

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**REKOMBİNANT YÖNTEMLERLE SENTETİK  
PARATHORMON ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zekiye DİŞÇİ**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ**

**OCAK 2017**

**BEZMİALEM VAKIF UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES**

**PRODUCTION OF SYNTHETIC PARATHORMONE  
BY RECOMBINANT METHODS**

**MASTER THESIS  
Zekiye DİŞÇİ**

**Department of Biotechnology  
Biotechnology Program**

**Thesis Supervisor: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ**

**JANUARY 2017**

## TEZ ONAY FORMU

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 140305111 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Zekiye DİŞÇİ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "Rekombinant Yöntemlerle Sentetik Parathormon Üretimi" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Fahri AKBAŞ .....

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. İlhan ONARAN .....

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Gözde YEŞİL .....

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Tez Teslim Tarihi : 09.11.2016

Savunma Tarihi : 20.01.2017

## ÖNSÖZ

Tezimin her aşamasında, çalışmamı yönlendiren, bilgi, tecrübelerini, emeğini ve yardımlarını esirgemeyerek öğrenmeye katkıda bulunan rehberliği, anlayış ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Fahri Akbaş'a;

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, eğitim dönemim içerisinde yer almaktan gurur duyduğum paratiroid ekibinin değerli hocası Prof. Dr. Erhan AYŞAN'a ve tezimin her aşamasında desteğini ve bilgisini benimle paylaşan arkadaşım Msc. Çilem Ercan'a;

Tezimin her aşamasında manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Tuğçe Aydoğan, Büşra Özdemir ve Nazlı Arlı'ya;

Çalışmam süresince sınırsız sevgi ve sabrıyla her zaman beni destekleyen ve yanımda olan, her konuda yön gösterip destek oldukları için ve her an varlıklarını, desteklerini hissettiğim canım annem ve kız kardeşlerime;

Hayatımın her aşamasında maddi, manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimimi en iyi şekilde tamamlamam için göstermiş olduğu çabadan, varlığından gurur duyduğum babam; Uzm. Eltr. Müh. Abdülkerim DİŞÇİ 'ye saygı ve sevgilerimi sunar tüm kalbimle teşekkür ederim.

Araştırmamızı destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesinin, Bilimsel Araştırma Birimine teşekkür ederim.

Aralık 2016

Zekiye DİŞÇİ

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Zekiye DIŞÇI

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖNSÖZ</b> .....	iv
<b>BEYAN</b> .....	v
<b>KISALTMALAR</b> .....	ix
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	xi
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	xii
<b>RESİM LİSTESİ</b> .....	xiii
<b>ÖZET</b> .....	xiv
<b>SUMMARY</b> .....	xvi
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Paratiroid Bezi .....	3
2.2. Paratiroid Bezi Fizyolojisi .....	4
2.3. PTH .....	5
2.4. PTH Fizyolojisi .....	5
2.5. PTH Salınımı ve Kontrolü.....	8
2.6. PTH Hedef Organ Etkileri.....	10
2.6.1. PTH ve kemik dokusu etkisi .....	11
2.6.2. PTH ve böbrek üzerine etkisi.....	12
2.6.3. PTH ve bağırsak üzerine etkisi .....	12
2.7. PTH Metabolizması.....	13
2.8. Parathormonun Diğer Etkileri .....	13
2.9. PTH İyonik Metabolizması .....	14
2.9.1. PTH ve Ca metabolizması .....	14
2.9.2. PTH ve Mg metabolizması .....	15
2.9.3. PTH ve D vitamini .....	15
2.10. Hipoparatiroidizm ve Etiyolojisi .....	16
2.10.1. Klinik bulgu; hipokalsemi .....	17
2.10.2. Hipokalseminin sistemler üzerine etkisi .....	17
2.10.3. Hipoparatiroidizm tedavisi .....	18
2.11. Rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretimi .....	18
2.12. Rekombinant PTH üretimi .....	19

<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	22
3.1. Gereç .....	22
3.1.1. Cihazlar.....	22
3.1.2. Ticari kitler .....	23
3.1.3. Kimyasallar.....	24
3.1.4. Enzimler.....	25
3.1.5. Primerler .....	26
3.1.6. Mikroorganizma.....	26
3.1.7. Vektör sistemi.....	26
3.1.8. DNA ve protein markerleri .....	29
3.1.9. Tampon ve solüsyonlar.....	29
3.2. Yöntem .....	33
3.2.1. PTH gen eldesi.....	33
3.2.2. Primer tasarlama .....	35
3.2.3. İzole edilen PTH geninin PZR ile çoğaltılması .....	35
3.2.4. Vektör dizaynı.....	36
3.2.5. Kompetent hücre hazırlama? .....	37
3.2.6. E. coli hücresine vektör transformasyonu.....	37
3.2.7. Dizi analizi.....	39
3.2.8. Restriksiyon kesimi .....	39
3.2.9. Restriksiyon ürünü.....	40
3.2.10. Sub-klonlama - pEGFP-N1 vektör .....	41
3.2.11. Klonlama.....	42
3.2.12. pEGFP-N1 vektörle GFP sekresyon sinyali ile klonlama .....	42
3.2.13. Transfeksiyon.....	43
3.2.14. Protein izolasyonu.....	44
3.2.15. SDS-PAGE .....	44
<b>4. BULGULAR</b> .....	46
4.1. RT-PZR yöntemi ile parathormon gen bölgesi eldesi .....	46
4.2. PZR ile çoğaltılan gen bölgesinin bulgusu .....	46
4.3. Vektör eldesi.....	47
4.3.1. Ligasyon bulgusu .....	47
4.3.2. Dizi analizi bulgusu .....	49
4.4. Pzr57R/T restriksiyon analizi.....	50
4.5. pEGFP-NI vektör ligasyonu ve klonlama bulgusu.....	51

