bu amaçla ilgili diziler klonlanmış, bakteriyel pET30 ekspresyon sistemi ile ifade ettirilmiş ve Ni-NTA rezin kullanılarak saflaştırılmıştır. Üretilmiş bu iki rekombinant protein, ileride hibridoma teknolojisi ile anti-ROR1 nötralizan monoklonal antikor geliştirilmesi için antijen olarak kullanılacaktır.

2022, 80 sayfa

Anahtar kelimeler: ROR1 reseptör kinaz, Hücre dışı alan, Antijen, pET-30 ifade sistemi.

ABSTRACT

MSc Thesis

Production of Recombinant ROR1 Tyrosine Kinase Antigen

Merve Samur

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Arzu Atalay

Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) is a member of the tyrosine kinase receptor family that is an oncoembryonic transmembrane protein. ROR1 is normally expressed during embryogenesis, generally repressed in normal healthy adult tissues and overexpressed on the cancer cell surface in various solid and hematological malignancies. Binding of the Wnt5a endogenous ligand to the ROR1 ligand binding site activates ROR1, enhanced intracellular signaling and results in cellular processes that drive tumor development and progression, such as increased intracellular signaling, tumor growth, survival, and therapy resistance. Understanding the functional contribution of ROR1 to cancer development and progression has made ROR1 a potential target for new immunotherapies. Antibody-based immunotherapies targeting ROR1 have been developed in preclinical and clinical studies and new ones are under development.

In this thesis, Histidine tag conjugated recombinant protein was produced against two regions covering the entire ROR1 extracellular domain and fzd+kringle domains in the ROR1 extracellular domain. For this, the related sequences were cloned, expressed by the bacterial pET30 expression system and purified using Ni-NTA resin. These two recombinant proteins have been produced, will be used as antigens for the development of anti-ROR1 neutralizing monoclonal antibodies by hybridoma technology in the future.

2022, 80 sayfa

Anahtar kelimeler: ROR1 receptor kinase, Extracellular domain, Antigen, pET-30 expression system.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm bilgi ve tecrübesini bana aktarmaya çalışan, tecrübeleri ve yol göstericiliği ile her an yanımda olan, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Arzu ATALAY'a,

Kıymetli düşünceleri ve fikirleriyle tez çalışmamda bana yardımcı olan, çalışma arkadaşlarım Ahmet Kaan DİKİCİ ve Rümeysa DOĞAN'a,

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Sistem Biyoteknolojisi İleri Araştırma Birimi çalışanlarına,

Hayatım boyunca beni her konuda maddi ve manevi olarak desteleyen, her zaman yanımda olan, varlıkları hayattaki en büyük şansım olan, çok kıymetli aileme, anneme, babama ve abilerime,

Teşekkürlerimle.

Merve SAMUR

Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. ROR1.....	2
2.1.1. ROR1 YAPISI VE BİYOLOJİK FONKSİYONLARI	2
2.1.2. ROR1'İN DÜZENLEDİĞİ SİNYAL YOLAKLARI	4
2.2. ROR1 VE KANSER.....	6
2.3. ROR1 HEDEFLİ AJANLAR	8
2.3.1. ANTI-ROR1 TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ.....	9
2.3.2. ANTI-ROR1 MONOKLONAL ANTİKORLAR.....	9
3. GEREKÇE VE AMAC.....	11
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	12
4.1. MATERYAL.....	12
4.1.1. HÜCRE HATLARI	12
4.1.2. PLAZMİD VE BAKTERİ SUŞLARI	12

4.1.3. REAKTİF VE KİMYASALLAR	12
4.1.4. SOLÜSYON VE TAMPONLAR	14
4.1.5. KİTLER	16
4.2. YÖNTEM.....	16
4.2.1. GENEL YÖNTEMLER	16
4.2.1.1. Kompetan Hücre Hazırlanması	16
4.2.1.2. Bakteriyel Transformasyon	17
4.2.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi	17
4.2.1.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	18
4.2.1.5. İmmünblotlama.....	18
4.2.1.6. Coomassie Blue Boyaması.....	19
4.2.1.7. Hücre Hatlarının Kültür Koşulları	20
4.2.2. ROR1 KLONLANMASI	21
4.2.2.1. ROR1 RNA ve CDNA Eldesi	21
4.2.2.2. Primer Tasarımı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	22
4.2.2.2.1. Primer Tasarımı	22
4.2.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23
4.2.2.2.3. Agaroz Jelden PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	23
4.2.2.3. PET30A(+) ve İnsert PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri İle Kesilmesi.....	24
4.2.2.4. Ligasyon Ve Transformasyon	25
4.2.2.5. Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonu	26

4.2.2.6. Klonlama Reaksiyonu Doğrulama.....	27
4.2.3. REKOMBİNANT ROR1 PROTEİN İFADESİ.....	28
4.2.3.1. ROR1 Rekombinant Proteinin Küçük Ölçekli İndüklenmesi	28
4.2.3.2. ROR1 Rekombinant Protein Çözünürlük Testi.....	29
4.2.1. REKOMBİNANT ROR1 PROTEİN SAFLAŞTIRILMASI.....	30
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	31
5.1. TOTAL RNA İZOLASYONU	31
5.2. ANTİJENİK BÖLGE BELİRLENMESİ VE ÇOĞALTILMASI	31
5.3. ROR1 HÜCRE DIŞI ALANI VE ROR1 FZ + KRINGLE ALANININ PET30(A)+ İFADE PLAZMİDİNE KLONLANMASI	32
5.3.1. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM	33
5.3.2. LİGASYON VE TRANSFORMASYON	35
5.3.3. KOLONİLERDEN PLAZMİD DNA İZOLASYONU.....	35
5.3.4. ROR1 KLONLAMA KONTROLÜ.....	36
5.4. REKOMBİNANT ROR1 PROTEİN İFADESİNİN İNDÜKLENMESİ.....	40
5.4.1. ROR1 REKOMBİNANT PROTEİN ÇÖZÜNÜRLÜK TESTİ.....	41
5.5. REKOMBİNANT ROR1 S VE ROR1 L SAFLAŞTIRILMASI	42
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	46
6.1. TARTIŞMA	46
6.2. SONUÇ.....	49
<u>KAYNAKLAR.....</u>	50
<u>EKLER.....</u>	56
EK 1: PET-30A(+) PLAZMİD HARİTASI	56

EK 2: KLONLANAN ROR1 NÜKLEOTİD VE AMİNO ASİT DİZİLERİ.....	57
EK 3: DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARININ HEDEF ROR1S NÜKLEOTİD DİZİSİ İLE ÇOKLU HİZALANMASI	58
EK 4: DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARININ HEDEF ROR1L NÜKLEOTİD DİZİSİ İLE ÇOKLU HİZALANMASI	60
EK 5: PEPTİD DİZİSİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER	62
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>63</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>64</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. ROR1 kromozomal lokasyonu (13).	2
Şekil 2.2. ROR1 alan yapıları (7).	4
Şekil 2.3.ROR1 sinyal iletim yolları (27).	6
Şekil 4.1. DNA molekül ağırlığı belirteci.	18
Şekil 5.1.RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü.....	31
Şekil 5.2. ROR1 L ve ROR1 S PCR Ürününün Agaroz Jel Görüntüsü.....	32
Şekil 5.3. ROR1 S ve ROR1 L PCR Saflaştırma Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü.....	33
Şekil 5.4. BamHI ve Sall RE ile kesildikten sonra agaroz jel görüntüsü.	34
Şekil 5.5. Ligasyon öncesi saflaştırma kontrolü (Agaroz Jel).....	35
Şekil 5.6. Kolonilerden plazmid DNA izolasyonu.	36
Şekil 5.7. T7 Primerleri insert kontrolü.	37
Şekil 5.8.Ligasyon sonrası plazmidlerin BamHI ve Sall enzimleriyle kesim kontrolü.	38
Şekil 5.9. T7 F Primeri ile okunan ROR1S DNA dizisi kromotogram görüntüsü.	39
Şekil 5.10.T7 R Primeri ile okunan ROR1S DNA dizisi kromotogram görüntüsü.....	39
Şekil 5.11.T7 F Primeri ile okunan ROR1L DNA dizisi kromotogram görüntüsü.	39
Şekil 5.12.T7 R Primeri ile okunan ROR1L DNA dizisi kromotogram görüntüsü	40
Şekil 5.13.ROR1S / ROR1L İmmünblotlama ile Analizi.	41
Şekil 5.14.ROR1 S ve ROR1 L rekombinant proteininin protein çözünürlük testi (Coomassie boyama).....	42
Şekil 5.15.ROR1 S saflaştırma (Coomassie boyama).	43

Şekil 5.16.ROR1 L saflaştırma (Coomasie boyama).....	44
Şekil 5.17.ROR1 S ve ROR1 L saflaştırma.	45



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. ROR1 hedefli tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar	8
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan reaktif ve kimyasallar	13
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan kitler.	16
Çizelge 4.3. cDNA sentezi RT-Mix Hazırlama	22
Çizelge 4.4. PCR koşulları	23
Çizelge 4.5. Restriksiyon Enzim Kesim Koşulları	24
Çizelge 4.6. Ligasyon reaksiyonu	26
Çizelge 4.7. T7 F/R PCR bileşen miktarları ve koşulları	27

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ADCC	Antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksiste
ATCC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
ddH ₂ O	Çift distile su
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ECD	Ekstraselüler alan
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
IPTG	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
KLL	Kronik Lenfositer Lösemi
KRD	Kringle alanı
LB	Luria Broth
M	Molar
MAPK	Mitojenle etkinleşen protein kinaz
mAb	Monoklonal antikor
NRG	Nörogulin

NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
OD	Optik yoğunluk
PI3-K	Fosfoinositid-3 Kinaz
RTK	Reseptör tirozin kinaz
TAA	Tümörle ilgili antijenler
TKI	Tirozin kinaz inhibitörü
TBS	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TBS-T	Tween-20 içeren tris tamponlu tuz çözeltisi
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde önde gelen önemli bir halk sağlığı sorunudur ve küresel ölçekte ikinci ölüm nedenidir (1). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından üretilen GLOBOCAN verilerine göre, 2020 yılında 19,3 milyon kişiye kanser teşhisi konulmuştur ve yaklaşık 10 milyon kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir (2). Kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynayan temel biyolojik nedenlerin anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalar, kanser hücrelerinin gelişiminde ve ilerlemesinde anahtar role sahip bir dizi moleküler anomalinin keşfedilmesine yol açmıştır (3). Son yıllarda kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde hayati role sahip çeşitli tümörle ilgili antijenlerin (TAA) tanımlanması, bu antijenlerin kanser tedavisi ve teşhisinde hedeflenmesine yönelik ilginin artışına neden olmuştur (4). Kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen molekülleri hedeflemek için çeşitli tedavi stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Monoklonal antikorlar da molekülleri hedeflemek amacıyla geliştirilmiş, başarılı terapötik stratejilerden biridir.

Reseptör tirozin kinaz benzeri orphan reseptör 1 (ROR1), reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan ROR ailesinin iki üyesinden biridir. ROR1, embriyonik gelişim sırasında farklılaşma, çoğalma, göç ve hayatta kalma ile ilgili hücrel süreçlerde önemli rol oynayan transmembran glikoproteindir. Embriyonik gelişim sırasında yüksek olan ROR1 ifade seviyesi, doğum sonrası yetişkin doku hücrelerinde büyük ölçüde aşağı regüle edilmektedir (5). ROR1 ifadesini normal doku ve tümör biyopsi örneklerinde analiz eden birçok çalışma, sağlıklı donörlerden alınan normal dokularda düşük seviyede olan ROR1 ifadesinin, kanser hücrelerinde yüksek seviyelerde olduğunu belirtmiştir. Hematolojik ve solid malignitelerde aşırı ifade edilen ROR1, hücre proliferasyonu, hücre göçü, hücre invazyonu ve apoptoz inhibisyonu gibi kanser gelişimi ve ilerlemesine katkı sağlayan hücrel süreçleri aktive etmektedir. ROR1'in kanser gelişimi ve ilerlemesine sağladığı katkının anlaşılması, kanser kaynaklı mortaliteyi azaltmak ve hastaların sağ kalım süresini uzatmak için ROR1'in yeni ilaç hedefleri olarak kullanılabilmesini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında anti-ROR1 monoklonal antikor geliştirilmesi amacı ile ROR1 hücre dışı alanında iki bölge rekombinant protein olarak klonlanmış, bakteriyel pET30 ekspresyon sistemi ile ifade ettirilmiş ve Ni-NTA rezin kullanılarak saflaştırılmıştır.

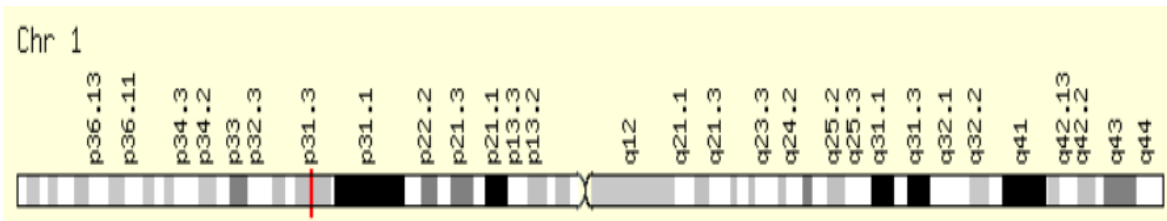
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. ROR 1

Reseptör tirozin kinaz benzeri orphan reseptör 1 (ROR 1), reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesinin üyesi olan bir transmembran proteindir. 1992 yılında insan nöroblastom hücre hattında tanımlanmıştır (6). Uzun yıllar boyunca ROR proteinleri endojen ligandları ve ilişkili sinyal yolları keşfedilmediği ve tanımlanmadığı için ‘yetim’ reseptör olarak adlandırılmış olsalar da son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde ROR1’in Wnt ligandları için reseptör olarak hareket ettiği, Wnt5a'nın birincil ligand olduğu ve kanonik olmayan Wnt yolunun aktivasyonuna aracılık ettiği belirlenmiştir (7). ROR 1, embriyonik gelişim sırasında kemikler ve iskelet kasları dahil olmak üzere çeşitli dokuların/organların morfogenezinde ve oluşumunda önemli rol oynamaktadır (8). Embriyogenez sırasında önemli rol oynayan ROR1’in doğumdan sonra yetişkin dokularda ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir (9). ROR1’in insan yetişkin dokularından, mide, kolon, mesane, uterus, testis, akciğer, paratiroid ve primer fibroblast bölgelerinde sadece çok düşük seviyelerde ifade edildiği, pankreas ve yağ dokusunda ise bu oranın biraz daha yüksek olduğu bulunmuştur (10).

2.1.1. ROR1 YAPISI VE BİYOLOJİK FONKSİYONLARI

ROR1, insanda 1. kromozomun kısa kolunun p31.3 bölgesinde lokalize olan 5858 baz çiftinden oluşan bir gen (ENST00000371079.6) tarafından kodlanan, 937 amino asit uzunluğunda bir transmembran proteindir (Şekil 2.1.) (11). Proteinin moleküler ağırlığı, glikosilasyon modeline bağlı olarak 100 ile 130 kDa arasında değişmektedir (12).



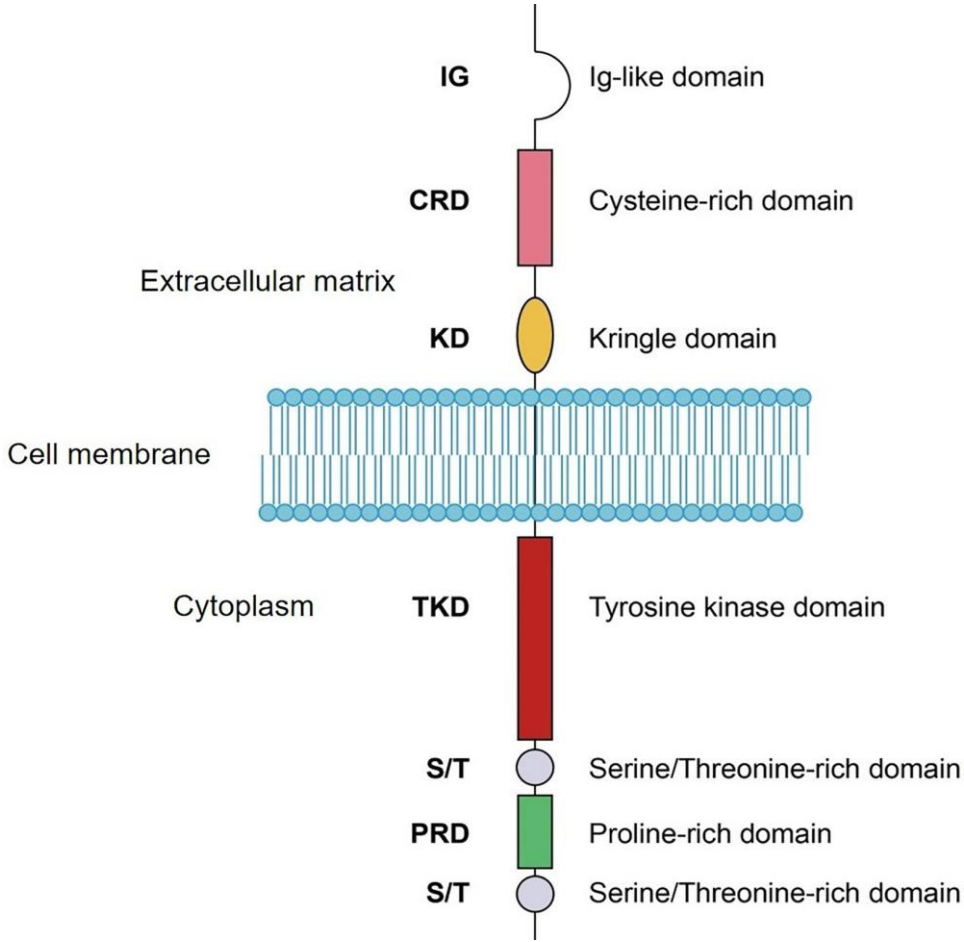
Şekil 2.1. ROR1 kromozomal lokasyonu (13).

ROR1, bir hücre dışı alan, bir transmembran alan ve bir hücre için alan içeren transmembran reseptörüdür (6). ROR 1 reseptörünün hücre dışı alanı, immüoglobulin benzeri alan (IG), Frizzled alanı (FZD) olarak adlandırılan sistein açısından zengin bir alan (CRD) ve bir

Kringle alanı (KRD) içermektedir ardından hücre dışı alanı sitoplazmik alana bağlayan transmembran alan gelmektedir ve hücre içi sitoplazmik alan bir tirozin kinaz alanı, iki adet serin/treonin bakımından zengin alan tarafından çevrelenen prolin bakımından zengin bir alan içermektedir (Şekil 2.2.) (14). ROR1 CRD alanı, FZD reseptörlerinininkine benzerlik göstermektedir ve WNT ligandlarının bağlanması için temel alan olarak tanımlanmıştır. Wnt5a endojen ligandı CRD alanına bağlanarak kanonik olmayan WNT sinyalini modüle etmektedir (15). KRD alanı ROR1'in diğer reseptörler ile etkileşimine aracılık etmektedir (16). KRD alanına sahip olan tek reseptör tirozin kinaz ailesi üyeleri ROR1 ve ROR2'dir, ROR1/ROR2 hetero-oligomerizasyonu için gereklidir (17). Prolin açısından zengin alan, SRC homoloji 3 (SH3) alanı taşıyan proteinler tarafından tanınmaktadır ve böylece protein-protein etkileşimlerine aracılık ederek hücre göçü ve çoğalma sinyallerinin aktivasyonunda rol oynamaktadır (18). Serin/treonin açısından zengin alan, adaptör proteinlerle fiziksel olarak etkileşime girerek apoptoza karşı dirence neden olmaktadır (17). ROR1, tirozin kinaz alanı, reseptör tirozin kinazlarda yüksek oranda korunmuş olan, fosfotransferaz aktivitesi için önemli birkaç kalıttan yoksundur ve bunların arasında üç tanesi C482G, K614R ve L634F katalitik merkezde bulunmaktadır bu nedenle azaltılmış kinaz aktivitesine sahiptir ve psödokinazlar olarak sınıflandırılmaktadır (19).

ROR1 biyolojik fonksiyonlarının araştırılması in situ hibridizasyon tekniği ve mutant knockout fareler kullanılmıştır. ROR1 knockout farelerde, iskelette, kalpte veya yüzde herhangi bir morfolojik anormallik gözlenmemiştir, ancak doğumdan sonraki 24 saat içinde muhtemelen solunum yetmezliği nedeniyle ölmüşlerdir (20). Fareler ile yapılan çalışmalar sonucunda, ROR1'in esas olarak embriyogenez sırasında merkezi sinir sisteminin, iskelet sisteminin ve akciğerin gelişiminde rol oynadığı tespit edilmiştir (21). İskelet ve nöral organogenezde önemli bir rol oynayan ROR1'in embriyonik gelişim sırasında yüksek seviyelerde ifade edildiği ancak doğumdan sonra yetişkin dokularında ifadesinin azaldığını gözlemlenmiştir (22). ROR1, embriyogenez sırasında metabolizma sinyalizasyonu ve hücre sinyalleşmesi, hücre polarite oluşturma, hücre farklılaşması, anjiyogenez, hücre göçü ve hücre istilasısı gibi önemli hücresel süreçlerde rol oynamaktadır (23). ROR1, doğum sonrası yetişkin dokuların çoğunda ya yoktur ya da düşük seviyelerde ifade edilmektedir (7). Yetişkin dokularda ROR1'in biyolojik işlevi şu anda tam olarak anlaşılmasına rağmen artan sayıda çalışma ROR1'in insan kanserleriyle yüksek oranda ilişkili olduğunu, tümör

hücrelerinde hem mRNA hem de protein seviyelerinde ROR1'in aşırı ifade edildiğini göstermektedir.



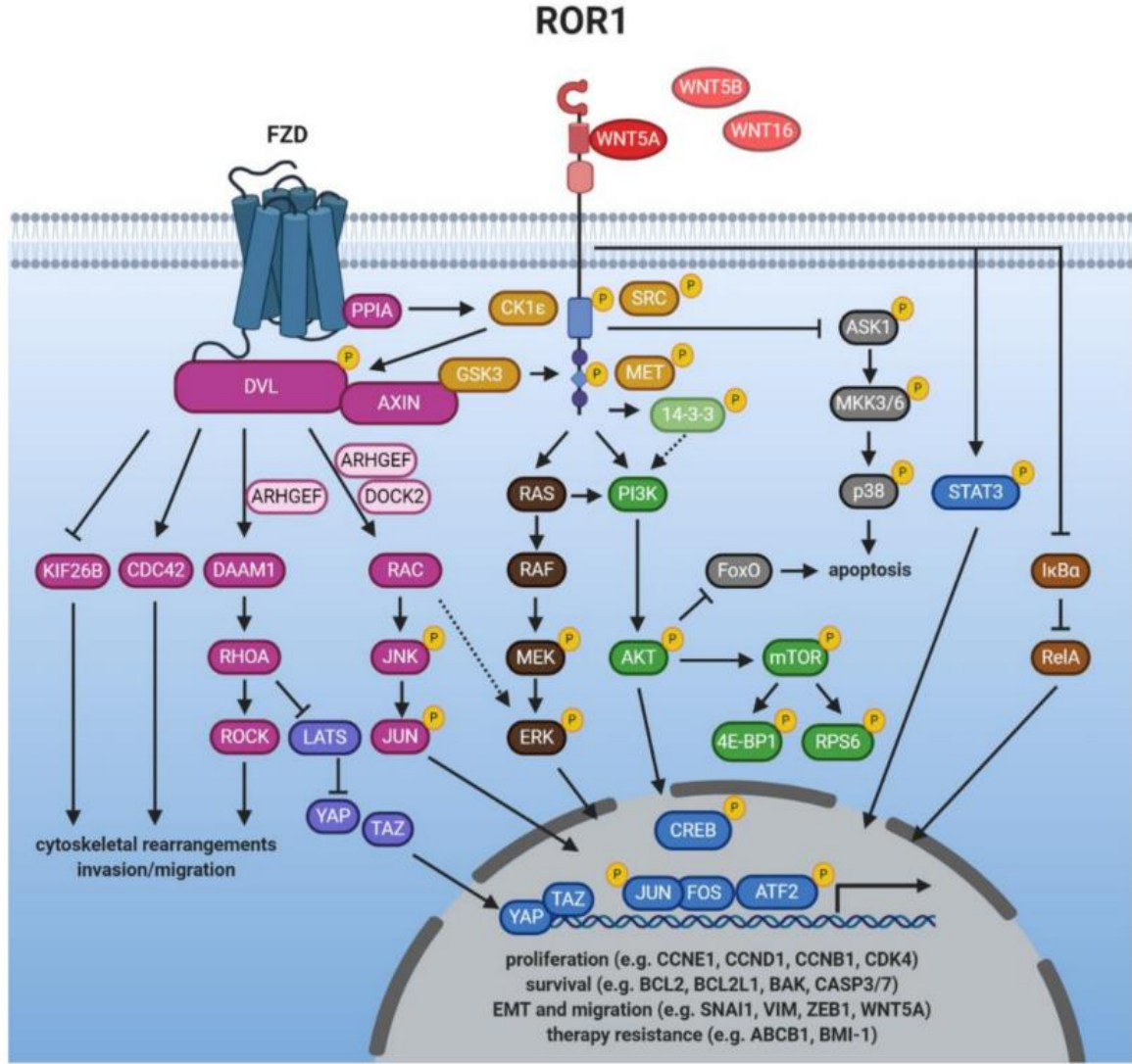
Şekil 2.2. ROR1 alan yapıları (7).

2.1.2. ROR1'İN DÜZENLEDİĞİ SİNYAL YOLAKLARI

ROR1 sinyal iletimi, hücre-hücre etkileşimini, hücre proliferasyonunu, hücre farklılaşmasını, hücre metabolizması ve hayatta kalma sürecini düzenlemektedir (24). ROR1 sinyal iletim yolağı henüz tamamen aydınlatılmamış olsa da kanonik olmayan WNT ligandları WNT5A, WNT5B ve WNT16'nın ROR1 CRD alanına bağlanmasıyla ROR1/WNT sinyalinin indüklendiği bilinmektedir. Fonksiyonel çalışmalar, ROR1'in, Wnt5a için bir reseptör görevi gördüğünü ve kanonik olmayan Wnt sinyalini indüklediğini göstermiştir (25). Endojen ligandın reseptör CRD alanına bağlanması ROR1/ROR2 homo veya heterodimerizasyonunu veya ROR1'in bir FZD reseptörü ile kompleks oluşturmasını indüklemektedir (26). Şekil 2.3.'de görüldüğü üzere endojen ligand bağlanması ile reseptör fosforilasyonunu indüklenmekte ve WNT/PCP, MAPK/ERK, PI3K/AKT veya NF- κ B gibi

aşğı akış sinyal ağırları aktive edilmektedir (27). ROR1/WNT sinyal yolunun aktive edilmesi embriyonik ve tümör hücresi proliferasyonu, hayatta kalması ve göçünde rol oynayan genlerin ekspresyonuna yol açan transkripsiyonel yanıtı indüklemektedir. Bunlara ek olarak ROR1 sinyalinin sitotoksik ilaçlara direnci artıran genlerin ekspresyonunu arttırarak kemorezistansa yol açabileceğini rapor edilmiştir (28).

Endojen ligandın ROR1 CRD alanına bağlanmasıyla ROR1/WNT sinyali indüklenir, WNT sinyali, DVL proteinlerini fosforile eder ve aktive olan DVL proteinleri sinyalleri RHOA, RAC ve CDC42 gibi farklı sinyal ağırlarına iletir, hücre proliferasyonu, hücre göçü ve apoptoz inhibisyonunun indüklenmesi ile sonuçlanır (27). ROR1, WNT sinyallerini temel hücrel süreçlerin düzenlenmesinde yer alan diğer ana sinyal yollarına bağlamaktadır (29). ROR1'den gelen aşğı akış sinyali, PI3K/AKT sinyal yolağını aktive etmektedir. ROR1 aktivasyonu, PI3K/AKT sinyal yolağını aktive ederek cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) ve mTOR'un fosforilasyonuna neden olur (30). ROR1 ve PI3K aktivasyonu arasındaki bağlantı henüz tam olarak anlaşılacakla birlikte, ROR1'in PI3K kompleksinin p85 düzenleyici alt birimine bağlanan ve böylece hücre zarına translokasyonunu destekleyen hücre içi adaptör protein ile etkileşime girdiği bilinmektedir (31).



Şekil 2.3.ROR1 sinyal iletim yollarları (27).

2.2. ROR1 VE KANSER

ROR1, proliferasyon, farklılaşma, anjiyogenez, hücre göçü, metabolizma sinyalizasyonu, hücre-hücre etkileşimi gibi hücrelerel süreçlerde ve ayrıca çeşitli organ ve dokuların embriyonik gelişiminin erken aşamalarında kritik rollere sahiptir, bu nedenle ROR1 anormal düzenlenmesi ciddi gelişimsel kusurlara, hematolojik ve solid malignitelere neden olmaktadır (23).

ROR1'in anormal ifade edilmesine bağlı olarak meydana gelen aşırı aktif WNT/ROR sinyali hücre proliferasyonu, hücre göçü, hücre invazyonu ve apoptoz inhibisyonu gibi hücrelerel süreçleri etkileyerek birçok insan kanserinin gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (27). Wnt5a/ROR1 sinyali tümör proliferasyonunu ve tümör invazivliğini

indüklemektedir. Kanser hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda, ROR1'in kanser hücrelerinde proliferasyonu teşvik ederek ve apoptoza karşı direnç geliştirerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve hastalığın ilerlemesine katkı sağladığı gösterilmiştir ve çoğu çalışmada ROR1 bir onkogen olarak tanımlanmıştır (32). ROR1'in kanser hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz üzerinde etkisini gösterebilmesi için Wnt5a endojen ligandı tarafından aktive edilmesi, reseptörün prolin bakımından zengin alanının fosforilasyonunun gerçekleşmesi ve buna bağlı olarak ROR1 ile ilişkili aşağı akış sinyal yollarının etkinleştirilmesi gerekmektedir (33). ROR1'in kanser hastalarında proliferasyonun yanı sıra metastaz ile de ilişkili olduğuna dair klinik gözlemler bulunmaktadır. Meme kanseri, glioblastoma, yumurtalık kanseri ve melanom dahil birkaç in vitro katı tümör modelinde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda; ROR1 yıkımının hücre göçünü ve hücre istilasını azalttığı rapor edilmiştir (27). Şekil 2.4.'te görüldüğü üzere, ROR1 farklı sinyal proteinleri ile etkileşime girerek ve birkaç transkripsiyon faktörünü aktive ederek çeşitli malignitelerde farklı sinyal yollarını uyarır ve sinyal yollarının uyarılmasının nihai sonucu olarak kanser hücrelerinde proliferasyon, metastaz ve apoptoz inhibisyonu meydana gelmektedir (34).

ROR1, kemik iliğindeki olgunlaşmamış B hücrelerinde ve bademcik B hücrelerinde keşfedilmiştir ancak sağlıklı donörlerden alınan normal olgun B hücreleri, plazma hücreleri veya periferik kan mononükleer hücrelerinde bulunmamaktadır (27). Kronik lenfositik lösemi hücrelerinde (KLL) ve normal olgun B hücrelerinde gen ekspresyonunu karşılaştıran mikrodizi çalışmaları sonucunda, KLL hücrelerinde ROR1'in 19 kat daha fazla ifade edildiği gözlemlenmiş ve ROR1 kronik lenfositik lösemi hücrelerinde bir imza geni olarak tanımlanmıştır (35). Bu çalışma sonucunda ilk kez bir malignitede ROR1'in yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir. KLL hastalarının çoğunluğu kanda yüksek seviyelerde ROR1-pozitif tümör hücreleri barındırmaktadır, vakalarının sadece yaklaşık %5'in ihmal edilebilir seviyede ROR1 ifadesi sergilemiştir. ROR1 aşırı ifadesine sahip KLL hastalarının, genel hayatta kalma ve tedavisiz hayatta kalma sürelerinin önemli ölçüde kısaldığı, ROR1'in hastalığın agresif ilerlemesi üzerinde pozitif etkisi olduğu gözlenmektedir (36). KLL hastalarında ROR1'in aşırı ifade edildiği keşfedildikten sonra akut lenfositik lösemi (ALL), Hodgkin olmayan lenfomalar (NHL) ve miyeloid maligniteler dahil olmak üzere çeşitli hematolojik malignitelerde yüksek ROR1 seviyesi rapor edilmiştir (35). ROR1'in aşırı ifadesi sadece hematolojik malignitelerde rapor edilmekle kalmamış, çok çeşitli katı

malignitelerde de gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen immünohistokimya ve doku mikrodizi analizleri sonucunda kolon, pankreas, akciğer, meme ve yumurtalık kanserlerinde komşu normal dokuya göre çok daha yüksek seviyede ROR1 ifadesi saptanmıştır (10). Normal meme dokularında ROR1 ifadesi bulunmamasına rağmen meme kanseri tümör örnekleri ROR1 pozitif bulunmuştur ve ROR1 aşırı ifadesinin, PI3K/AKT sinyal yolunun aktive ederek hastalığın daha şiddetli ilerlemesine ve tümör metastazına neden olduğu rapor edilmiştir (32). Akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, kolorektal kanser ve pankreas kanseri hücrelerinde ROR1 ifadesi yüksek seviyelerde rapor edilmiştir ve ROR1 bu hastalarda prognostik bir biyobelirteç görevi göstermektedir (37). ROR1'in anormal ifadesi ve ilişkili sinyal yollarının aktivasyonu hematolojik ve katı malignitelerde biyobelirteç görevi göstermenin yanı sıra anti-kanser ilaç gelişimi için potansiyel terapötik hedef olarak da hizmet etmektedir (38).

2.3. ROR1 HEDEFLİ AJANLAR

ROR1 ifade düzeyinin yetişkin dokularda düşük olmasına rağmen çeşitli kanser hücrelerinde aşırı ifade edilmesi, araştırmacıları, ROR1 ifade edilmesi ile kansere sağlanan fonksiyonel avantajı incelemeye ve kanser hastalarının tedavi edilebilmesi için ROR1'i hedefleyen çeşitli terapötik stratejiler geliştirmeye yöneltmiştir (35). Bugüne kadar, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda ROR1'e karşı çeşitli terapötik stratejiler geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir. Çizelge 2.1.'de ROR1'i hedefleyen çeşitli klinik öncesi ve klinik çalışmalar verilmiştir.

Çizelge 2.1. ROR1 hedefli tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar

İlaç	Tanımı	Hastalık	Referans
Cirmtuzumab	mAb	KLL, MLL, Meme Kanseri	(25)
NVG-111	Bispesifik Antikor ROR1 and CD3	KLL, MLL, Hematolojik neoplasm	(39)
KAN0441671C	İnhibitör	DLBCL	(40)
KAN0439834	İnhibitör	KLL, Pankreas kanseri	(41)
ARI-1	İnhibitör	Akciğer Kanseri	(42)

2.3.1. ANTI-ROR1 TIROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

Küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörleri, tirozin kinazlardaki katalitik alanları hedefleyen ATP-rekabetçi inhibitörlerdir.

KAN0439834 anti-ROR1 tirozin kinaz inhibitörü, tirozin kinaz alanının fosforilasyonunu önleyerek, ROR1 sinyal iletimini bloke etmektedir (41). In vitro çalışmalar, KAN0439834'ün ROR pozitif KLL ve pankreas kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediğini göstermektedir (43).

KAN0439834 anti-ROR1 tirozin kinaz inhibitörünü geliştiren aynı grup tarafından ikinci nesil küçük molekülü ROR1 inhibitörü KAN0441571C geliştirilmiştir (40). Şimdiye kadar sadece yaygın büyük B hücreli lenfoma hücre dizilerinde test edilmiş, ROR1 fosforilasyonunu azaltmada ve akış aşağı ROR1 sinyal iletimini bloke etmede başarılı olduğu gözlemlenmiş ancak KAN0439834'ten daha yüksek bir sitotoksite göstermektedir (40).

ARI-I, ROR1'in hücre dışı WNT bağlayıcı CRD alanını doğrudan hedefleyen başka bir anti-ROR1 tirozin kinaz inhibitörüdür (42). ARI-1, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu ve ROR1 aşağı akış sinyalini bloke ederek ROR1 pozitif küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe etmektedir (44).

2.3.2. ANTI-ROR1 MONOKLONAL ANTİKORLAR

Monoklonal antikolar, reseptöre ligand bağlanmasını doğrudan bloke ederler ve tümör hücrelerini ortadan kaldırmak için bağışıklık sistemini aktive eder (45). Kanser hastalarının tedavisinde kullanılan monoklonal antikolar tek başına veya kemoterapi ile kombinasyon halinde uygulandığında uzun süreli sağkalım sağlayan etkili ajanlardır.

Cirmtuzumab (UC-961), ROR1 hücre dışı alanına yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanan, ROR1'e karşı geliştirilmiş ilk insansı mAb'dır (25). Cirmtuzumab, ayırt edici bir ROR1 epitopunu hedefler ve ROR1+ tümör hücrelerine karşı biyolojik aktiviteye sahiptir (46). Cirmtuzumab, WNT ligand bağlanması için rekabetçi bir inhibitör olarak davranır ve ROR1'in tümörjenik etkilerine yol açan sinyalleşme kaskadının aktivasyonunu engellemektedir (27). Cirmtuzumab'ın ROR1 hücre dışı alanına bağlanması, ROR1-antikor

komplekslerinin lizozomal bölmelere hızlı bir şekilde içselleştirilmesini indüklemektedir (46). İlk klinik öncesi çalışmalarda, toksisite saptanmamıştır bunun nedeninin Cirmtuzumab'ın doğum sonrası dokular için saptanabilir bağlanma aktivitesine sahip olmaması olabileceği düşünülmektedir (25). Birinci faz I denemesinde, nüksetmiş KLL hastalarında Cirmtuzumab'ı test edilmiştir ve iyi tolere edildiği, doz sınırlayıcı toksisite tanımlanmadığı ve sadece dar bir yan etki aralığına ve uzun plazma yarı ömrüne sahip olduğu yayınlanmıştır (47). Cirmtuzumab, KLL hastalarında tümör hücresi ROR1 sinyalini inhibe ederek RhoA ve HS1'in aktivasyonunu azaltmaktadır (27). Cirmtuzumab, ROR1 pozitif katı tümörlerde de denenmiştir. Yüksek ROR1 seviyesinin kemorezistansa ve metastaz ile ilişkili olduğu ROR1 pozitif meme kanseri Cirmtuzumab tedavisinin uygulandığı bir diğer kanser türüdür. Klinik öncesi bir çalışma, her iki haftada bir Cirmtuzumab infüzyonunun, bir fare PDX modelinde meme kanseri hücrelerinde metastaz oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir (48). Meme kanseri veya KLL hastalarında paklitaksel veya ibrutinib ile kombine Cirmtuzumab üzerinde faz Ib ve faz I/II çalışmaları halen devam etmektedir (27).

NVG-111 (scFv ROR1xCD3), kanser hücreleri üzerindeki ROR1'e ve lenfositler üzerindeki hücre yüzeyi CD3'üne bağlanan tandem tek zincirli değişken parçalardan (scFv) oluşan bispesifik bir insansı antikordur (39). ROR1'in Frizzled alanına bir membran proksimal epitopu bağlayarak ve T hücresi aktivitesini yönlendirerek tümör hücrelerinin güçlü bir şekilde öldürülmesini sağladığı gösterilmiştir (49). NVG-111'in bağlanması, MHC'den bağımsız immünolojik sinaps oluşumuna neden olarak, perforinleri, granzim B'yi ve sitokinleri serbest bırakarak hedeflenen kanser hücrelerinin öldürülmesiyle sonuçlanır (50).

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Reseptör tirozin kinaz benzeri orphan reseptör 1 (ROR1), embriyonik gelişim sırasında farklılaşma, çoğalma, göç ve hayatta kalma ile ilgili süreçlerde rol alan, reseptör tirozin kinaz ailesi üyesi onkoembriyonik bir transmembran glikoproteindir (51). Doğum sonrası sağlıklı yetişkin dokularda ROR1 ifadesi ihmal edilebilir seviyelere düşerken çeşitli hematolojik ve solid malignitelerde ROR1 aşırı ifadesi rapor edilmiştir (52). Çeşitli kanser hücrelerinde görülen ROR1 anormal ifadesi, kanser hücrelerinin metastazı, proliferasyonu, hayatta kalması, terapi direnci oluşturması gibi biyolojik yanıtlar oluşturan, kanser hücrelerinin gelişimine ve ilerlemesine katkı sağlayan sinyal yollarının aktive edilmesine neden olmaktadır. ROR1'in kanser gelişimi ve ilerlemesine sağladığı fonksiyonel katkının anlaşılması ROR1'i, yeni immünoterapiler için potansiyel bir hedef haline getirmiştir ve kanser hücrelerinde ROR1 sinyal iletimini bloke edecek yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda klinik öncesi ve klinik çalışmalarda ROR1'i hedefleyen çeşitli monoklonal antikolar geliştirilmiştir ve yeni mAb'ler geliştirilmeye devam etmektedir ancak günümüzde ROR1'e karşı geliştirilmiş, KLL ve meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılan tek insansı monoklonal antikor Cirtuzumab'dır.

Her geçen gün kanser hastası olan kişi sayısı artmakta buna bağlı olarak tedaviye ihtiyaç duyan hasta sayısında ve kanser kaynaklı ölüm oranında artış gözlenmektedir. Kanser hastalarında semptomları kontrol etmek, hastaların yaşam süresini uzatmak için bu yeni terapötik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Geliştirilecek yeni ve özgün anti-ROR1 monoklonal antikoları, ROR1 pozitif kanser hastalarının tanı ve tedavi yaklaşımlarında faydalı olacaktır. Bu tez çalışmasında ROR1 tüm hücre dışı alanını ve fzd+kringle alanını kapsayan iki farklı bölgeye karşı rekombinant antijen geliştirilmesi amaçlanmıştır. Histidine taq ile konjuge iki farklı rekombinant protein üretilmiş ve saflaştırılmıştır. Üretilmiş olan iki rekombinant protein anti-ROR1 nötralizan monoklonal antikor geliştirilmesi için antijen olarak tarafımızca kullanılacaktır.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HÜCRE HATLARI

Çalışmada ATCC'den temin edilen HTB-30 katalog numarasına sahip MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı kullanıldı.

4.1.2. PLAZMİD VE BAKTERİ SUŞLARI

E. coli DH5 α -TR1 (Invitrogen, 12297016) klonlama bakteri suşu olarak, *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, 69450) protein ifade bakteri suşu olarak kullanıldı.

Vektör olarak, 5421 bç büyüklüğündeki pET-30a(+) (Novagen, 69909) ifade plazmidi kullanıldı. Vektör haritası Ek 1'de verilmiştir.

4.1.3. REAKTİF VE KİMYASALLAR

Çalışmada kullanılan reaktif ve kimyasallar Çizelge 4.1.'de listelendi.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan reaktif ve kimyasallar

REAKTİF/ KİMYASAL ADI	MARKA-KATALOG NUMARASI
2X Örnek Yükleme Tamponu	Novex, LC2676
6X Örnek Yükleme Tamponu	NewEngland Biolabs, B7021S
1 kb DNA Ladder	NewEngland Biolabs, N3232S
100 bp DNA Ladder	ThermoScientific, SM0321
Anti His-Tag Antibody	Cell signaling – 2365S
Agaroz	Sigma, A9539
Asetik asit	Riedel-de Haën – 27225
Borik Asit	Ambresco – 0588
BSA	VWR – 0332
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma – B7920
DMEM High Glucose	Lonza – 12-614F
EDTA	Sigma – E5134
EDTA'sız proteaz 13nhibitor kokteyli	Roche – 11873580001
Ethanol	Merck – K51762283 937
FastDigest BamHI	ThermoScientific, FD0054
FastDigest Sall	ThermoScientific, FD0644
FastDigest RE Tamponu	ThermoScientific, B64
Fetal Bovine Serum	Gibco – 10500-064
Gliserol	Sigma – G5516
Glisin	Amresco – 0167
IPTG	Applichem – A4773
İmidazol	Applichem – A1378.0010
Kanamisin	Applichem – A1493.0010

Lizozim	Applichem – A4972
Luria Broth	Sigma – L3522
Methanol	Merck – 1.06009.2511
NaCl	Sigma – S3014
N-Lauroylsarcosine	Applichem – A1163,0025
NaOH	Riedel-de-Haen – 06203
PBS	Biological Industries – 02-023-1A
Penicillin-Streptomycin Solution	Biological Industries – 03-031-1B
Plasmocin	Invivogen – ant-mpp
Protein Dual Color Standard	Bio-Rad – 1610374
SDS	Sigma – L4390
Tris	Ambresco – 0826
Trypsin EDTA Solution A	Biological Industries – 03-050-1B
Üre	Amresco – 0378
β -mercaptoethanol	Merck – 8.05740.0250
T4 DNA Ligaz	ThermoScientific, EL0011
T4 DNA Ligaz Tamponu	ThermoScientific, B69
Taq DNA Polimeraz	ThermoScientific, 10342053

4.1.4. SOLÜSYON VE TAMPONLAR

1X RTA Transfer Tamponu: İmmünblotlamada, jelin membrana transferi aşamasında kullanılmak üzere transfer tamponu hazırlandı. Kit içeriğinde bulunan 5X transfer tamponundan 100 ml alındı boş ve temiz bir cam kap içerisine aktarıldı ardından üzerine 100 ml etanol ve 300 ml ddH₂O eklendi ve karıştırıldı.

10X Koşurma Tamponu (pH:8,3): SDS-PAGE analizinde kullanılmak üzere 10X koşurma tamponu stok olarak hazırlandı. 10X koşurma tamponu hazırlarken 700 ml ddH₂O temiz ve boş bir beher içerisine aktarıldı, 30,2 gr Tris, 144 gr Glisin ve 10 gr SDS tartılarak

su üzerine eklendi. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözünene kadar karıştırıldı ardından pH'ı 8.3 ayarlandı ve son hacim 1 litreye tamamlandı.

10X TBS (pH:7,6): İmmünblotlamada kullanılmak üzere 10X TBS tamponu hazırlandı. 800 ml ddH₂O temiz ve boş bir beher içerisine aktarıldı, 24 gr Tris, 88 gr NaCl tartılarak su üzerine eklendi. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözünene kadar karıştırıldı ardından pH'ı 7.6'ya ayarlandı ve son hacim 1 litreye tamamlandı.

10X TBE: Agaroz jel elektroforezde kullanılmak üzere 10X TBE tamponu hazırlandı. 700 ml ddH₂O temiz ve boş bir beher içerisine aktarıldı, 108 gr Tris, 55 gr Borik Asit, 40 ml 0.5 M EDTA tartılarak su üzerine eklendi. Manyetik karıştırıcı üzerinde çözünene kadar karıştırıldı ardından son hacim 1 litreye tamamlandı.

0,5 M EDTA (pH:8): TBE tamponu hazırlarken kullanılmak üzere EDTA solüsyonu hazırlandı. 400 ml ddH₂O temiz ve boş bir beher içerisine aktarıldı, 93 gr EDTA tartılarak su üzerine eklendi. Manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılırken pH:8 olana kadar NaOH eklendi. Çözündükten sonra son hacim 0.5 litreye tamamlandı.

TBS-T: İmmünblotlamada membranı yıkamak için TBS-T tamponu hazırlandı. 100 ml 10X TBS, 900 ml ddH₂O, 2 ml Tween-20 karıştırıldı.

%5 BSA: 100 ml TBS-T içerisine 5 gram BSA eklendi. Buz içerisinde çözünmesi sağlandı.

Fiksasyon solüsyonu: Coomassie blue boyaması için 500 ml fiksasyon solüsyonu hazırlandı. 200 ml ddH₂O, 50 ml asetik asit ve 250 ml methanol karıştırıldı (%40 ddH₂O, %10 asetik asit, %50 methanol).

Destain Solüsyonu: Coomassie blue boyaması sonrası jel üzerinden boyayı uzaklaştırmak için destain solüsyonu hazırlandı. 337,5 ml ddH₂O, 7,5 ml asetik asit ve 125 ml methanol karıştırıldı (%67,5 ddH₂O, %7,5 asetik asit, %25 methanol).

4.1.5. KİTLER

Çalışmada kullanılan kitler Çizelge 4.2.'de listelendi.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan kitler.

Kit Adı	Markası – Katalog Numarası
cOmplete™ lysis-M	Roche – 04 719 956 001
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche – 11 697 498 001
Gel/PCR Purification Kit	FavorPrep – FAGCK001
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche – 11-754-777-001
miRNeasy Mini Kit	Qiagen – 217004
The Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche – 04-379-012-001
Western Bright-Sirius Chemiluminescent Detection Kit	Advansta - K-12043-D10
Trans-blot Turbo RTA Transfer	Bio-Rad – 170-4272

4.2. YÖNTEM

4.2.1. GENEL YÖNTEMLER

4.2.1.1. Kompetan Hücre Hazırlanması

-80 °C’de muhafaza edilen stok DH5 α -TRI ve BL21(DE3) suşları çalışma ortamına getirildi. 50 ml falkon tüpler aseptik şartlarda etiketlenerek hazırlandı. Hazırlanan tüpler içerisine 10 ml LB besiyeri ve uygun stok suşlarından 20 μ l alınarak eklendi. Falkon tüpler ısıtılmalı-çalkalamalı inkübatöre yerleştirilerek, 37 °C 180 rpm’de gece boyu kültüre bırakıldı. 500 ml iki adet flask aseptik şartlarda etiketlenerek hazırlandı ve içerisine 100 ml LB besiyeri eklendi. Gece boyu kültüre bırakılan stok sıvı kültürden 1 ml alınarak içerisinde LB besiyeri bulunan uygun flasklara eklendi. Flasklar inkübatöre yerleştirildi, 37 °C, 180 rpm’de 2,30 saat kültüre bırakıldı, OD₆₀₀ değeri 0.2-0.4 aralığına ulaşınca kadar inkübe edildi. OD ölçümü için Bio-Rad SmartSpec spektrofotometre cihazı kullanıldı. Sıvı kültür 4 °C, 4700 rpm’de, 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, pellet 25 ml soğuk 0,1 M CaCl₂ ile çözüldü, buza gömüldü, 2 saat inkübe edildi. Falkon tüpler 4°C, 4700rpm’de, 15 dk, santrifüj

edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet, soğuk 10 ml CaCl₂+Gliserol (9 ml 0.1 M CaCl₂, 1 ml gliserol) karışımı çözüldü. 1.5ml ependorf tüpler etiketlendi, buza gömüldü, 100'er µl ilgi örnekten eklendi, 30 dk buz üzerinde inkübe edildi, -80 °C buz dolabına kaldırılarak muhafaza edildi.

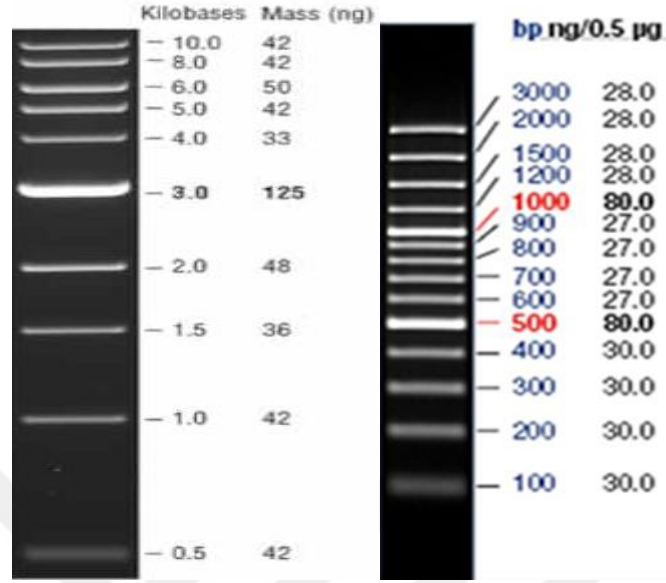
4.2.1.2. Bakteriyel Transformasyon

-80°C'de buzdolabında muhafaza edilen, DH5α-TR1 kompetan hücrelerini içeren ependorf tüp çalışma ortamına getirildi. İlgili örnek, DH5α-TR1 kompetan hücrelerini içeren ependorf tüplerin içerisine eklendi. Ependorf tüp 30 dk buz üzerinde inkübe edildi, ardından 42°C su banyosunda 30 sn ışık şoku uygulandı. Ependorf tüp buz üzerinde 2 dk inkübe edildi. 1 ml LB besiyeri, ependorf tüp içerisine eklendi, ısıtmalı-çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi, 37°C, 180 rpm'de, 1 saat inkübe edildi. +4 C'de muhafaza edilen LB-Agar-Kanamycin petri kapları çalışma ortamına getirildi, etiketlendi. Ependorf tüp 13.000 rpm'de, 1 dakika santrifüj edildi. 900 µl süpernatant uzaklaştırıldı, 100 µl ile pellet çözüldü. Aseptik ortamda, cam drigalski baget ile LB-Agar-Kanamycin petri kaplarına ekim işlemi gerçekleştirildi. Petri kapları, ters çevrilerek 37°C' de gece boyu inkübe edildi.

4.2.1.3. Agaroz Jel Elektrofrez

DNA fragmentleri, yatay jel elektrofrez sistemi kullanılarak ayrıştırıldı. Örnek miktarına göre küçük veya büyük elektrofrez tankı kullanıldı, her ikisi içinde %1 yoğunluğunda agaroz jel hazırlandı. Küçük tank için 0.3 gr agaroz tartıldı, 30 ml 1X TBE içinde tamamen çözüldü, jelin bir miktar soğuması beklendi ardından konsantrasyonu 10 mg/ml olan ethidium bromür'den 1 µl jel içerisine eklendi hafifçe köpürtmeden karıştırıldı. Büyük tank için ise 1.5 gr agaroz tartıldı, 150 ml 1X TBE içinde tamamen çözüldü, jelin bir miktar soğuması beklendi ardından konsantrasyonu 10 mg/ml olan ethidium bromür'den 5 µl jel içerisine eklendi hafifçe köpürtmeden karıştırıldı. Uygun hacim ve konsantrasyonda jel hazırlandıktan sonra, elektrofrez tank aparatına uygun tarak yerleştirildi ve jel döküldü. Jelin polimerleşmesinin ardından tarak çıkarıldı, jel üzerine 1X TBE eklendi. Örnekler uygun hacimde 6X örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak, her kuyuya eşit miktarda yüklendi. 80 V'ta 90 dk süresince yürütüldü. DNA fragmentlerinin moleküler ağırlığını belirlemek için New England Biolabs 1 kb DNA Ladder (Şekil 4.1. sol) ve Thermo Scientific

100 bp DNA Ladder (Şekil 4.1. sağ) kullanıldı. Yürütme işleminin ardından, agaroz jel Gene Genius Bio Imaging System ile ultraviyole ışığı altında görüntülendi.



Şekil 4.1. DNA molekül ağırlığı belirteci.

4.2.1.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi

Jel koşturma için Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad, 1658005) kullanıldı. Hazır Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels (BioRad, 4568123) kullanıldı. SDS-PAGE için öncelikle hazır jelin altında bulunan güvenlik bandı söküldü, jel SDS-PAGE aparatına oturtuldu ve tarağı çıkarıldı. Üzerine 1X koşturma tamponu eklendi, 2 ml enjektör ile kuyuları yıkandı. 2X laemmler tamponu içerisinde %0,5 B-merkaptoetanol eklendi ve karışım uygun hacimde örneklerin bulunduğu ependorf tüpler içerisinde eklendi. Sonrasında ependorf tüpler içerisinde bulunan örnekler 85°C ısı bloğunda 5 dk denatüre edildi. Örnekler, jel kuyularına uygun miktarlarda yüklendi. Yüklemeden sonra jel 100 V'da 75 dk koşturuldu.

4.2.1.5. İmmünblotlama

Membrana Transfer: Transfer işlemleri için Trans-Blot Turbo Transfer cihazı (Bio-Rad) ve Trans-Blot Turbo RTA Transfer kiti (Bio-Rad, 170-4272) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan filtre kağıtları 1X transfer tamponu ile ıslatıldı. Membran %100 metanol içerisinde 30 sn inkübe edildi, ardından 1X transfer tamponu ile dengelendi. SDS-PAGE sonrası jel bulunduğu kasetten dikkatlice ayrıldı. Trans-Blot Turbo Transfer cihazı haznesine sırasıyla:

7 adet ıslatılmış filtre kağıdı, membran, jel, 7 adet ıslatılmış filtre kağıdı yerleştirildi. Üzerinden merdane ile geçilerek olası hava kabarcıkları giderildi. Cihaz haznesi, transfer sistemine yerleştirildi, uygun program seçilerek transfer işlemi gerçekleştirildi.

Bloklama: Transfer işlemi sonrasında membran, içerisine 25 ml TBS-T+ %5 BSA solüsyonu eklenmiş temiz ve boş cam kaba alındı. Kap oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde 3,5 devirde iki saat inkübe edildi. Sonunda bloklama solüsyonu membran üzerinden uzaklaştırıldı.

Primer Antikor ile İşaretleme: Bloklama sonrası, BSA solüsyonu membran üzerinden uzaklaştırıldı. Membranın bulunduğu cam kap içerisine 10 ml primer antikor (10 ml TBS-T + %5 BSA, 1:1200 anti His-Taq antikor) eklendi. Kabın ağzı hava almayacak şekilde kapatılıp, +4 °C’de orbital çalkalayıcıda düşük devirde gece boyu inkübe edildi.

Sekonder Antikor ile İşaretleme: Ertesi gün primer antikor membran üzerinden uzaklaştırıldı. Membran, 20 ml 1X TBS-T solüsyonu ile orbital çalkalayıcı üzerinde 10 dk çalkalanarak yıkandı. Bu işlem 3 kere tekrar edildi. Yıkama işlemi sonrasında, membran üzerine 10 ml anti Rabbit HRP sekonder antikor (TBS-T+ %5 BSA+ 1:10000 sekonder antikor) eklendi. Kabın ağzı hava almayacak şekilde kapatılıp, oda ısısında ve karanlıkta orbital çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi.

Görüntüleme: Sekonder antikor ile işaretleme sonrası membran 20 ml 1X TBS-T solüsyonu ile orbital çalkalayıcı üzerinde çalkalanarak yıkandı, bu işlem 3 kere tekrar edildi. Yıkama sonrası membran Odyssey Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) kullanılarak görüntüledi. Görüntüleme işlemi öncesinde membran kemiluminesans solüsyon (WesternBright-Sirius ve WesternBright-Peroxide) ile kaplandı. Chemi 200 kanalı ve 700 kanalı kullanılarak kemiluminesans görüntüleme yapıldı.

4.2.1.6. Coomassie Blue Boyaması

SDS-PAGE ile yürütüldükten sonra jel temiz bir cam kap içerisine alındı. Jelin üzerine 20 ml fiksasyon solüsyonu eklendi ve 45 dk oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde yavaşça çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında jel üzerinden fiksasyon solüsyonu uzaklaştırıldı, üzerine 20 ml coomassie blue boya solüsyonu eklendi. Cam kabın ağzı hava almayacak şekilde kapatılıp, parafilmlendi +4 °C’de orbital çalkalayıcı üzerinde yavaşça

çalkalanarak gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrası boya jel üzerinden uzaklaştırıldı. Jel, oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde berraklaşana kadar destain solüsyon ile yıkandı. Bantlar belirginleşince jel görüntüsü alındı.

4.2.1.7. Hücre Hatlarının Kültür Koşulları

Çalışmada kullanılan MDA-MB-231 hücreleri, %10 FBS, %1 Pen/Strep, %1 L-Glutamine eklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 4.5g/L glucose w/o L-Glutamine besiyerinde, sıcaklığı 37 °C, CO₂ yoğunluğu %5 olan inkübatörde idame ettirildi.

MDA-MB-231 hücrelerinin bulunduğu Cryovial tüpler, sıvı azot tankından alındı, buz üzerinde hücre kültürü çalışma alanına getirildi. Tüpler, önceden ısıtılmış su banyosunda 37 °C 1 dk inkübe edildi. Ardından %70 EtOH ile silinen Cryovial tüpler laminar kabin içerisine alındı, hücre süspansiyonu üzerine önceden ısıtılmış 4 ml kültür besiyerine eklendi, pipetaj yapılarak dikkatlice karıştırıldı ve 15 ml falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüp 1500 rpm 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet, önceden ısıtılmış olan kültür besiyerinde çözüldükten sonra kültür besiyeri eklenmiş uygun kültür kabına aktarıldı. Mikroskop altında kontrol edildikten sonra 37 °C %5 CO₂ inkübatörüne kaldırılarak idame edildi.

İdame edilen hücreler her gün mikroskop altında incelendi %80 doluluğa ulaşıncaya hücreler için pasajlama kararı alındı. Pasajlama işlemi için ilk olarak hücre kültürü petri kaplarında idame edilen hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı. Sonrasında hücreler 5 ml PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üzerine 1.5 ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. 37 °C hücre kültürü inkübatöründe 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler yapıştığı yüzeyden 4 ml kültür besiyeri ile pipetaj yapılarak kaldırıldı. Hücre süspansiyonu 15 ml falkon tüpe aktarıldı. 1500 rpm 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet, önceden ısıtılmış olan kültür besiyerinde çözüldükten sonra 1:3 oranında kültür besiyeri eklenmiş uygun hücre kültür petri kaplarına ekildi. Mikroskop altında kontrol edildikten sonra 37 °C %5 CO₂ inkübatörüne kaldırılarak idame edildi.

4.2.2. ROR1 KLONLANMASI

4.2.2.1. ROR1 RNA ve CDNA Eldesi

Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu:

Hücre hatlarından total RNA izole etmek için QIAGEN miRNeasy Mini Kit (217004) ve QIAGEN QIAzol Lysis Reagent (1023537) kullanıldı.

Hücre kültürü laboratuvarından, %80 doluluk oranına ulaşan MDA-MB-231 hücrelerini içeren petri kapları alındı, çalışma ortamına getirilerek buz üzerine yerleştirildi ve hücrelerden total RNA izolasyonu işlemine başlandı. Öncelikle, hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı sonrasında hücreler soğuk PBS ile yıkandı. 700 µl QIAzol Lysis Reagent tamponundan hücrelerin üzerine eklendi, 5 dakika buz üzerinde inkübe edildi ardından hücreler kazıyıcı ile kazınarak ependorf tüpe toplandı. 5 dk oda ısısında inkübe edildi, 140'ar µl kloroform ependorf tüp içerisine eklendi, 5 sn kuvvetlice çalkalandı. 4 °C'de 12.000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant yeni ve temiz bir collection tüp içerisine alındı, üzerine RNA miktarının 1,5 katı %100 etanol eklendi, 700 µl örnek RNeasy mini kolonuna aktarıldı, 24 °C'de 8000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, kolon içerisine 700 µl RWT Buffer eklendi 8000 x g'de 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, kolon içerisine 500 µl RPE buffer eklendi 8000 x g'de 2 dk santrifüj edildi, bu işlem iki kere tekrar edildi. RNeasy mini kolonu yeni boş ve temiz collection tüp içerisine yerleştirildi, kolon içerisine 50 µl RNase free su eklendi, 8000 x g'de, 1 dk santrifüj edilerek RNA elue edildi. İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 spektrofotometre ile ölçüldü. Konsantrasyon ölçümü sonrası yaklaşık 100 ng RNA örneği %1 yoğunluğa sahip agaroz jelde yürütüldü 80 V'ta 45 dk yürütüldü, ardından agaroz jel Gene Genius Bio Imaging System ile ultraviyole ışığı altında görüntülendi. İzole edilen RNA örnekleri daha sonra cDNA sentezi için kullanılmak üzere -80 °C dolabına kaldırılarak muhafaza edildi.

cDNA Sentezi:

cDNA sentezi için Roche The Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (04 379 012 001) kullanıldı.

-80°C’de muhafaza edilen RNA örnekleri alındı, buz üzerine yerleştirildi ve çalışma alanına getirildi. -20°C’de muhafaza edilen kit komponentleri çıkarıldı, buz üzerinde çözüldü. Total RNA izolasyonu sonrası, izole edilen RNA’ların konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 spektrofotometre ile ölçülmüştü. RNA konsantrasyonları dikkate alınarak, cDNA sentezinde kullanılacak total RNA’dan 1 µg alındı ve nükleaz içermeyen daha önceden buz üzerine yerleştirilmiş ve etiketlenmiş mikrosantrifüj tüpleri içerisine eklendi. 1 µg total RNA üzerine 1 µl oligo(DT) primer eklendi, son hacim ddH₂O 13 µl’ye tamamlandı. Tüpler Bio-Rad Thermal Block Cycler cihazına yerleştirildi +65 °C’de 10 dk inkübe edilerek RNA ikincil yapılarının denatürasyonu sağlandı ardından örnekler buz üzerine alındı. Çizelge 4.3.’te verilen bileşenler kullanılarak RT-Mix hazırlandı ve örnekler üzerine 7’şer µl RT-Mix dağıtıldı. Örnekler Bio-Rad Thermal Block Cycler cihazında 55°C’de 30 dk, 85°C’de 5 dk inkübe edildi. Ardından örnekler muhafaza edilmek üzere -20 °C dolabına kaldırıldı.

Çizelge 4.3. cDNA sentezi RT-Mix Hazırlama

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	HACİM
RT-Buffer	4 µl
RNAase İnhibitör	0.5 µl
dNTP Mix	2 µl
R Transcriptase	0.5 µl
Molecular Biology Grade Water	13 µl

4.2.2.2. Primer Tasarımı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu

4.2.2.2.1. Primer Tasarımı

ROR1 tüm hücre dışı alanını kapsayan, 42-391. amino asit aralığına karşılık gelen, 1050 baz çifti (ROR1 L) ve ROR1 hücre dışı alanında bulunan Frizzled ve Kringle domainlerini kapsayan 165-391. amino asit aralığına karşılık gelen, 681 baz çifti (ROR1 S) pET-30a(+) ifade plazmidi içerisine klonlanması için öncelikle hedeflenen bölgeye özgü nükleotid dizileri indirildi (Uniprot Q01973), BamHI ve SalI restriksiyon endonükleaz kesim bölgelerini içeren megaprimerler tasarlandı. Ek 2’de ROR1 L ve ROR1 S fragmentlerinin nükleotid dizisi ve kodladığı amino asit dizisi bulunmaktadır. Primerler tasarlandıktan ve sentez ettirildikten sonra PCR ile DNA amplifikasyonu aşamasına geçildi.

ROR1S F (5'-3'): GAC AAG GGG ATC CAT ATG GAA GAA GAT GGA TTC TGT CAG
CC (BamHI site)

ROR1L F (5'-3'): GAC AAG GGG ATC CCT ATG CCT ACC TCA TCA TGG AAC ATC
TC (BamHI site)

ROR1 R (5'-3'): AAT AGG TCG ACT GCA CGC TGG GAT GTC ACA CAG (Sall site)

4.2.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

-20°C dolabından muhafaza edilen, daha önce sentezlenmiş olan amplifiye edilecek kalıp DNA (cDNA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için gerekli olan diğer bileşenler buz üzerinde çalışma ortamına getirildi. Önceden etiketlenmiş ve buza gömülmüş PCR tüpleri içerisine uygun reaksiyon bileşenleri Çizelge 4.4.'deki miktarlara göre eklenerek hazırlandı. Bio-Rad Gradient Cycler cihazı uygun koşullara ayarlandı ve reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra PCR ürünleri analiz edilmek için %1 yoğunluğa sahip agaroz jele yüklenerek 80 V 45 dk yürütüldü.

Çizelge 4.4. PCR koşulları

Reaksiyon Bileşen Miktarları	PCR Koşulları
1- H ₂ O: 33.5 µl	1-94 °C 3 dk
2- 10X Buffer: 5 µl	2-94 °C 45 sn
3- MgCl ₂ : 3 µl	3-58 °C 30 sn
4- dNTP: 1 µl	4-72°C 3 dk
5- T7 Forward Primer: 2.5 µl	5-72°C 10 dk
6- T7 Reverse Primer: 2.5 µl	6-4°C sonsuz....
7- Taq Polymerase: 0.5 µl	2-3-4; 34 döngü
8- cDNA: 2 µl	

4.2.2.2.3. Agaroz Jelden PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Agaroz jelden PCR ürünlerini saflaştırırken FavorPrep Gel/PCR Purification Kit (FAGCK001) kullanıldı.

Agaroz jelde yürütülen PCR ürünleri, yürütme işlemi ardından görüntülendi. İlgili DNA bantları %70'lik etanol ile temizlenmiş bir bistüri kullanılarak jelden kesildi ve temiz,

önceden etiketlenmiş bir ependorf tüpe aktarıldı. Daha sonra bantların ağırlığı ölçüldü. İlgili bantların ağırlığına bağlı olarak bantlar üzerine FADF tamponundan eklendi 15-30 sn boyunca vorteksenerek karıştırıldı. Ardından süspansiyon, 55 °C'ye ayarlı su banyosunda her 2 dakikada bir tüp alt üst edilerek 10 dakika inkübe edildi. 10 dk inkübasyon sonunda agaroz jel tamamen çözüldükten sonra süspansiyon 800 µl alındı, toplama tüpleri içerisine yerleştirilen FADF kolonu içerisine aktarıldı. 11.000 x g'de 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, kolon içerisine 750 µl yıkama tamponundan eklendi. 11.000 x g'de 30 sn santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve tam hızda, 3 dk tekrar santrifüj edildi. Kolon yeni temiz ve boş bir ependorf tüp içerisine yerleştirildi. Kolon membran merkezine 40 µl ddH₂O eklendi, tam hızda 1 dk santrifüj edildi ve saflaştırılmış DNA 40 µl hacim içinde elue edildi.

4.2.2.3. PET30A(+) ve İnsert PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri İle Kesilmesi

Agaroz jelden saflaştırılan ROR1/S ve ROR1/L PCR ürünleri ve pET-30a(+) plazmid DNA'sı, BamHI ve Sall restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Kesim reaksiyonu Çizelge 4.5.'deki bileşenlerin uygun miktarlarda önceden etiketlenmiş ependorf tüpler içerisine eklenmesiyle hazırlandı. Reaksiyon bileşenlerini içeren ependorf tüpler Gradient Cycler (Bio-Rad) cihazında 37 °C'de 60 dk, 80 °C'de 10 dk inkübe edildi.

Çizelge 4.5. Restriksiyon Enzim Kesim Koşulları

Plazmid DNA / PCR ÜRÜNÜ	ddH ₂ O	10X Fast Digest Buffer	BamHI	Sall
Pet30- BamHI/Sall 0.2 µl	16.8 µl	2 µl	1 µl	1 µl
ROR1-S-BamHI/Sall 40 µl	X	5 µl	2 µl	2 µl
ROR1-L-BamHI/Sall 40 µl	X	5 µl	2 µl	2 µl

Kesim ürünlerini jelde yürütme, görüntüleme ve jelden kesim:

Kesim reaksiyonu sonrası, kesim ürünleri ve kesilmemiş pET30 plazmidi uygun hacimde 6X jel yükleme boyası ile karıştırılarak, %1 yoğunluğa sahip agaroz jel kuyularına yüklendi, 80 V'ta 45 dk yürütüldü. Ardından GeneGenius cihazında jel görüntüledi ve ilgili bantlar kesilerek ependorf tüplere alındı.

Agaroz jelden izolasyon:

Agaroz jelden izolasyon işlemi için FavorPrep Gel/PCR Purification Kit (FAGCK001) kullanıldı. Ependorf tüp içerisine 500 µl FADF tamponundan eklendi, vortekslenerek karıştırıldı. Ardından 55 °C'ye ayarlı su banyosunda her 2 dakikada bir tüp alt üst edilir 10 dakika inkübe edildi. Collection tüp içerisine FADF kolonu yerleştirildi ve kolon içerisine 800 µl eklendi. 11.000 g 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı, kolon içerisine 750 µl yıkama tamponundan eklendi. 11.000 g 30 sn santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve tam hızda, 3 dk tekrar santrifüj edildi. Kolon yeni temiz ve boş bir ependorf tüp içerisine yerleştirildi. Kolon membran merkezine 40 µl ddH₂O eklendi, tam hızda 1 dk santrifüj edildi.

4.2.2.4. Ligasyon Ve Transformasyon

Ligasyon reaksiyonu T4 DNA Ligaz ile gerçekleştirildi. Jelden saflaştırılan ürün ile plazmid DNA'nın ligasyon reaksiyonu, Çizelge 4.6.'de belirtilen bileşen miktarları ile hazırlandı. BamHI ve Sall enzimleri ile kesilmiş plazmid DNA'sı ve jelden saflaştırılan BamHI ve Sall enzimleri ile kesilmiş aktarılmak istenen DNA sırasıyla reaksiyona konuldu. Ependorf tüpler Bio-Rad Thermal Block Cycler cihazında 22°C 60 dk, 70 °C 5 dk inkübe edildi.

Çizelge 4.6. Ligasyon reaksiyonu

Plazmid DNA	Insert	ddH ₂ O	T4 DNA ligase buffer	T4 DNA ligase
Pet30-BamHI/SalI 7µl	X	10 µl	2 µl	1 µl
Pet30-BamHI/SalI 7µl	ROR1/S BamHI/SalI 10 µl	X	2 µl	1 µl
Pet30-BamHI/SalI 7 µl	ROR1-L- BamHI/SalI 10 µl	X	2 µl	1 µl

Ligasyon reaksiyonunu ardından, ürünler DH5 α -TR1 kompetan hücreye transforme edildi. Öncelikle -80°C dolabında muhafaza edilen, DH5 α -TR1 kompetan hücrelerini içeren ependorf tüpler alındı, buz üzerinde çalışma ortamına getirildi ve etiketlendi. İlgili örnek önceden etiketlenmiş olan DH5 α -TR1 kompetan hücrelerini içeren ependorf tüp içerisine aktratıldı. Ependorf tüp 30 dk buz üzerinde inkübe edildi, ardından 42°C su banyosunda 30 sn ışık şoku uygulandı. Ependorf tüp buz üzerinde 2 dk inkübe edildi. 1 ml LB besiyeri, ependorf tüp içerisine eklendi, ısıtılmalı-çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi, 37°C, 180 rpm'de, 1 saat inkübe edildi. +4 C'de muhafaza edilen LB-Agar-Kanamycin petri kapları çalışma ortamına getirildi, etiketlendi. Ependorf tüp 13.000 rpm'de, 1 dakika santrifüj edildi. 900 µl süpernatant uzaklaştırıldı, 100 µl ile pellet çözüldü. Aseptik ortamda, cam drigalski baget ile LB-Agar-Kanamycin petri kaplarına ekim işlemi gerçekleştirildi. Petri kapları, ters çevrilerek 37°C' de gece boyu inkübe edildi.

4.2.2.5. Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonu

PET30-ROR1-S, PET30-ROR1-L plazmidlerinin DH5 α klonlama suşuna transformasyon işleminden elde edilen koloniler ile sıvı kültür başlatıldı. 15 ml falkon içerisine 4 ml LB+Kanamycin karışımından eklendi. Pipet ucu ile bir koloni aldı, önceden etiketlenmiş falkon tüp içerisine atıldı. ROR1/S ve ROR1/L için 4'er koloni seçildi. Falkonlar ısıtılmalı-çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi, 37°C, 180 rpm'de, gece boyu sıvı kültüre bırakıldı.

Ertesi gün, Roche High Pure Plasmid Isolation Kit (11-754-777-001) kullanılarak plazmid DNA'sı izole edildi. Aseptik çalışma ortamı hazırlandı. Plazmid DNA'sı içeren sıvı bakteri

kültürden 1,5 ml alındı, önceden etiketlenmiş ependorf tüp içerisine aktarıldı ve 13.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılmasını takiben süspansiyon tamponundan 250 µl alındı, pellet çözüldü. Ardından süspansiyon üzerine 250 µl Lysis tamponu eklendi, alt üst edilerek yavaşça karıştırıldı ve 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Bu sırada toplama tüpü içerisine High Pure Filter Tube yerleştirildi. Santrifüj ardından süpernatant filtre tüp içerisine eklendi, tam hızda 20 sn santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. 700 µl yıkama Tamponu II filtre tüp içerisine eklendi ve tam hızda 1 dk santrifüj edildi sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Filtre tüp yeni temiz ve boş bir toplama tüpü içerisine yerleştirildi ve 100 µl elüsyon tamponu filtre tüp içerisine eklendi, tam hızda 1 dk santrifüj edildi. Saflaştırılmış plazmid DNA 100 µl elüsyon tamponu içerisinde elde edildi. Daha sonra saflaştırılan plazmid DNA'nın konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Yaklaşık 40 ng örnek 6X jel yükleme tamponu ile karıştırılarak %1 yoğunluğa sahip agaroz jel kuyularına yüklendi ve 80 V'ta 40 dk yürütüldü.

4.2.2.6. Klonlama Reaksiyonu Doğrulama

Polimeraz Zincir Reaksiyonu: Klonlama reaksiyonunu doğrulama amacı ile T7 Forward / Reverse primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu kuruldu. PCR tüpleri etiketlenerek hazırlandı. Tüpler içerisine uygun reaksiyon bileşenleri Çizelge 4.7.'deki miktarlara göre eklenerek hazırlandı. PCR sonrasında 10 µl PCR ürünü 2 µl 6X jel yükleme tamponu ile karıştırılarak %1'lik agaroz jel kuyularına yüklendi, 80 V'ta 90 dk yürütüldü. Ardından jel görüntüldü.

Çizelge 4.7. T7 F/R PCR bileşen miktarları ve koşulları.

Reaksiyon Bileşen Miktarları	PCR Koşulları
H ₂ O: 7 µl 10X Buffer: 1 µl MgCl ₂ : 0.6 µl dNTP: 0.2 µl T7 Forward Primer: 0.5 µl T7 Reverse Primer: 0.5 µl Taq Polymerase: 0.1 µl Plasmid DNA: 0.1-0.5 µl	1-94 °C 3 dk 2-94 °C 45 sn 3-58 °C 30 sn 4-72°C 3 dk 5-72°C 10 dk 6-4°C sonsuz.... 2-3-4; 34 döngü

Restriksiyon endonükleaz ile kesim kontrolü: Kolonilerden izole edilen plazmid DNA'ları BamHI ve Sall restriksiyon endonükleazları ile kesildi. Yaklaşık 100 ng plazmid DNA'sı su ile son hacmi 8 µl'ye tamamlanarak PCR tüpü içerisine eklendi. Üzerine 1 µl 10X Fast Digest Buffer ve 0,5'er µl BamHI / Sall eklendi. Tüpler Thermal Block Cycler cihazında 37°C 60 dk, 80 °C 10 dk inkübe edildi. Ardından örnekler %1'lik agaroz jel kuyularına yüklendi, 80 V'da 40 dk yürütüldü ve jel görüntüledi.

DNA dizi analizi: DNA dizi analizi yapılacak plazmid DNA fragmentleri, pET30(+) plazmidine spesifik T7 primerleri ile amplifiye edildi ardından PCR ürünleri DNA dizi analizine gönderildi.

4.2.3. REKOMBİNANT ROR1 PROTEİN İFADESİ

4.2.3.1. ROR1 Rekombinant Proteinin Küçük Ölçekli İndüklenmesi

-80°C dolabından BL21(DE3) kompetan hücrelerini içeren ependorf tüpler alındı, buz üzerinde çalışma ortamına getirildi ve etiketlendi. -20°C dolabından, pet30ROR1-S#3 ve pet30ROR1-L#4 plazmid DNA'ları alındı, buz üzerinde çalışma ortamına getirildi. Çalışma aseptik ortamda gerçekleştirildi. İlgili örnekten 1,5 µl alınarak önceden etiketlenmiş olan kompetan BL21(DE3) hücrelerini içeren ependorf tüp içerisine eklendi. Ependorf tüp 30 dk buz üzerinde inkübe edildi, ardından 42°C su banyosunda 30 sn ışık şoku uygulandı. Ardından buz üzerinde 2 dk inkübe edildi. 1 ml LB besiyeri, ependorf tüp içerisine eklendi, ısıtmalı-çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi, 37°C, 180 rpm'de, 1 saat inkübe edildi. +4 C'de muhafaza edilen LB Agar-Kanamycin petri kapları çalışma ortamına getirildi, etiketlendi. Ependorf tüp 13.000 rpm'de, 1 dakika santrifüj edildi. 900 µl süpernatant uzaklaştırıldı, 100 µl ile pellet çözüldü. Aseptik ortamda, cam drigalski baget ile LB-Agar-Kanamycin petri kaplarına ekim işlemi gerçekleştirildi. Petri kapları, ters çevrilerek 37°C' de gece boyu inkübe edildi.

Ertesi gün BL21.pet30, BL21.pet30.ROR1/S#3 ve BL21.pet30.ROR1/L#4 petri kaplarından pipet ucu ile koloni alındı, içerisinde 4 ml LB+Kanamycin (LB Kanamycin oranı 1:10000) bulunduran 15 ml falkon tüp içerisine pipet ucu ile atıldı. Falkon tüpler ısıtmalı-çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi, 37°C, 180 rpm'de, gece boyu sıvı kulture bırakıldı.

16 saat gece boyu kültürden sonra, falkon tüpler inkübatörden alınarak buza gömüldü. ROR1 rekombinant proteinin indüklenmesi için IPTG kullanıldı. Küçük ölçekli indükleme için 50 ml falkon tüpler aseptik şartlarda etiketlenerek hazırlandı. Falkonlar içerisine 5 ml LB+Kan karışımından eklendi. Sıvı kültürden 100 µl alınarak hazırlanmış falkon tüpler içerisine eklendi. Ardından falkonlar ısıtmalı-çalkalamalı inkübatöre kaldırıldı ve 28 °C 180 rpm'de 3 saat çalkalamaya bırakıldı. 3 saat sonunda kültürlerden 2,5 ml yeni falkon tüpler içerisine alındı. Aynı sıvı kültürü içeren falkon tüplerinden biri IPTG (+), diğeri IPTG (-) olarak etiketlendi ve IPTG (+) falkon tüpleri içerisine son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde IPTG reaktifi eklendi. IPTG uygulaması sonrası örnekler 28 °C 180 rpm'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon ardından kültürler inkübatörden alındı. Her bir kültür örneğinden immün blotlama analizleri 15 µl alındı ve önceden etiketlenmiş soğuk ependorf tüpler içerisine eklendi. Ek olarak her bir kültür örneğinden protein çözümlülük testi için 1,5 ml alındı ependorf tüp içerisine eklendi. sıvı azotta dondurularak, daha sonra immünblotlama için kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

4.2.3.2. ROR1 Rekombinant Protein Çözünürlük Testi

-80 °C dolabından, 1,5 ml bakteriyel kültürden elde edilen pellet alındı, buz üzerinde çalışma alanına getirildi. 10 ml 1X STE içerisine 1 mg lizozim, 5 mM imidazol ve 0,4 ml EDTA-free proteaz inhibitörü eklendi. Bu karışımından 500 µl alınarak pellet süspansiyon edildi ardından buz üstünde 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler üzerine 1X STE içerisine eklenmiş % 10 N-sarkozil karışımından 87,5 µl ve 1M DTT'den 2,5 µl eklendi. Tüp 3-6 kez 10'ar saniye sonike edildi. 13.000 rpm 4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni ve temiz bir ependorf tüpe aktarıldı (A-çözünür fraksiyon). Elde edilen pellet 500 µl 8M üre içinde çözüldü. 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 (B-üre fraksiyonu). Oluşan pellet 500 µl 1X SDS-PAGE yükleme tamponu içinde çözüldü (C-çözünür olmayan fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri). Örneklerin SDS-PAGE ile analizi için her bir fraksiyon 20 µl + 4 µl yükleme tamponu (6X Laemni Buffer) ile karıştırıldı. 100 V'da 60 dk yürütüldü. Ardından coomassie blue ile boyandı.

4.2.1. REKOMBİNANT ROR1 PROTEİN SAFLAŞTIRILMASI

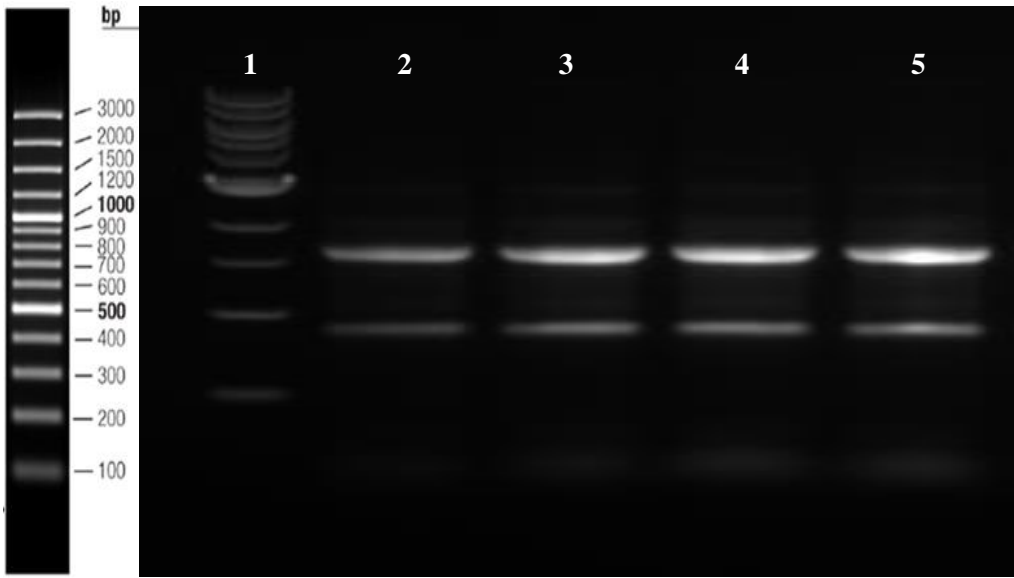
-80 °C dolabından, indüklenmiş bakteri kültüründen elde edilen pellet alındı, buz üzerinde çalışma alanına getirildi. 15 ml 1X STE Buffer, 1.5 mg lizozim, 0.5 ml EDTA-free proteaz inhibitör karıştırıldı. Pellet üzerine hazırlanmış olan solüsyondan 5 ml eklendi. Pipetaj yaparak pelletin yavaşça çözünmesi sağlandı. Çözülen pellet 15 dk buz üzerinde inkübe edildi. Ardından pellet üzerine 25 mM DTT ve 875 µl %10'luk N-sarkozil (1gr/10 ml STE) eklendi. Falkon tüp buz içerisine yerleştirildi ve sonikasyon cihazında 10 kez 10'ar saniye sonikasyon yapıldı. Sonikasyon ardından falkon tüpler 10.000 rpm 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni 50 ml falkon tüpe aktarıldı. SDS-PAGE analizi için süpernatandan 100 µl alındı yeni ve temiz bir ependorf tüp içerisine aktarıldı. Süpernatant üzerine 1,37 ml %10'luk Triton-X 100 solüsyonu ve 200 µl Ni-NTA eklendi. Tüp 700 x g'de 2 dk santrifüj edildi, süpernatant dikkatlice çekildi ve atıldı. Triton eklenmiş protein ekstraktı üzerine 6 ml dengeleme tamponu eklendi, 1 saat 4°C'de end-over rock platformunda inkübe edildi. Tüp 700 x g'de 2 dk santrifüj edildi, süpernatant dikkatlice çekildi ve ayrıldı. Süpernatant içerisinden 100 µl alındı yeni ve temiz bir ependorf tüp içerisine aktarıldı. 300 µl yıkama tamponu ile rezin yıkandı. 700 x g'de 2 dk santrifüj edildi, süpernatant dikkatlice çekildi ve ayrıldı. Süpernatant içerisinden 100 µl alındı yeni ve temiz bir ependorf tüp içerisine aktarıldı. Yıkama tamponu ile yıkama işlemi bir kere daha tekrarlandı. 130 µl elüsyon tamponu eklendi. 700 x g'de 2 dk santrifüj edildi, süpernatant dikkatlice çekildi ve ayrıldı. Süpernatant içerisinden 100 µl alındı yeni ve temiz bir ependorf tüp içerisine aktarıldı. Bu işlem bir kere daha tekrarlandı. 280 nm'de absorbans değerleri okundu. Örneklerin SDS-PAGE ile analizi için her bir fraksiyon 10 µl + 4 µl yükleme tamponu (6X Laemmi Buffer) ile karıştırıldı. 100 V'da 60 dk yürütüldü. Ardından coomassie blue ile boyandı.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. TOTAL RNA İZOLASYONU

Bu tez çalışmasında kullanılmak üzere ROR1 pozitif olan MDA-MB-231 hücrelerinin total RNA'sı izole edildi.

2 µl total RNA ve %0.8 yoğunluğa sahip agaroz jel kuyularına yüklendi ve 80V, 60 dk koşturuldu. Agaroz jelde görüntüleme ve nanodrop ölçümü sonrası total RNA'nın intakt şekilde izole edildiği gözlemlendi (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1.RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü.

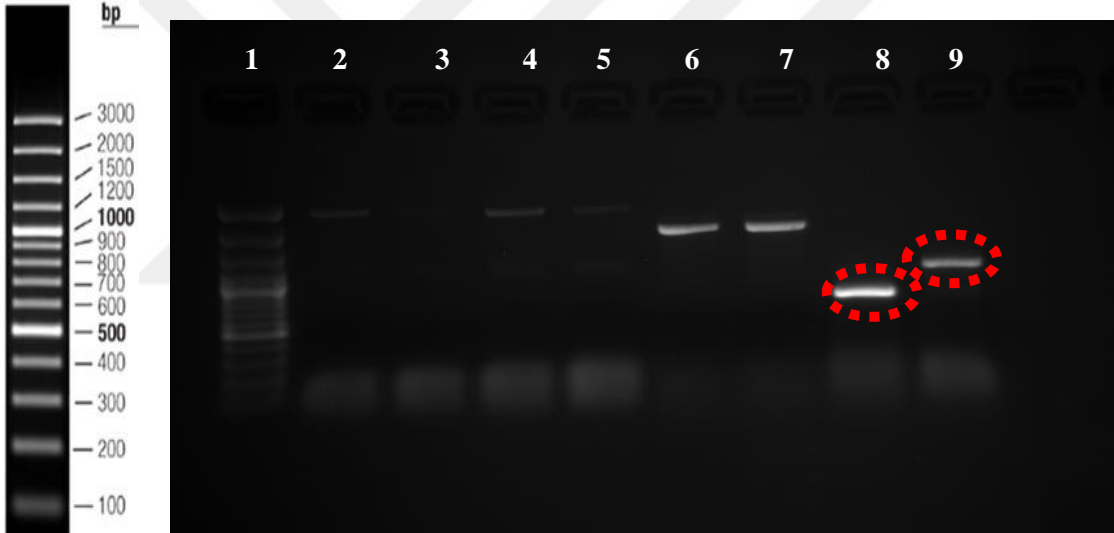
- 1) 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, SM0321)
- 2) MDA-MB-231 total RNA
- 3) MDA-MB-231 total RNA
- 4) MDA-MB-231 total RNA
- 5) MDA-MB-231 total RNA

MDA-MB-231 RNAsı ile cDNA elde edildi ve klonlama için kullanıldı.

5.2. ANTİJENİK BÖLGE BELİRLENMESİ VE ÇOĞALTILMASI

Rekombinant protein üretimi için antijenik bölge olarak, ROR1'in 42. ve 391. aminoasit aralığını kodlayan 1050 baz çiftinden oluşan hücre dışı alanı (ROR1 L) ve 165. ve 391. aminoasit aralığını kodlayan 681 baz çiftinden oluşan FZ ve Kringle alanını içeren bölgesi (ROR1 S) seçildi.

Literatür taraması sonucunda MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında ROR1 ifade düzeyinin yüksek olduğu görüldü, bu nedenle çalışmada bu hücre hattı kullanıldı MDA-MB-231 cDNA 'sı kalıp DNA olarak kullanılarak ROR1 S ve ROR1 L bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edildi. Amplifiye edilen bölgeler pET30a(+) plazmidi çoklu klonlama bölgesi içine yerleştirileceğinden ROR1 L ve ROR1 S'yi kesmeyen BamHI ve Sall enzim kesim bölgelerini iki ucunda içeren çoğaltılmak istenen dizilere özgü primerler tasarlanmıştır. 1050 nükleotid uzunluğundaki ROR1 L ve 681 nükleotid uzunluğundaki ROR1 S Taq polimeraz enzimi kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR sonrası 5 µl PCR ürünü, %1'lik agaroz jelde 80V, 45 dk yürütülmüştür. Agaroz jelde görüntüleme sonrası ROR1 L (1050 bç) ve ROR1 S (681 bç) alanlarının PCR ile amplifiye edildiği gözlenmiştir (Şekil 5.2.).

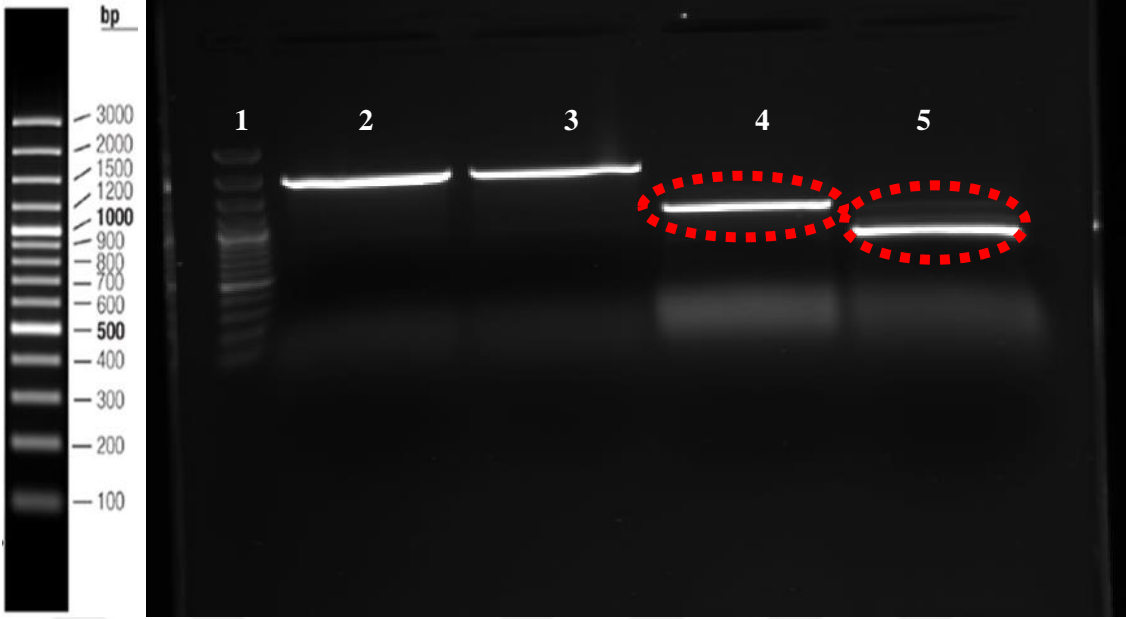


Şekil 5.2. ROR1 L ve ROR1 S PCR Ürününün Agaroz Jel Görüntüsü

- 1) 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, SM0321)
- 8) ROR1 S PCR ürünü,
- 9) ROR1 L PCR ürünü

5.3. ROR1 HÜCRE DIŞI ALANI VE ROR1 FZ + KRINGLE ALANININ PET30(A)+ İFADE PLAZMİDİNE KLONLANMASI

PCR analizi sonrası istenilen bölgelerin amplifiye edildiği anlaşılmıştır (Şekil 5.2.). Kalan 45 µl PCR ürünü %1'lik agaroz jele yüklenmiş ve 80 V 60 dk yürütülmüştür. Ardından agaroz jel görüntülenmiştir (Şekil 5.3.).



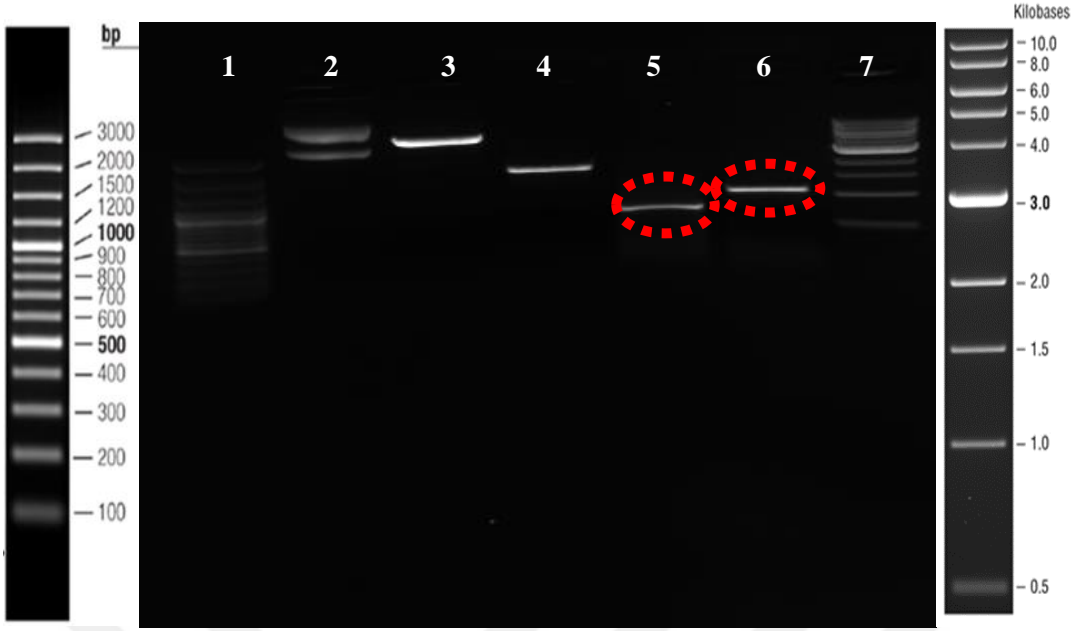
Şekil 5.3. ROR1 S ve ROR1 L PCR Saflaştırma Ürünlerinin Agaroz Jel Görüntüsü

- 1) 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, SM0321)
- 4) ROR1 L PCR ürünü
- 5) ROR1 S PCR ürünü

4. ve 5. kuyudaki ROR1 L ve ROR1 S bantları agaroz jelden kesilmiş ve ardından saflaştırılmıştır.

5.3.1. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM

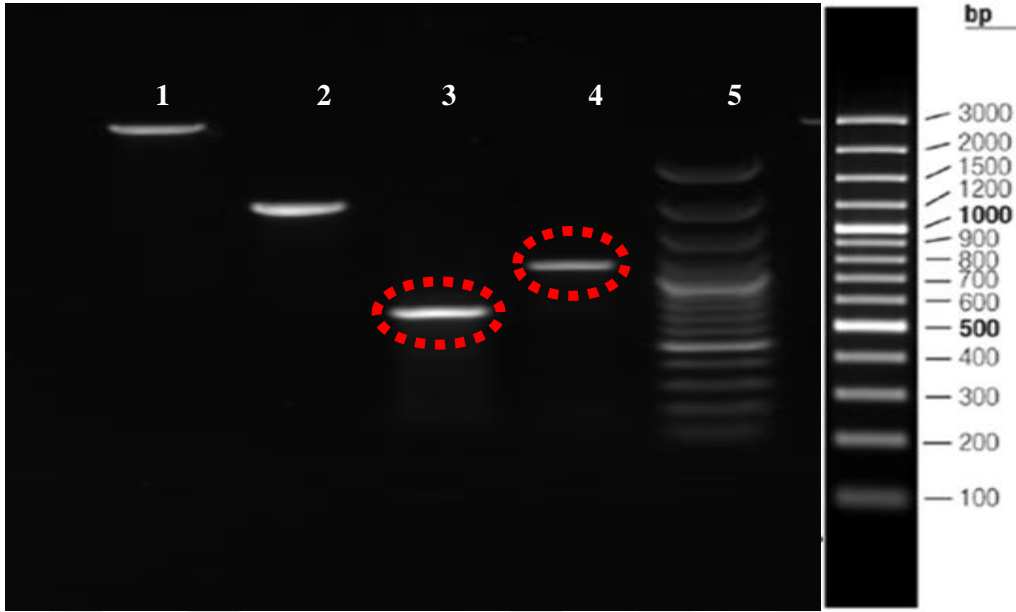
Restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri eklenerek amplifiye edilen ve ardından agaroz jelde yürütülen ROR1 L ve ROR1 S PCR ürünleri agaroz jelden saflaştırılmıştır. ROR1 L, ROR1 S ve pET-30a(+) DNA'sı BamHI ve Sall restriksiyon endonükleaz enzimleri ile 1 saat 37°C kesilmiştir. Kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülenmiştir ve DNA fragmentlerinin büyüklükleri UV ışık altında doğrulanmıştır. Sonrasında Şekil 5.4.'de verilen agaroz jelden sırasıyla 3. 5. ve 6. kuyulara yüklenen plazmid ve insert bantları kesilerek saflaştırılmıştır.



Şekil 5.4. BamHI ve SalI RE ile kesildikten sonra agaroz jel görüntüsü.

- 1) 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, SM0321)
- 2) Kesilmemiş pET30a(+) DNA
- 3) pET30a(+) DNA + BamHI + SalI
- 4) HER3-ECD + BamHI + SalI
- 5) ROR1 S + BamHI + SalI
- 6) ROR1 L + BamHI + SalI
- 7) 1 kb DNA ladder (NewEnglandBiolabs, N3232S)

Agaroz jelden saflaştırılan enzim kesim ürünlerin 8 μ l'si %1'lik agaroz jele yüklendi ve 80V, 40dk kıştıruldu (Şekil 5.5.).



Şekil 5.5. Ligasyon öncesi saflaştırma kontrolü (Agaroz Jel).

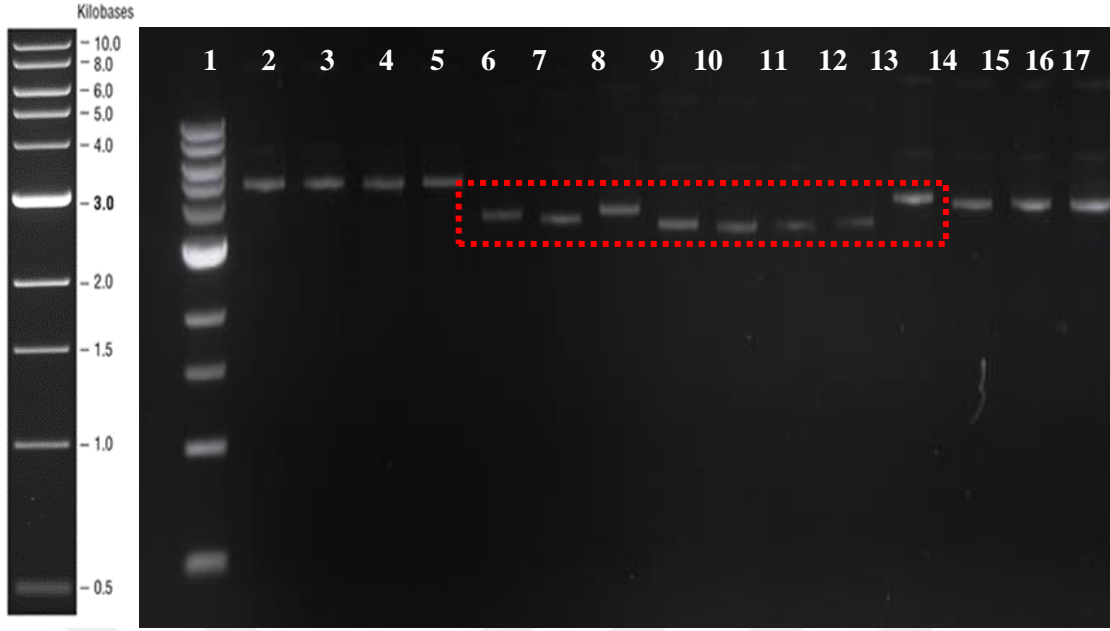
- 1) pET30a(+) PLazmid DNA + BamHI + SalI
- 2) pET30a(+)
- 3) ROR1 S + BamHI + SalI
- 4) ROR1 L + BamHI + SalI
- 5) 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, SM0321)

5.3.2. LİGASYON VE TRANSFORMASYON

Ligasyon sırasında 3:1 insert: vektör oranı kullanılarak, pET30a(+) plazmid DNA ve ROR1 S ve ROR 1 L kesim ürünleri 22°C'de 1 saat ligasyon reaksiyonuna konulmuştur. Ligasyon ve ısı inaktivasyonunu takiben, ligasyon ürünleri kompetan *E. coli* DH5 α -TR1 klonlama suşuna transforme edilmiştir.

5.3.3. KOLONİLERDEN PLAZMİD DNA İZOLASYONU

Transformasyon sonrası elde edilen koloniler LB besiyeri sıvı kültüründe gece boyu kültüre bırakılmıştır. Gece boyu kültür sonrası miniprep DNA izolasyonu ile kolonilerden plazmid DNA'sı izole edilmiş ve %1'lik agaroz jelde 80 V 45 dk yürütülerek kontrol edilmiştir. Yaklaşık 40-50 ng arası plasmid DNA'sı %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 5.6.).



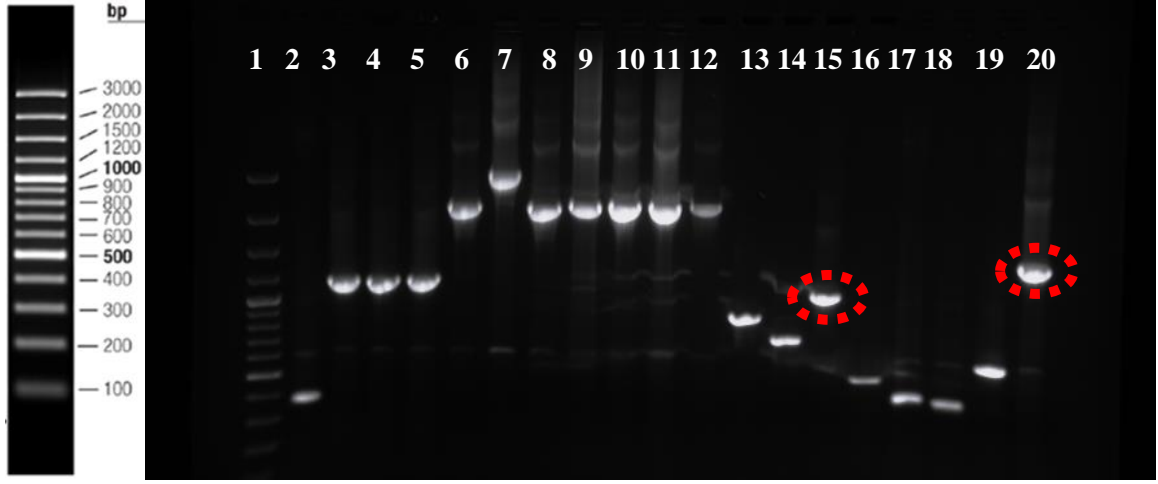
Şekil 5.6. Kolonilerden plazmid DNA izolasyonu.

- 1) 100 bp DNA ladder
- 6) pET30a.ROR1 S#1
- 7) pET30a.ROR1 S#2
- 8) pET30a.ROR1 S#3
- 9) pET30a.ROR1 S#4
- 10) pET30a.ROR1 L#1
- 11) pET30a.ROR1 L#2
- 12) pET30a.ROR1 L#3
- 13) pET30a.ROR1 L#4

5.3.4. ROR1 KLONLAMA KONTROLÜ

T7 Primerleri ile İnsert Kontrolü:

pET30 plazmidine spesifik T7 primerleri kullanılarak (Ek1) plazmid DNA'sında ROR1 L ve ROR1 S insert kontrolü için polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiş ardından örnekler analiz için %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 5.7.). 2 numaralı kuyuda boş pET30'da beklenen yaklaşık 340 bç'lik fragment gözlenmiştir. ROR1 S için beklenen 1021 bç'lik fragment 3 numaralı kolonide gözlenmiştir (kuyu 15). ROR1 L için beklenen 1390 bç'lik fragment ise 4 numaralı kolonide gözlenmiş (kuyu 20) ve ileri deneyler için bu klonlar kullanılmıştır.



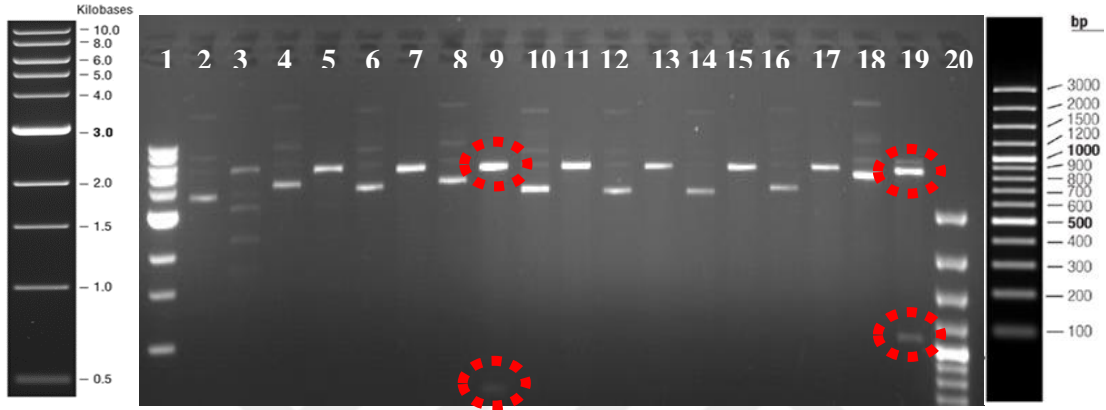
Şekil 5.7. T7 Primerleri insert kontrolü.

- 1) 100 bp DNA ladder
- 2) pET30a(+) DNA
- 13) pET30a.ROR1 S#1
- 14) pET30a.ROR1 S#2
- 15) pET30a.ROR1 S#3

- 16) pET30a.ROR1 S#4
- 17) pET30a.ROR1 L#1
- 18) pET30a.ROR1 L#2
- 19) pET30a.ROR1 L#3
- 20) pET30a.ROR1 L#4

Restriksiyon Endonükleaz Kesim Kontrolü:

Ligasyon ürünlerinin DH5 α -TR1 klonlama suşuna transformasyonundan elde edilen kolonilerden izole edilen yaklaşık 100 ng plazmid DNAsı, klonlama reaksiyonunu doğrulamak için BamHI ve Sall restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş ve kesim ürünleri agaroz jele yüklenerek insert boyları analiz edilmiştir (Şekil 5.8.). 9 ve 19 numaralı kuyularda beklenen insert fragmentleri gözlenmiştir.



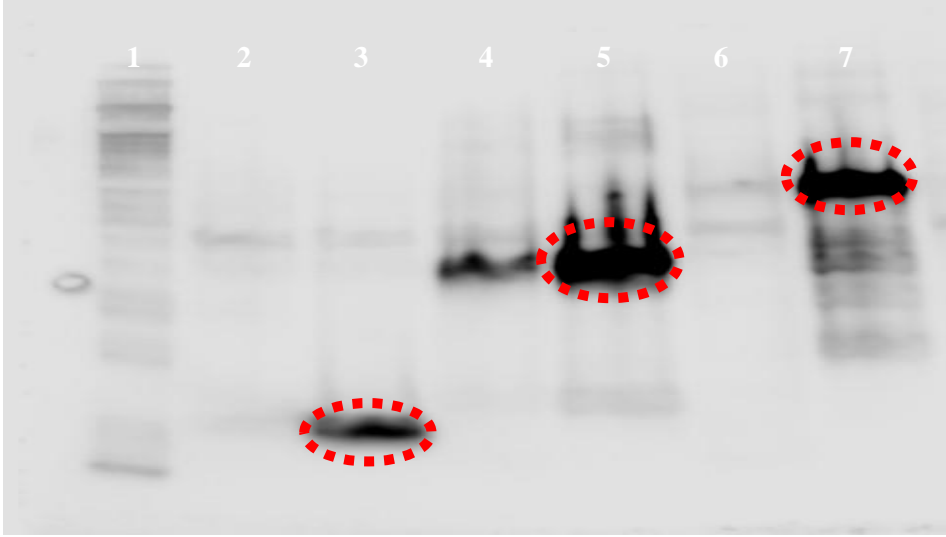
Şekil 5.8.Ligasyon sonrası plazmidlerin BamHI ve Sall enzimleriyle kesim kontrolü.

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1) 1 kb DNA ladder | 11) KesilmişROR1 S#4 BamHI/Sall |
| 2) Kesilmemiş pET30a(+) | 12) Kesilmemiş ROR1 L#1 |
| 3) Kesilmiş pET30a(+) | 13) Kesilmiş OR1 L#1BamHI/Sall |
| 4) Kesilmemiş ROR1 S#1 | 14) Kesilmemiş ROR1 L#2 |
| 5) Kesilmiş ROR1 S#1 BamHI/Sall | 15) Kesilmiş ROR1 L#2BamHI/Sall |
| 6) Kesilmemiş ROR1 S#2 | 16) Kesilmemiş ROR1 L#3 |
| 7) Kesilmiş ROR1 S#2 BamHI/Sall | 17) Kesilmiş ROR1 L#1BamHI/Sall |
| 8) Kesilmemiş ROR1 S#3 | 18) Kesilmemiş ROR1 L#4 |
| 9) Kesilmiş ROR1 S#3 BamHI/Sall | 19) Kesilmiş ROR1 L#4BamHI/Sall |
| 10) Kesilmemiş ROR1 S#4 | 20) 100 bp DNA Ladder |

DNA Dizi Analizi:

ROR1 S 3.koloniye ve ROR1 S 4. koloniye ait PCR ürünleri DNA dizi analizi ile incelenmiştir.

DNA dizi analizi sonucunda BamHI ve Sall restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri arasına başarı ile ROR1S dizisinin klonlandığı görülmüştür (Şekil 5.9., 5.10.). Sarı ile işaretlenen bölgeleri pET30a(+) nükleotid dizisi ile yeşil ile işaretlenen bölgeler hedeflenen ROR1S nükleotid dizisi ile homoloji göstermektedir.



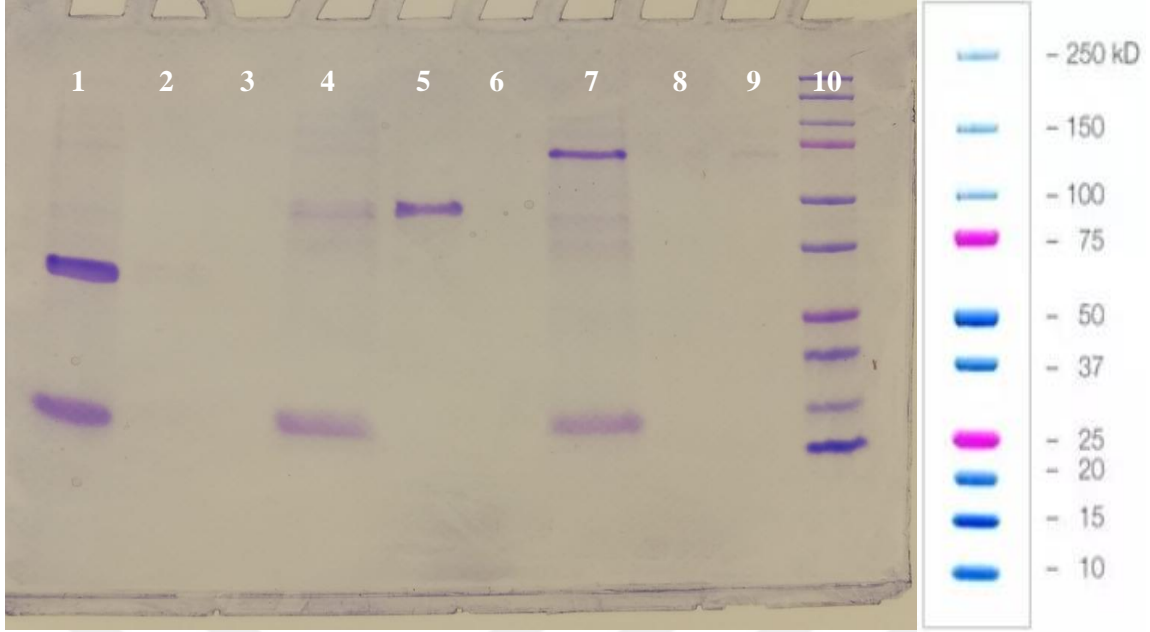
Şekil 5.13.ROR1S / ROR1L İmmünblotlama ile Analizi.

- 1) Protein Standardı (Bio-Rad #1610374)
- 2) BL21.pET30a (-IPTG)
- 3) BL21. pET 30a (+IPTG)
- 4) BL21. pET 30a.ROR1S#3 (-IPTG)
- 5) BL21. pET 30a.ROR1S#3 (+IPTG)
- 6) BL21. pET 30a.ROR1L#4 (-IPTG)
- 7) BL21. pET 30a.ROR1L#4 (+IPTG)

5.4.1. ROR1 REKOMBİNANT PROTEİN ÇÖZÜNÜRLÜK TESTİ

pET-30a plazmidi içine klonlanıp N terminalinde 6xHis Tag ile ifade ettirilen ROR1 L ve ROR1 S proteinin çözünürlüğü test edilmiştir. pET-30a, pET-30a.ROR1 L ve pET-30a.ROR1 S plazmidleri BL21(DE3) ifade suşunda ifade ettirilmiş ardından 0.5 mM IPTG ile indüklenmiştir. Çözünürlük testi ile elde edilen çözünür fraksiyon, ürede çözünen fraksiyon ve çözünür olmayan fraksiyon SDS-PAGE ile ayrıştırılmıştır. Ardından jel Coomassie Blue ile boyanmıştır.

Bu analiz sonucunda, ifade ettirilen her iki rekombinant proteinin çözünür fraksiyonda yer almakla birlikte (Şekil 5.10.), bir kısım ROR1L ise üre çözünür fraksiyonda yer aldığı gözlenmiştir.

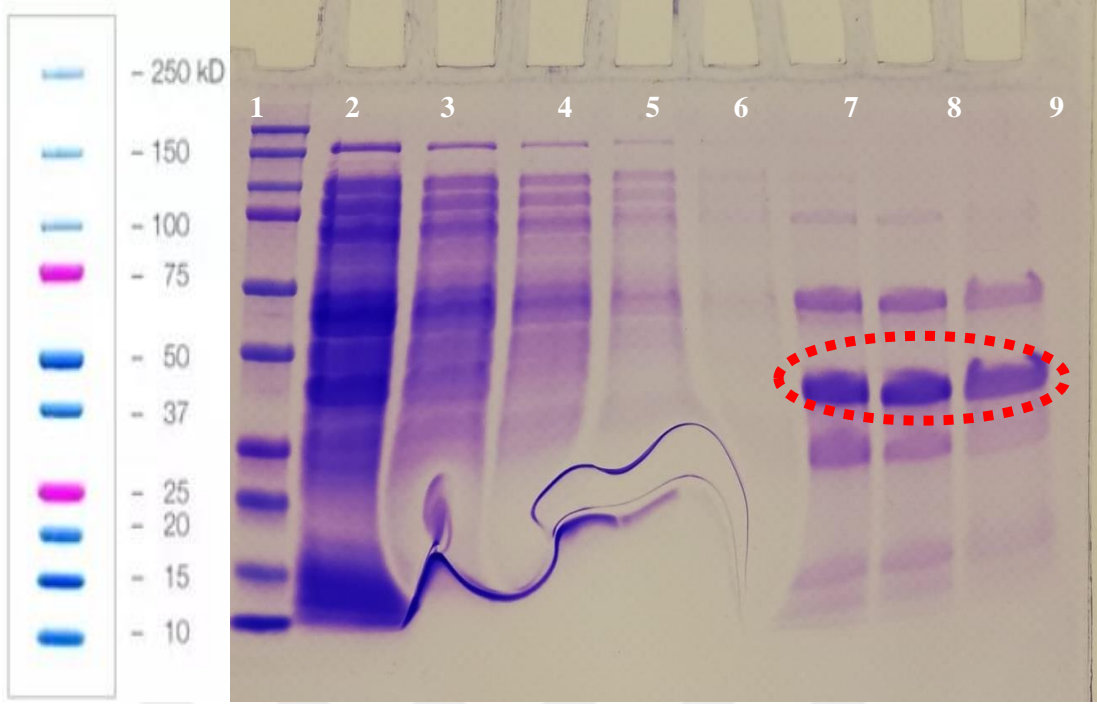


Şekil 5.14.ROR1 S ve ROR1 L rekombinant proteininin protein çözünürlük testi (Coomassie boyama).

- 1) BL21 pET-30a +ROR1 S IPTG (Çözünür fraksiyon)
- 2) BL21 pET-30a + ROR1 SIPTG (Üre çözünür fraksiyon)
- 3) BL21 pET-30a +ROR1 S IPTG (Çözünmeyen fraksiyon)
- 4) BL21 pET-30a+ROR1 L + IPTG (Çözünür fraksiyon)
- 5) BL21 pET-30a+ROR1 L + IPTG (Üre çözünür fraksiyon)
- 6) BL21 pET-30+ROR1 L + IPTG (Çözünmeyen fraksiyon)
- 10) Protein standardı, (Bio-Rad, 1610374)

5.5. REKOMBİNANT ROR1 S ve ROR1 L SAFLAŞTIRILMASI

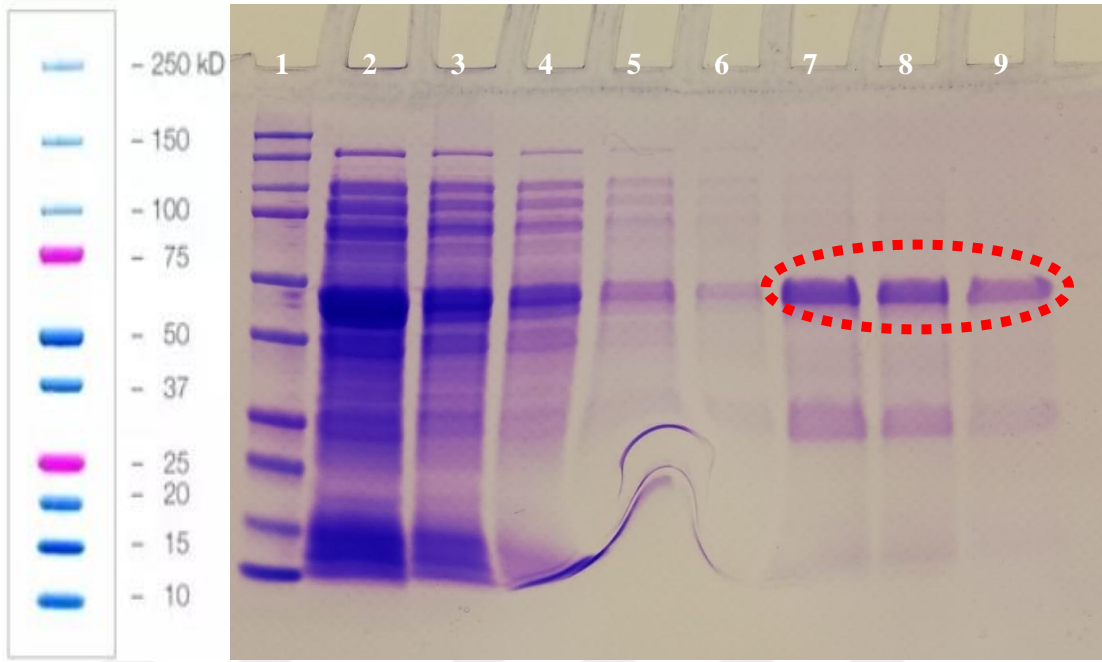
Orta ölçekte üretilen bakteriyel kültürden yöntem bölümünde belirtildiği şekilde protein saflaştırılmıştır. Saflaştırma sırasında farklı aşamalarda SDS-PAGE için protein örnekleri ayrılmıştır. Ardından bu örnekler SDS-PAGE ile jelde ayrıştırılmış Coomassie blue boyaması (Şekil 5.11.) ve immünblotlama yöntemi (Şekil 5.12.) ile analiz edilmiştir.



Şekil 5.15.ROR1 S saflaştırma (Coomasie boyama).

- 1) Protein standardı (Bio-Rad, 1610374)
- 2) BL21 pET30(a).ROR1 S+ IPTG (Total hücre lizatı)
- 3) BL21 pET30(a).ROR1 S +IPTG (Hücre lizatı rezin sonrası)
- 4) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (1.yıkama)
- 5) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (2.yıkama)
- 6) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (3.yıkama)
- 7) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (elüsyon 1)
- 8) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (elüsyon 2)
- 9) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (elüsyon 3)

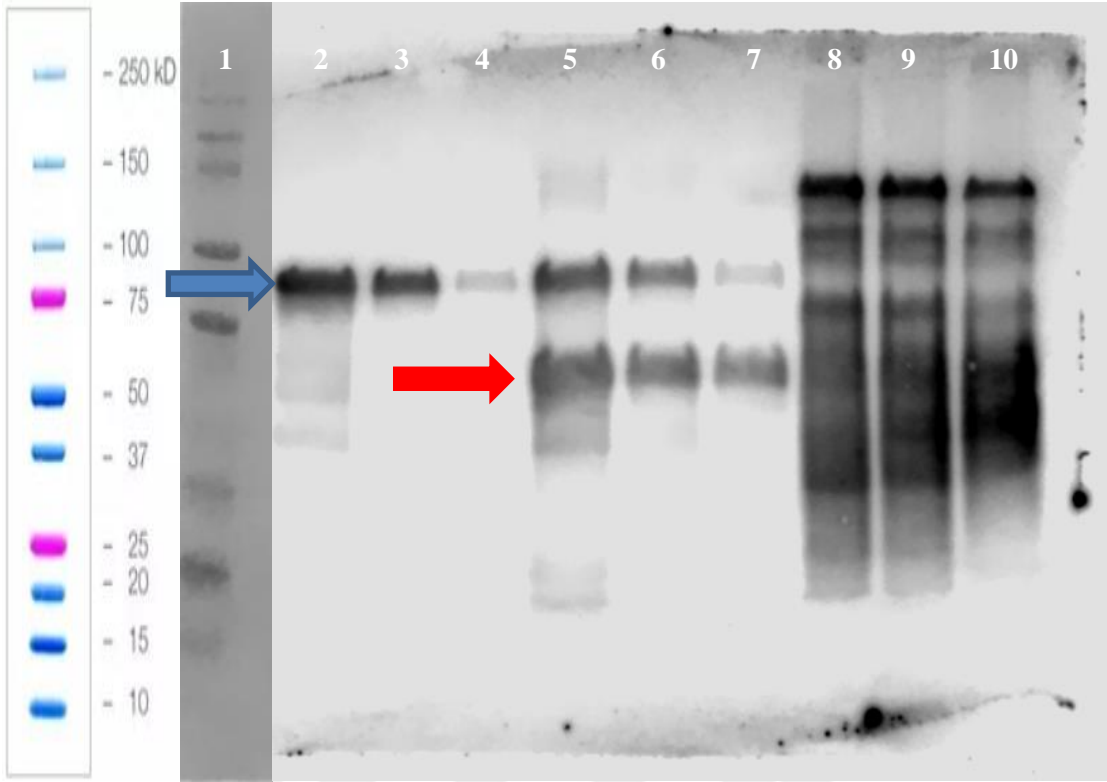
7,8,9 numaralı kuyularda yer alan 33 kDa civarı bant ROR1S'tir. Üstünde dimer gözlenmektedir.



Şekil 5.16.ROR1 L saflaştırma (Coomasie boyama).

- 1) Protein standardı, (Bio-Rad, 1610374)
- 2) BL21 pET30(a).ROR1 L+ IPTG (Total hücre lizati)
- 3) BL21 pET30(a).ROR1 L +IPTG (Hücre lizati rezin sonrası)
- 4) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (1.yıkama)
- 5) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (2.yıkama)
- 6) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (3.yıkama)
- 7) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (elüsyon 1)
- 8) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (elüsyon 2)
- 9) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (elüsyon 3)

7,8,9 numaralı kuyularda yer alan 46 kDa civarı bant ROR1L proteinidir.



Şekil 5.17.ROR1 S ve ROR1 L saflaştırma.

- 1) Protein standardı, (Bio-Rad, 1610374)
- 2) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (elüsyon 1)
- 3) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (elüsyon 2)
- 4) BL21 pET30(a).ROR1 L + IPTG (elüsyon 3)
- 5) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (elüsyon 1)
- 6) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (elüsyon 2)
- 7) BL21 pET30(a).ROR1 S + IPTG (elüsyon 3)

Mavi ok ile gösterilen 2,3,4 numaralı kuyularda yer alan 46 kDa civarı bant ROR1L proteini, kırmızı ok ile gösterilen 5,6,7 numaralı kuyularda yer alan 33 kDa civarı bant ROR1S proteinidir. Üstünde dimer gözlenmektedir.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Kanser dünya genelinde birçok insanı etkileyen, yaşam kalitesini düşüren, görülme sıklığı her geçen gün artan önemli bir halk sağlığı sorunudur ve küresel ölçekte önde gelen ikinci ölüm nedenidir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından üretilen GLOBOCAN verilerine göre, 2020 yılında 19,3 milyon kişiye kanser teşhisi konulmuştur bu sayının 2040 yılında 28.9 milyon kişiye ulaşması beklenmektedir (2). Kanser kaynaklı ölüm oranındaki hızlı artış araştırmacıları kanser tedavisi için yeni etkili tedavi yöntemleri keşfetmeye yöneltmiştir. Bu amaçla öncelikli olarak kanser gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayan temel biyolojik nedenler araştırılmıştır. Kanser gelişiminde ve ilerlemesinde hayati role sahip çeşitli tümörle ilgili antijenler tanımlanmış ve bu antijenlerin kanser hücrelerinde aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir. Kanser hastalarında semptomları kontrol etmek, hastaların yaşam süresini uzatmak için bu antijenleri hedefleyen çeşitli terapötik yöntemler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir.

Kanser hücrelerinde aşırı ifade edilen antijenlerden biri de Reseptör tirozin kinaz benzeri orphan reseptör 1'dir (ROR-1). Reseptör tirozin kinaz ailesi üyesi olan ROR1, embriyonik gelişim sırasında ifade edilmekte, doğum sonrası yetişkin dokularda ise ifadesi ihmal edilebilir seviyelere düşmektedir ancak ROR1 pankreas, yumurtalık, meme, akciğer, mide kanseri gibi solid tümörlerde ve bir dizi hematolojik malignitede aşırı ifade edilmektedir (50). Kanser hücrelerinde ROR1'in aşırı ifade edilmesi tümör hücresi büyümesi, metastazı, hayatta kalması ve tedavi direnci ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenlerden dolayı ROR1, hematolojik ve solid tümörlerin tedavisinde kullanılmak üzere anti-kanser terapötik yöntemlerin geliştirilmesi için umut verici bir hedefdir. ROR1'i hedefleyen birkaç anti-ROR1 monoklonal antikor geliştirilmiş olmasına rağmen sadece insansı monoklonal antikor Cirtuzumab nükseden ve refrakter KLL hastalarında faz I denemesine geçmiştir ve , KLL hücrelerinin apoptozunu indüklemeye etkili olduğu kanıtlanmıştır (53). Cirtuzumab etkinliği, tolere edilebilirliği ve güvenliği test edilmiş ve iyi tolere edildiği, doza bağlı hiçbir olumsuz reaksiyon göstermediği rapor edilmiş ve klinik insan deneylerinde daha fazla değerlendirilmesi teşvik edilmiştir (47). Cirtuzumab ROR1 hücre dışı alanına bağlanarak ligand bağlanmasını engellemekte ve ROR1'in sinyal iletimini bloke ederek kanser

hücrelerinin apoptozunu indüklemektedir. Bu çalışma, Frizzled-benzeri CRD ve Kringle alanına karşı spesifik mAb'lerin geliştirilmesinin yolunu açmıştır. Hematolojik ve solid tümörlerin tedavi edilebilmesi, hastaların yaşam kalitesi ve sağ kalım süresinin arttırılabilmesi için mevcut anti-ROR1 monoklonal antikorlarının klinik yanıtları dikkate alınarak daha efektif anti-ROR1 monoklonal antikorlarının geliştirmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasında ROR1 pozitif kanser hastalarının tedavisi veya tanısında kullanılması amacıyla anti-ROR1 monoklonal antikor geliştirilmesinin ilk basamağı olan ROR1 rekombinant proteini üretilmiştir. Üretilen iki rekombinant protein daha sonraki çalışmada yeni ve özgün anti-ROR1 monoklonal antikor geliştirilmesi için antijen olarak kullanılacaktır. Tez çalışmasında geliştirilen 6xHistaq-ROR1S ve 6xHistaq-ROR1L rekombinant proteinlerinden ROR1L tüm hücre dışı alanı kapsarken, ROR1S frizzled ve dimerizasyon için gerekli olan kringle alanlarını kapsamaktadır.

Yapılan literatür araştırması sonucunda MDA-MB-231 hücre hattının ROR1 aşırı ifade ettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle rekombinant antijen üretilirken DNA kaynağı olarak MDA-MB-231 hücrelerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Hücreler uygun koşulda kültür edildikten sonra, hücrelerden total RNA izole edilmiş ve cDNA sentezlenmiştir.

Rekombinant protein üretilmesi amacıyla ROR1 hücre dışı alanını tamamen kodlayan, 42-391. amino asit aralığına karşılık gelen 1050 nükleotid ve reseptör hücre dışı alanında bulunan Frizzled ve Kringle domainlerini kodlayan, 165-391. amino asit aralığına karşılık gelen 681 nükleotid pET-30a ifade plazmidinin çoklu klonlama bölgesinin içerisine klonlanmış, *E.coli* DH5 α -TR1 bakteri suşuna transforme edilmiş ve *E.coli* BL21(DE3) suşunda rekombinant proteinler protein ifade ettirilmiştir.

Çalışmada pET ekspresyon sistemi, pET-30a(+) plazmidi çoklu klonlama bölgesinin 5'ucunda 6xHistaq kodladığı için kullanılmıştır. Plazmidin bu özelliği sayesinde rekombinant proteinler 6xHis taq füzyonlu üretilebilmiş ve ROR1L ve ROR1S proteinleri N-terminal füzyon proteini olarak saflaştırılabilmektedir.

Klonlanan dizinin bütünlüğünü ve klonlama doğruluğunu teyit etmek için birkaç farklı yöntem uygulanmıştır. İlk olarak pET30a(+) plazmidine spesifik T7 forward ve reverse primerleri kullanılarak, PCR ile plazmid DNA'sı amplifiye edilmiş ve PCR ürünleri agaroz jelde insert varlığı için kontrol edilmiştir. Ek 1'de verilen plazmid haritasına bakıldığında

T7 promotör bölgesinin plazmid çoklu klonlama bölgesinin başında T7 terminatör bölgesinin ise plazmid çoklu klonlama bölgesinin sonunda olduğu görülmektedir. Şekil 5.7.'de boş pET30'da beklenen yaklaşık 340 bç'lik fragment gözlenmiş, ROR1 S için beklenen 1021 bç'lik fragment sadece 3 numaralı kolonide gözlenirken ROR1 L için beklenen 1390 bç'lik fragment ise sadece 4 numaralı kolonide gözlenmiştir. Diğer kolonilerden elde edilen plazmid DNA'larında beklenen insert olmadığı gözlemlendi bu nedenle sonraki aşamalar için ROR1S için 3. Koloni ile ROR1L için 4. Koloni ile devam edilmiştir. Bu sonuç restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası da doğrulanmıştır. Ve son olarak bu iki koloni DNA dizi analizi ile de incelenmiştir. Amino asit seviyesinde değişimler gözlemlendiğinden DNA dizi analizi tekrarlanabilir.

İnsert kontrolü sonrası seçilen pET30a.ROR1S#3, pET30a.ROR1L#4 ve pET-30a plazmid DNA'ları, proteini ifade ettirmek için *E. coli* BL21(DE3) protein ifade suşuna transforme edilmiştir ve ardından bakteriyel kültür IPTG ile indüklenmiştir. 6xHistaq-ROR1S ve 6xHistaq-ROR1L rekombinant proteinleri ifade ettirildikten sonra protein ifadesi, anti-Histaq primer antikoru ile işaretlenerek immünblotlama analizinde incelenmiştir. İmmünblotlama sonucunda ROR1L için 47 kDa, ROR1S için de 33 kDa beklenen bantlar gözlenmiştir.

Protein ifade edildiği tespit edildikten sonra pET-30a plazmidine klonlanıp N terminalinde 6xHis Tag ile ifade ettirilen ROR1 S ve ROR1 L proteinlerinin çözünürlük testi yapılmıştır. Bu amaçla, proteinler ifade ettirildikten sonra hücre pelletleri çözünür fraksiyon, ürede çözünen fraksiyon ve çözünür olmayan fraksiyon olarak SDS-PAGE ile jelde ayrıştırılmıştır. Bu analiz sonucunda rekombinant proteinler çözünür fraksiyonda gözlenmiştir, bir kısım ROR1L üre çözünür fraksiyondadır, ancak daha düşük sıcaklıktaki indüklemeler sonucu çözünür fraksiyonda olacağı öngörülmektedir (Şekil 5.10.).

Proteinlerin çözünebilir olduğunun görülmesinin ardından 6xHistaq-ROR1S ve 6xHistaq-ROR1L rekombinant proteinleri orta ölçekte üretilmiştir.

Orta ölçekli üretim sonrası bakteriyel kültürden protein saflaştırmak için Ni-NTA rezin ile lizozim ve proteaz inhibitörleri kullanılmış ve rekombinant His-etiketli proteinler saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası protein örnekleri SDS-PAGE jelde yürütülmesinin ardından hem immünblotlama hem de coomassie boyama ile analiz edilmiş ve saflaştırma

işleminin başarı ile gerçekleştiği gözlenmiştir. Protein örnekleri başarı ile elue edilmiş, 6xHistaq-ROR1S 33 kDa bölgesinde ve 6xHistaq-ROR1L rekombinant proteinleri 47 kDa bölgesinde belirgin bant göstermiştir.

6.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında ROR1 hücre dışı alanı iki farklı boyutta fragmentler halinde ve histidin taq ile konjuge edilmiş olarak, pET30 bakteriyel ekspresyon sisteminde başarı ile ifade ettirilmiştir. Optimizasyona ihtiyaç olsa da orta ölçekte saflaştırma protokolü oluşturulmuştur. Üretilen ve saflaştırılan 6xHistaq-ROR1S ve 6xHistaq-ROR1L rekombinant proteinleri laboratuvarımızda hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikör geliştirmek için antijen olarak kullanılacaktır. Büyük ölçekte saflaştırma ve takip eden diyaliz prosedürlerinin immünizasyon öncesi taze şekilde uygulanması isabetli olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*. 2021;127(16):3029–30.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
3. Grunwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(12):851–67.
4. Shabani M, Naseri J, Shokri F. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1: a novel target for cancer immunotherapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(7):941–55.
5. Liu Y, Yang H, Chen T, Luo Y, Xu Z, Li Y, et al. Silencing of receptor tyrosine kinase ROR1 inhibits tumor-cell proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127092.
6. Masiakowski P, Carroll RD. A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem*. 1992;267(36):26181–90.
7. Zhao Y, Zhang D, Guo Y, Lu B, Zhao ZJ, Xu X, et al. Tyrosine Kinase ROR1 as a Target for Anti-Cancer Therapies. *Front Oncol* [Internet]. 2021 May 28;11:680834. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34123850>
8. Kamizaki K, Endo M, Minami Y, Kobayashi Y. Role of noncanonical Wnt ligands and Ror-family receptor tyrosine kinases in the development, regeneration, and diseases of the musculoskeletal system. *Dev Dyn*. 2021;250(1):27–38.
9. Oishi I, Takeuchi S, Hashimoto R, Nagabukuro A, Ueda T, Liu Z, et al. Spatio-temporally regulated expression of receptor tyrosine kinases, mRor1, mRor2, during mouse development: implications in development and function of the nervous system. *Genes to Cells*. 1999;4(1):41–56.

10. Balakrishnan A, Goodpaster T, Randolph-Habecker J, Hoffstrom BG, Jalikis FG, Koch LK, et al. Analysis of ROR1 protein expression in human cancer and normal tissues. *Clin Cancer Res.* 2017;23(12):3061–71.
11. Forrester WC. The Ror receptor tyrosine kinase family. *Cell Mol Life Sci C.* 2002;59(1):83–96.
12. Daneshmanesh AH, Hojjat-Farsangi M, Khan AS, Jeddi-Tehrani M, Akhondi MM, Bayat AA, et al. Monoclonal antibodies against ROR1 induce apoptosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia.* 2012;26(6):1348–55.
13. GeneCards. No Title [Internet]. Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ROR1>
14. Aghebati-Maleki L, Shabani M, Baradaran B, Motallebnezhad M, Majidi J, Yousefi M. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR-1): An emerging target for diagnosis and therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Pharmacother.* 2017;88:814–22.
15. Saldanha J, Singh J, Mahadevan D. Identification of a Frizzled-like cysteine rich domain in the extracellular region of developmental receptor tyrosine kinases. *Protein Sci.* 1998;7(7):1632–5.
16. Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF, Shen Z, Wu R, et al. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest.* 2016;126(2):585–98.
17. Yu J, Chen L, Chen Y, Hasan MK, Ghia EM, Zhang L, et al. Wnt5a induces ROR1 to associate with 14-3-3 ζ for enhanced chemotaxis and proliferation of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* 2017;31(12):2608–14.
18. Hasan MK, Yu J, Widhopf GF, Rassenti LZ, Chen L, Shen Z, et al. Wnt5a induces ROR1 to recruit DOCK2 to activate Rac1/2 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, J Am Soc Hematol.* 2018;132(2):170–8.
19. Karvonen H, Niininen W, Murumägi A, Ungureanu D. Targeting ROR1 identifies

- new treatment strategies in hematological cancers. *Biochem Soc Trans.* 2017;45(2):457–64.
20. Broome HE, Rassenti LZ, Wang H-Y, Meyer LM, Kipps TJ. ROR1 is expressed on hematogones (non-neoplastic human B-lymphocyte precursors) and a minority of precursor-B acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2011;35(10):1390–4.
 21. Stricker S, Rauschenberger V, Schambony A. ROR-family receptor tyrosine kinases. *Curr Top Dev Biol.* 2017;123:105–42.
 22. Al-Shawi R, Ashton S V, Underwood C, Simons JP. Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development. *Dev Genes Evol.* 2001;211(4).
 23. Green JL, Kuntz SG, Sternberg PW. Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol.* 2008;18(11):536–44.
 24. DaneshManesh AH, Mikaelsson E, Jeddi-Tehrani M, Bayat AA, Ghods R, Ostadkarampour M, et al. Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy. *Int J cancer.* 2008;123(5):1190–5.
 25. Choi MY, Widhopf II GF, Wu CCN, Cui B, Lao F, Sadarangani A, et al. Pre-clinical specificity and safety of UC-961, a first-in-class monoclonal antibody targeting ROR1. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015;15:S167–9.
 26. Janovska P, Poppova L, Plevova K, Plesingerova H, Behal M, Kaucka M, et al. Autocrine Signaling by Wnt-5a Deregulates Chemotaxis of Leukemic Cells and Predicts Clinical Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015/08/03. 2016 Jan 15;22(2):459–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26240275>
 27. Menck K, Heinrichs S, Baden C, Bleckmann A. The WNT/ROR pathway in cancer: from signaling to therapeutic intervention. *Cells.* 2021;10(1):142.
 28. Ghia EM, Rassenti LZ, Choi MY, Quijada-Álamo M, Chu E, Widhopf GF, et al. High

- expression level of ROR1 and ROR1-signaling associates with venetoclax resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2022;1–10.
29. Bicocca VT, Chang BH, Masouleh BK, Muschen M, Loriaux MM, Druker BJ, et al. Crosstalk between ROR1 and the Pre-B cell receptor promotes survival of t (1; 19) acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2012;22(5):656–67.
 30. Daneshmanesh AH, Hojjat-Farsangi M, Moshfegh A, Khan AS, Mikaelsson E, Österborg A, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway is involved in direct apoptosis of CLL cells induced by ROR1 monoclonal antibodies. *Br J Haematol*. 2015;169(3):455–8.
 31. Neal CL, Xu J, Li P, Mori S, Yang J, Neal NN, et al. Overexpression of 14-3-3 ζ in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit. *Oncogene*. 2012;31(7):897–906.
 32. Zhang S, Chen L, Cui B, Chuang H-Y, Yu J, Wang-Rodriguez J, et al. ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth. *PLoS One*. 2012;7(3):e31127.
 33. Gentile A, Lazzari L, Benvenuti S, Trusolino L, Comoglio PM. The ROR1 pseudokinase diversifies signaling outputs in MET-addicted cancer cells. *Int J Cancer*. 2014;135(10):2305–16.
 34. Hojjat-Farsangi M, Moshfegh A, Daneshmanesh AH, Khan AS, Mikaelsson E, Österborg A, et al. The receptor tyrosine kinase ROR1—an oncofetal antigen for targeted cancer therapy. In: *Seminars in cancer biology*. Elsevier; 2014. p. 21–31.
 35. Baskar S, Kwong KY, Hofer T, Levy JM, Kennedy MG, Lee E, et al. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2008;14(2):396–404.
 36. Cui B, Ghia EM, Chen L, Rassenti LZ, DeBoever C, Widhopf GF, et al. High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, J Am Soc Hematol*. 2016;128(25):2931–40.

37. Zhou J-K, Zheng Y-Z, Liu X-S, Gou Q, Ma R, Guo C-L, et al. ROR1 expression as a biomarker for predicting prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(20):32864.
38. Daneshmanesh AH, Porwit A, Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Tamm KP, Grandér D, et al. Orphan receptor tyrosine kinases ROR1 and ROR2 in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(4):843–50.
39. Granger D, Gohil S, Barbarulo A, Baccaro A, Muczynski V, Chester K, et al. NVG-111, a novel ROR1xCD3 bispecific antibody for non-Hodgkin lymphoma. Wolters Kluwer Health; 2021.
40. Ghaderi A, Daneshmanesh AH, Moshfegh A, Kokhaei P, Vågberg J, Schultz J, et al. ROR1 is expressed in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and a small molecule inhibitor of ROR1 (KAN0441571C) induced apoptosis of lymphoma cells. *Biomedicines*. 2020;8(6):170.
41. Hojjat-Farsangi M, Daneshmanesh AH, Khan AS, Shetye J, Mozaffari F, Kharaziha P, et al. First-in-class oral small molecule inhibitor of the tyrosine kinase ROR1 (KAN0439834) induced significant apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2018;32(10):2291–5.
42. Liu X, Pu W, He H, Fan X, Zheng Y, Zhou J-K, et al. Novel ROR1 inhibitor ARI-1 suppresses the development of non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2019;458:76–85.
43. Daneshmanesh AH, Hojjat-Farsangi M, Ghaderi A, Moshfegh A, Hansson L, Schultz J, et al. A receptor tyrosine kinase ROR1 inhibitor (KAN0439834) induced significant apoptosis of pancreatic cells which was enhanced by erlotinib and ibrutinib. *PLoS One*. 2018;13(6):e0198038.
44. Fultang N, Illendula A, Chen B, Wu C, Jonnalagadda S, Baird N, et al. Strictinin, a novel ROR1-inhibitor, represses triple negative breast cancer survival and migration via modulation of PI3K/AKT/GSK3 β activity. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217789.
45. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal

- antibody therapeutics. *Nat Rev drug Discov*. 2010;9(10):767–74.
46. Mian YA, Widhopf II GF, Vo T-T, Jessen K, Rassenti LZ, Kipps TJ. Development of cirmtuzumab antibody-drug conjugates (ADCs) targeting receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1). *Blood*. 2018;132:1862.
 47. Choi MY, Widhopf II GF, Ghia EM, Kidwell RL, Hasan MK, Yu J, et al. Phase I trial: cirmtuzumab inhibits ROR1 signaling and stemness signatures in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cell Stem Cell*. 2018;22(6):951–9.
 48. Zhang S, Zhang H, Ghia EM, Huang J, Wu L, Zhang J, et al. Inhibition of chemotherapy resistant breast cancer stem cells by a ROR1 specific antibody. *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116(4):1370–7.
 49. O'Donovan K, Bhatt S, Baccaro A, Fernando D, Smith A, Gbajumo E, et al. The use of a transient transfected expression system to deliver high quality bispecific T-cell engager drug product, NVG-111, to the clinic for a fraction of the cost and time associated with the development and use of a producer cell line. *American Society of Clinical Oncology*; 2022.
 50. Gohil SH, Paredes-Moscosso SR, Harrasser M, Vezzalini M, Scarpa A, Morris E, et al. An ROR1 bi-specific T-cell engager provides effective targeting and cytotoxicity against a range of solid tumors. *Oncoimmunology*. 2017;6(7):e1326437.
 51. Schiavone G, Epistolio S, Martin V, Molinari F, Barizzi J, Mazzucchelli L, et al. Functional and clinical significance of ROR1 in lung adenocarcinoma. *BMC Cancer*. 2020;20(1):1–7.
 52. Yoda A, Oishi I, Minami Y. Expression and function of the Ror-family receptor tyrosine kinases during development: Lessons from genetic analyses of nematodes, mice, and humans. *J Recept signal Transduct*. 2003;23(1):1–15.
 53. Clinical Trials / NCT02222688 [Internet]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02222688>

EK 2: KLONLANAN ROR1 NÜKLEOTİD VE AMİNO ASİT DİZİLERİ

ROR1 S (165-391. aminoasitler):

EEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDE
TSSVPKPRDLRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMLMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKN
HKCYNSTGVDRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKS
DLCDIPAC

ROR1 S (165-391. aminoasitleri kodlayan nükleotid dizisi):

GAAGAAGATGGATTCTGTCAGCCATACAGAGGGATTGCATGTGCAAGATTTATTGGCAACCGCACCCTCTATA
TGGAGTCTTTGCACATGCAAGGGGAAATAGAAAATCAGATCACAGCTGCCTTCACTATGATTGGCACTTCCAG
TCACTTATCTGATAAGTGTCTCAGTTCGCCATTCCCTCCCTGTGCCACTATGCCTTCCCGTACTGCGATGAA
ACTTCATCCGTCCCAAAGCCCCGTGACTTGTGTGCGGATGAATGTGAAATCCTGGAGAATGTCTGTGTCAA
CAGAGTACATTTTTGCAAGATCAAATCCCATGATTCTGATGAGGCTGAAACTGCCAAACTGTGAAGATCTCCC
CCAGCCAGAGAGCCAGAAGCTGCGAACTGTATCCGGATTGGAATTCCCATGGCAGATCCTATAAATAAAAAAT
CACAAGTGTATAACAGCACAGGTGTGGACTACCGGGGACCGTCAGTGTGACCAAATCAGGGCGCCAGTGCC
AGCCATGGAATTCCAGTATCCCCACACACACACTTTCACCGCCCTTCGTTTCCCAGAGCTGAATGGAGGCCA
TTCTACTGCCGCAACCCAGGGAATCAAAGGAAGCTCCCTGGTGCTTACCTTGGATGAAAACTTTAAGTCT
GATCTGTGTGACATCCCAGCGTGC

ROR1 L (42-391. aminoasitler):

PTSSWNISSELNKDSYLTLDPEMNNITTSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGS
RLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEDGFCQPYRGIACARFIGNRTV
YMESLHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLRDECEILENVLC
QTEYIFARSNPMLMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHCYNSTGVDRGTVSVTKSGRQ
CQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFKSDLCDIPAC

ROR1 L (42-391. aminoasitleri kodlayan nükleotid dizisi):

CCTACCTCATCATGGAACATCTCAAGTGAAGTCAACAAAGATTCTTACCTGACCCTCGATGAACCAATGAATA
ACATCACCACGTCTCTGGGCCAGACAGCAGAACTGCACTGCAAAGTCTCTGGGAATCCACCTCCCACCATCCG
CTGGTTCAAAAATGATGCTCCTGTGGTCCAGGAGCCCCGAGGCTCTCCTTTCCGGTCCACCATCTATGGCTCT
CGGCTGCGGATTAGAAACCTCGACACCACAGACACAGGCTACTTCCAGTGCCTGGCAACAAACGGCAAGGAGG
TGTTTTCTTCCACTGGAGTCTTGTGTGCAAGTTTGGCCCCCTCCCACTGCAAGTCCAGGATACTCAGATGA
GTATGAAGAAGATGGATTCTGTCAGCCATACAGAGGGATTGCATGTGCAAGATTTATTGGCAACCGCACCCTC
TATATGGAGTCTTTGCACATGCAAGGGGAAATAGAAAATCAGATCACAGCTGCCTTCACTATGATTGGCACTT
CCAGTCACTTATCTGATAAGTGTCTCAGTTCGCCATTCCCTCCCTGTGCCACTATGCCTTCCCGTACTGCGA
TGAAACTTCATCCGTCCCAAAGCCCCGTGACTTGTGTGCGGATGAATGTGAAATCCTGGAGAATGTCTGTGT
CAAACAGAGTACATTTTTGCAAGATCAAATCCCATGATTCTGATGAGGCTGAAACTGCCAAACTGTGAAGATC
TCCCCAGCCAGAGAGCCAGAAGCTGCGAACTGTATCCGGATTGGAATTCCCATGGCAGATCCTATAAATAA
AAATCACAAGTGTATAACAGCACAGGTGTGGACTACCGGGGACCGTCAGTGTGACCAAATCAGGGCGCCAG
TGCCAGCCATGGAATTCCAGTATCCCCACACACACACTTTCACCGCCCTTCGTTTCCCAGAGCTGAATGGAG
GCCATTCTACTGCCGCAACCCAGGGAATCAAAGGAAGCTCCCTGGTGCTTACCTTGGATGAAAACTTTAA
GTCTGATCTGTGTGACATCCCAGCGTGC

EK 3: DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARININ HEDEF RORIS NÜKLEOTİD DİZİSİ İLE ÇOKLU HİZALANMASI

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment

```

1_T7R_reverse_complement ----- 70
RORIS_ ----- 70
1_T7F GCGTTAGACGGAGCATTACACTCTAGAATGATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATACATATGCACCA 70

1_T7R_reverse_complement -----GTAAGAAAAGAAACCGTGCTCTCAA--TT 140
RORIS_ ----- 140
1_T7F TCATCATCATCATTCTGCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTC 140

1_T7R_reverse_complement GGACGGCAGCAGGTGG--CCTCCTAATTCGGTGAGGAGACGGCGAGAATGCCATTGTATTATCTGGG 210
RORIS_ ----- 210
1_T7F GAACGCCAGCACATGGACAGCCCAGATCTGGGTACCACGACAACGACTAGGCCA--TGGGATATCTGTG 210

1_T7R_reverse_complement ATCACATAAGGAGGAAGAAGGATTTGTCAGCCATAACAGGAGGATTGCATGGGCAAGA-TTATTGCCA 280
RORIS_ -----GAAGAAGATGGATTCTGTCAGCCATA--CAGAGGATTGCATGTGAAGATTATTGGCA 280
1_T7F GATCCATATGGAAGAAGATGGATTCTGTCAGCCATA--CTGAGGATTGCATGTGAAGATTATTGGCA 280
          ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** **

1_T7R_reverse_complement ACCGCACTCTC-ATATGGAGTCTCTGCGTCATGCAAGGGGAAATAGAAAATCAGATCACAGCTGCCCTCA 350
RORIS_ ACCGCACCGTCTATATGGAGTCTTTGCA-CATGCAAGGGGAAATAGAAAATCAGATCACAGCTGCCCTCA 350
1_T7F ACCGCACCGTCTATATGGAGTCTTTGCA-CATGCAAGGGGAAATAGAAAATCAGATCACAGCTGCCCTCA 350
          ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

1_T7R_reverse_complement CTATGATTGGCACTGCCAGTCACTTTCTGATAAGTGTCTCAGTTCG-CGATCTTCCCTGTGCCATT 420
RORIS_ CTATGATTGGCACTGCCAGTCACTTATCTGATAAGTGTCTCAGTTCGCCATTCTTCCCTGTGCCACTA 420
1_T7F CTATGATTGGCACTGCCAGTCACTTATCTGATAAGTGTCTCAGTTCGCCATTCTTCCCTGTGCCACTA 420
          ***** ***** ***** ***** ***** * ** ***** **

1_T7R_reverse_complement TGCTTCCCTGTAGTGCATGAAACTTCTTGCCTCCAAGAGCCCCGTGACTTGAGTAGCGATGAATGTG 490
RORIS_ TGCTTCCC-GTACTGCGATGAAACTTCATCCGTCCTCAA-AGCCCCGTGACTTGCTGCGCGATGAATGTG 490
1_T7F TGCTTCCC-GTACTGCGATGAAACTTCATCCGTCCTCAA-AGCCCCGTGACTTGCTGCGCGATGAATGTG 490
          ** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

1_T7R_reverse_complement GAATCCTGGAGAATTTCTGTGTCAAACAGAGTACATTTTGAAGATCAAATCCCATGATTGTGATGA 560
RORIS_ AAATCCTGGAGAA-TGTCCTGTGTCAAACAGAGTACATTTTGAAGATCAAATCCCATGATTCTGATGA 560
1_T7F GAATCCTGGAGAA-TGTCCTGTGTCAAACAGAGTACATTTTGAAGATCAAATCCCATGATTCTGATGA 560
          ***** * ***** ***** ***** ***** ***** *****

1_T7R_reverse_complement GGCTGAAACTGCCAAACTGTGAAGATCTCCCCAGCAGAGAGCCAGAACTGCGAACTGTATCCGGA 630
RORIS_ GGCTGAAACTGCCAAACTGTGAAGATCTCCCCAGC-CAGAGAGCCAGAACTGCGAACTGTATCCGGA 630
1_T7F GGCTGAAACTGCCAAACTGTGAAATCTCCCCAGC-CAGAGAGCCAGAACTGCGAACTGTATCCGGA 630
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

1_T7R_reverse_complement -TGGAATCCCATGGCAGATCCTATAAATAAAAATCACAAGTGTATAACAGCACAGGTGTGGACTACCG 700
RORIS_ TTGGAATCCCATGGCAGATCCTATAAATAAAAATCACAAGTGTATAACAGCACAGGTGTGGACTACCG 700
1_T7F TTGGAATCCCATGGCAGATCCTATAAATAAAAATCACAAGTGTATAACAGCACAGGTGTGGACTACCG 700
          ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

1_T7R_reverse_complement	GGGGACCGTCAGTGTGACCAAAATCAGGGGCCAGTGCCAGCCATGGAATCCCAGTATCCCCACACACAC	770
ROR1S_	GGGGACCGTCAGTGTGACCAAAATCAGGGGCCAGTGCCAGCCATGGAATCCCAGTATCCCCACACACAC	770
1_T7F	GGGGACCGTCAGTGTGACCAAAATCAGGGGCCAGTGCCAGCCATGGAATCCCAGTATCCCCACACACAC	770

1_T7R_reverse_complement	ACTTTCACCGCCCTTCGTTTCCCAGAGCTGAATGGAGGCCATTCCTACTGCCGAACCC-AGGGAATCAA	840
ROR1S_	ACTTTCACCGCCCTTCGTTTCCCAGAGCTGAATGGAGGCCATTCCTACTGCCGAACCC-AGGGAATCAA	840
1_T7F	ACTTTCACCGCCCTTCGTTTCCCAGAGCTGAATGGAGGCCATTCCTACTGCCGAACCCAAGGAAATCAA	840
	***** ** *	
1_T7R_reverse_complement	AAGGAAGCTCCCTGGTGTTCACC-TGGATGAATACTTTAAGTTTGATCTGTGTGACAT-CCTGCGTGCA	910
ROR1S_	AAGGAAGCTCCCTGGTGTTCACCTTGGATGAAAACTTAAGTCTGATCTGTGTGACATCCAGCGTGC-	910
1_T7F	AAGGAAGCTCCCTGGTGTTCACCTTGGATGAATACCTTAAGTCTGATCTGTGTGACAT-CCAGCGTGCA	910
	***** ** *	
1_T7R_reverse_complement	GTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACC-TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCC	980
ROR1S_	-----	980
1_T7F	GTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTTAAATCCGGCTGCTAACAAAGCC	980
1_T7R_reverse_complement	CG-----	1050
ROR1S_	-----	1050
1_T7F	CGAAAGGAAGCTGAATTGGCTGCTGCCCCCTCAACAATAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAACCAT	1050
1_T7R_reverse_complement	-----ATTATGAATTCATTATTTCTCT-----	1120
ROR1S_	-----	1120
1_T7F	TTTGGGGGGAATAAAAGATCTATTATCGATTCTTCTTTCCCCGAAAAGGAAACGTAACCCGC GAAACT	1120
1_T7R_reverse_complement	-----	1190
ROR1S_	-----	1190
1_T7F	TCCGGCCCCCAAAGGGCGTTGGTTGGCCCCCTTTTTTCCCCGACATTCGCCGGAGTGGGGAGAA	1190
1_T7R_reverse_complement	-----	1260
ROR1S_	-----	1260
1_T7F	AAAACGGCGCCCCCCCCCTTTCCGCGCCCTCAAAGACCCCTGTTTTTGCCTGTGGGTACGGGG	1260
1_T7R_reverse_complement	-----	1330
ROR1S_	-----	1330
1_T7F	AGGAGTGGCCCCGCAGTT	1330
1_T7R_reverse_complement	-----	1400
ROR1S_	-----	1400
1_T7F	GTTTTCTTTTTTTGGAGGAAGTGTCTATATAAAGCGTCGAAAAATTCATAGCCGGTTTTTTTT	1400
1_T7R_reverse_complement	-----	1437
ROR1S_	-----	1437
1_T7F	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGGAAGTGA	1437

EK 4: DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARININ HEDEF ROR1L NÜKLEOTİD DİZİSİ İLE ÇOKLU HİZALANMASI

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment

```

2_T7R_reverse_complement ----- 70
ROR1L ----- 70
2_T7F GTTTTGAACGGGAAAAATTACCCATCTAGAATGATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGC 70

2_T7R_reverse_complement -CATTTCATC-----TTGCGTTGTGCAGCGACGTTGGTGAATAATACCTAGTGA 140
ROR1L ----- 140
2_T7F ACCATCATCATCAGCATTCTGCTGGTCTGGTGCCGCGGTTCTGGTATGAAGAAACCGCTGCTGCTAA 140

2_T7R_reverse_complement AAAATCAAACACAAAAATGACAACCAA--TTTGGTACCGAGGAGGA-GGCAAGGTCATGCGAT-TTTT 210
ROR1L ----- 210
2_T7F ATTCTAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGACGACAACAACTAGGCCATGGGATATCTG 210

2_T7R_reverse_complement TGGATCCCTTGGCCTACCTCATTTCATGGAGCATCTCAAGTGAATCAACAAAGATTTTACCTGACCCCT 280
ROR1L -----CCTACCTCA-TCATGGAACATCTCAAGTGAAGTCAACAAAGATTCTTACCTGACCCCT 280
2_T7F TGGATCCCTATGCCTACCGCA-TCATGGAACATCTCTTGTGAAGTCAACAAAGATTCTTACCTGACCCCT 280
***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

2_T7R_reverse_complement GATGAA-CAATG-ATAACATCATCAAGTCTCTGGG-CGGACAGCAGAAATGCATTGCAAAGTCTCTGGGA 350
ROR1L GATGAACCAATGAATAACATCACCACGTCTCTGGGCCAGACAGCAGAACTGCACTGCAAAGTCTCTGGGA 350
2_T7F GATGAACCAATGAATAACATCACCACGTCTCTGGGCCAGACAGCAGATAACTGCACTGCAAAGTCTCTGGGA 350
***** ***** ***** ** ***** * ***** * ***** *****

2_T7R_reverse_complement ATCCACCTCCCACCATCCGCTGGTTCAAAAATGATGCTCTGTGGTCCAGGAGCCCCAGAGGCTTTCCTT 420
ROR1L ATCCACCTCCCACCATCCGCTGGTTCAAAAATGATGCTCTGTGGTCCAGGAGCCCCAGAGGCTTTCCTT 420
2_T7F ATCCACCTCCCACCATCCGCTGGTTCAAAAATGATGCTCTGTGGTCCAGGAGCCCCAAAGGCTTTCCTT 420
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

2_T7R_reverse_complement TCGGTCCACCATCTATGGCTCTGGCTGCGGATTAGAAACCTCGACACCACAGACACAGGCTACTTCCAG 490
ROR1L TCGGTCCACCATCTATGGCTCTGGCTGCGGATTAGAAACCTCGACACCACAGACACAGGCTACTTCCAG 490
2_T7F TCGGTCCACCATCTATGGCTCTGGCTGCGGATTAGAAACCTCGAAACCACAAACACAGGCTACTTCCAG 490
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

2_T7R_reverse_complement TCGGTGGCAACAAACGGCAAGGAGGTGGTTTCTTCCACTGGAGTCTTGTGTCAGTTTGGCCCCCTC 560
ROR1L TCGGTGGCAACAAACGGCAAGGAGGTGGTTTCTTCCACTGGAGTCTTGTGTCAGTTTGGCCCCCTC 560
2_T7F TCGGTGGCAACAAACGGCGAGGAGGTGGTTTCTTCCACTGGAGTCTTGTGTCAGTTTGGCCCCCTC 560
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

2_T7R_reverse_complement CCACTGCAAGTCCAGGATACTCAGATGAGTATGAAGAAGATGGATTCTGTGACCCATACAGAGGGATTGC 630
ROR1L CCACTGCAAGTCCAGGATACTCAGATGAGTATGAAGAAGATGGATTCTGTGACCCATACAGAGGGATTGC 630
2_T7F CCACTGCAAGTCTGGATACCAAGATGAGTATGAAGAAGATGGATTCTGTGACCCATACAGAGGGATTGC 630
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

```

2_T7R_reverse_complement  ATGTGCAAGATTTATTGGCAACCGCACCGTCTATATGGAGTCTTTGCACATGCAAGGGGAAATAGAAAAT 700
ROR1L                      ATGTGCAAGATTTATTGGCAACCGCACCGTCTATATGGAGTCTTTGCACATGCAAGGGGAAATAGAAAAT 700
2_T7F                      ATGTGCAAGATTTATTGGCAACCGCACCGTCTATATGGAGTCTTTGCACATGCAAGGGGAAATAGAAAAT 700
*****

2_T7R_reverse_complement  CAGATCACAGCTGCCCTTCACTATGATTGGCACTTCCAGTCACTTATCTGATAAGTGTTCAGTTCGCCA 770
ROR1L                      CAGATCACAGCTGCCCTTCACTATGATTGGCACTTCCAGTCACTTATCTGATAAGTGTTCAGTTCGCCA 770
2_T7F                      CAGATCACAGCTGCCCTTCACTATGATTGGCACTTCCAGTCACTTATCTGATAAGTGTTCAGTTCGCCA 770
*****

2_T7R_reverse_complement  TTCCTTCCCTGTGCCACTATGTTTTCCGTA CTGCGATGAAAATCTTCGGTCCCAAGCCCCGTGACAT 840
ROR1L                      TTCCTTCCCTGTGCCACTATGTTTTCCGTA CTGCGATGAAAATCTTCGGTCCCAAGCCCCGTGACTT 840
2_T7F                      TTCCTTCCCTGTGCCACTATGTTTTCCGTA CTGCGATGAAAATCTTCGGTCCCAAGCCCCGTGACTT 840
***** ** ***** **

2_T7R_reverse_complement  GTGTAGTGAGGAATGCGAAATCGGGGAGAATGTCCTGTGTCAAACAGAGTACATTTTTGCAAGATCAAA 910
ROR1L                      GTGTAGTGAGGAATGCGAAATCGGGGAGAATGTCCTGTGTCAAACAGAGTACATTTTTGCAAGATCAAA 910
2_T7F                      GTGTAGTGAGGAATGCGAAATCGGGGAGAATGTCCTGTGTCAAACAGAGTACATTTTTGCAAGATCAAA 910
**** * ** ***** *****

2_T7R_reverse_complement  CCCATGATTCTGATGAGGCTGAAACTGCCAAATTGTGAAGATGTCCCCAGCCAGAGAGCCCGGAAGATG 980
ROR1L                      CCCATGATTCTGATGAGGCTGAAACTGCCAAATTGTGAAGATGTCCCCAGCCAGAGAGCCCGGAAGATG 980
2_T7F                      CCCATGATTCTGATGAGGCTGAAACTGCCAAATTGTGAAGATGTCCCCAGCCAGAGAGCCCGGAAGATG 980
***** *****

2_T7R_reverse_complement  AGAACCGTATCCGGATTGGAATCCCATGACAGATCTATAATAAAAAATCACAGTCTTATAACAGCAC 1050
ROR1L                      CGAACTGTATCCGGATTGGAATCCCATGACAGATCTATAATAAAAAATCACAGTCTTATAACAGCAC 1050
2_T7F                      CAAACTGTATCCGGATTGGAATCCCATGACAGATCTAT-AATAAAAAATCACAGT- TTATAACAGCAC 1050
*** ***** * ***** *

2_T7R_reverse_complement  AGGTGTGGACTACCGGGGACCGTCACTGTGACCAATCAGGGGCCAGTGCCAGCCATGGAATCCCGAG 1120
ROR1L                      AGGTGTGGACTACCGGGGACCGTCACTGTGACCAATCAGGGGCCAGTGCCAGCCATGGAATCCCGAG 1120
2_T7F                      AGGTGTGGACAACCGGGGACCGTCACTGTGACCAATCAGGGGCCATTG-CACCCCTGGAATCCCGAT 1120
***** ***** ** **

2_T7R_reverse_complement  TATCCCCACACACACATTTACC GCCCTTCGTTCC TAGAGCTGAATGGAGGCCATTCCTACTGCCGCA 1190
ROR1L                      TATCCCCACACACACATTTACC GCCCTTCGTTCC TAGAGCTGAATGGAGGCCATTCCTACTGCCGCA 1190
2_T7F                      TAT-CCCAC-CACCAAC TTTACC GCCCTTCGTTCC AAGCTAAA-GGAAGCCATTCCTAC-GCCCCA 1190
*** ***** * ***** *

2_T7R_reverse_complement  ACCCAGGGAATCAAAGGAAGCTCCCTGGTGC TTCACCTGGATGAAAAC TTAAGTATGATCTGTGTGA 1260
ROR1L                      ACCCAGGGAATCAAAGGAAGCTCCCTGGTGC TTCACCTGGATGAAAAC TTAAGTATGATCTGTGTGA 1260
2_T7F                      ACCC--GGAATCAAACG--AACCTCCCGGGGTTTC-CCCTGGAGAAATTTTTTTTTATTTTTTTGTTT-- 1260
**** ***** * * * ** * ** * ** * ** * ** * ** * * * *

2_T7R_reverse_complement  CATCCCAGCGTGCAGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCATTGAGATCCGGCT 1330
ROR1L                      CATCCCAGCGTGC----- 1330
2_T7F                      --TCCTTGTGTTG-----TTAAAAATTTGGCCCACTCAAACCCCCCGACACTTTAAT-----TCT 1330
*** * **

2_T7R_reverse_complement  GCTAACAAAGCCCCGAAAGAGCTAGGTCCT 1359
ROR1L                      ----- 1359
2_T7F                      TCTTTAAAAACCCCAAAGA----- 1359

```

EK 5: PEPTİD DİZİSİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER

ROR1 S (165-391. aminoasitler) mutasyonları: (F206L, I224V,N380Y)

EEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYME^LSLHMQGEIENQITAA^FTMIGTSSH
LSDKCSQFAI^VPSLCHYAFPYCDE^VTSSVPKPRDL^VCRDECEILENVLCQTEYI
FARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIGIPMADPINKNHKCYN
SSTGV^VDYRGT^VSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYC
RNPGNQKEAPWCFTLDEN^NFKSDLCDI^IPAC
(Fenilalanin205L ösin) (Izolösin223Valin) (Asparajin379Tirozin)

ROR1 L (42-391. aminoasitler) mutasyonları: (R104P, A305T, C314S, S383Y)

PTSSWNISSELNKDSYLT^LLDEPMNIT^LSLGQTAELHCKVSGNPPPTIRW
FKNDAPVVQEP^RRRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQC^PVATNGKEVVS
STGVLFVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYME^S
LHMQGEIENQITAAFTMIGTSSHLSDKCSQFAIPSLCHYAFPYCDE^TTSSVP
KPRDL^VCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMILMRLKLPNCEDLPQPESPEA
ANCIRIGIPMA^ADPINKNHK^CCYNSTGV^VDYRGT^VSVTKSGRQCQPWNSQYP
HTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTLDENFK^SSDLCDI^YPAC
(Arjinin103Prolin) (Alalin304Treonin) (Sistein313Serin)(Serin382Tirozin)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Merve Samur

Eğitim Bilgileri

Lise: Gölcük İhsaniye Anadolu Lisesi [2009 – 2012]

Lisans: Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (%100 İngilizce) [2013 – 2018]

Bildiriler

- IMASCON 2022 Uluslararası Marmara Fen Bilimleri Kongresi, Rekombinant HER3 Antijeninin Üretimi
[Kocaeli, Türkiye (Sözlü Sunum), 13/05/2022 – 14/05/2022]
Arzu Atalay, Ahmet Kaan Dikici, Merve Samur, Rümeysa Doğan



REKOMBİNANT HER3 ANTİJENİNİN ÜRETİLMESİ

Arzu Atalay

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji
aatalay@ankara.edu.tr, ORCID: 0000-0003-1309-5291

Ahmet Kaan Dikici

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji
a.kaandikici@gmail.com, ORCID: 0000-0003-3795-3684

Merve Samur

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji
mervesamur0@gmail.com, ORCID: 0000-0002-7495-6852

Rümeysa Doğan

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji
rmysdogan@ankara.edu.tr, ORCID: 0000-0002-6107-9870

Özet

HER3, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör ailesinin dört üyesinden biridir. HER1, HER2, HER3 ve HER4'ü içeren bu reseptör tirozin kinaz ailesi, birçok kanser türü için terapötik bir hedeftir. HER3'ün meme, akciğer, kolon ve pankreas gibi çeşitli insan kanserlerinde aşırı ifadesi metastatik potansiyelin artmasına ve tümör gelişiminin desteklenmesine yol açarak tedavide başarısızlığın ana nedenini oluşturur. Son yıllarda yapılan birçok çalışma HER3'ün önemini göstermiş ve HER3'ü hedef alan tedavilerin geliştirilmesine yönelik çok sayıda preklirik ve klinik çalışmanın başlamasını sağlamıştır. Artan HER3 ifadesi, kanser tedavisi sırasında anti-EGFR/HER1 ve anti-HER2 terapötiklerine karşı dirence neden olur. Bu direncin üstesinden gelmek ve terapötik etkinliği artırmak için HER3 sinyal yolağı temel aşağı akış mediyatörlerinin etkili inhibisyonu gereklidir. Bu nedenle, daha fazla HER3 inhibitörü terapötik ajan geliştirme çalışmasına ihtiyaç vardır. Bu reseptörlere bağlanan monoklonal antikorlar geliştirilmiş olmasına ve bunları geliştirmeye yönelik çalışmalar halen devam etmesine rağmen, HER3'ü hedef alan bir monoklonal antikor henüz onaylanmamıştır. Anti-HER3 monoklonal antikor geliştirmeyi hedeflediğimizden, bu çalışmada ilk adım olarak rekombinant HER3 antijen olarak klonlanmış ve ifade edilmiştir. HER3 hücre dışı alanı, ligand bağlanmasının özgülüğünü belirleyen iki sistein açısından zengin bölge (II ve IV) ve iki yan bölge (I ve III) içeren dört alt alandan (I-IV) oluşur. *Escherichia coli*'de 6xHis taq füzyonlu rekombinant antijeni ifade edebilmek için 1869 nükleotidlik uzunluktaki HER3 hücre dışı alanı pET-30a(+) plazmitine klonlanmıştır. Klonlama için *E.coli* DH5a-TR1 bakteri suşu kullanılmıştır. Rekombinant 6xHis-HER3ECD protein *E. coli* BL21(DE3)'de ifade edilmiş ve IPTG indüksiyonunun ardından 6xHis antikoruna karşı immüno blotlamada beklenen 77 kDa bant gözlemlenmiştir. 6xHis-HER3ECD proteininin çözünürlük ve ifade optimizasyon çalışmaları devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3 (HER3), HER3-ECD, Antijen, pET-30 ifade sistemi



International Marmara Sciences Congress (Imascon Spring 2022)

13 – 14 May 2022 KOCAELI

PROCEEDINGS E-BOOK

Organizer



Sponsors