4.6. Plazmid eldesi.....	51
4.7. pEGFP-N1 vektörü.....	52
4.8. GFP sinyali veren pEGFP-N1+PTH vektörü .....	53
4.9. Rekombinant PTH üretimi .....	54
4.10. Transfeksiyon ölçümü .....	54
4.11. Protein konsantrasyon ölçümü .....	54
4.12. SDS-PAGE analiz bulgusu.....	56
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>57</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>





## KISALTMALAR

<b>aa</b>	: Amino Asit
<b>BMD</b>	: Kemik Mineral Yoğunluğu (Bone Mineral Density)
<b>bp</b>	: Baz Çifti (base pair)
<b>°C</b>	: Santigrat
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CaCl</b>	: Kalsiyum Klorür
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
<b>CaSR</b>	: Kalsiyum Algılama Reseptörü
<b>CRF</b>	: Kronik Böbrek Yetersizliği (Chronic Renal Failure)
<b>dk</b>	: Dakika
<b>dl</b>	: Desilitre
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b><i>E. coli</i></b>	: <i>Escherichia coli</i> bakterisi
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Adm.)
<b>g</b>	: Gram
<b>H<sup>+</sup></b>	: Hidrojen
<b>HCl</b>	: Hidro Klorik Asit
<b>iPTH</b>	: İntakt Parat Hormon
<b>K<sup>+</sup></b>	: Potasyum
<b>l</b>	: Litre
<b>LB</b>	: Sıvı veya katı hücre besiyeri (Luria Bertani)
<b>M</b>	: Molar
<b>mg</b>	: Mili gram
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	: Magnezyum
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum
<b>P</b>	: Fosfor
<b>pEGFP-N1</b>	: Ökaryotik plazmid vektör
<b>pg</b>	: Pikogram

<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	: Fosfat
<b>PTH</b>	: Parat Hormon
<b>PTHrP</b>	: Parathormon Reseptörü
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RANK-L</b>	: Reseptör Aktivasyon Nükleer Faktör Ligand
<b>rhPTH</b>	: Rekombinant İnsan Parathormonu
<b>rpm</b>	: Dakikadaki Devir Sayısı
<b>SDS-PAGE</b>	: SodyumDodesilSülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>U.V.</b>	: Ultraviyole Işın
<b>VD<sub>3</sub>-1<math>\alpha</math>-hidroksilaz</b>	: 25-Hidroksi Vitamin D <sub>3</sub> 1-alfa Hidroksilaz
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b>1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub></b>	: 1,25-Hidroksi Kolekalsiferol Vitamin D (Kalsitriol)
<b>25 (OH) D</b>	: 25 Hidroksi Kolekalsiferol Vitamin D (Kalsifediol)

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1:</b> Kullanılan cihazların listesi.....	22
<b>Tablo 2:</b> Kullanılan ticari kit listesi.....	23
<b>Tablo 3:</b> Kullanılan kimyasallar listesi.....	24
<b>Tablo 4:</b> pTZR57R/T vektör-PTH geni için belirlenen primerlerin özellikleri .....	26
<b>Tablo 5:</b> pEGFP-N1 vektör- PTH geni için belirlenen primerlerin özellikleri .....	26
<b>Tablo 6:</b> PTZ57R/T vektör sisteminin özellikleri .....	27
<b>Tablo 7:</b> pEGFP-N1 vektör özellikleri.....	28
<b>Tablo 8:</b> Revers transkriptaz PZR adımları.....	34
<b>Tablo 9:</b> PZR’de kullanılan madde miktarları.....	35
<b>Tablo 10:</b> PZR İçin kullanılacak olan sıcaklık ve döngü bilgileri.....	36
<b>Tablo 11:</b> Ligasyon için kullanılan madde miktarları .....	36
<b>Tablo 12:</b> Restriksiyon kesim işlemi madde miktarları .....	40
<b>Tablo 13:</b> Vektör pEGFP-N1 restriksiyon kesim işlemi madde miktarları.....	41
<b>Tablo 14:</b> Vektör pEGFP-N1 defosforilasyon işlemi madde miktarları .....	41
<b>Tablo 15:</b> Vektör pEGFP-N1 ligasyon işlemi madde miktarları .....	42
<b>Tablo 16:</b> vektör pEGFP-N1 restriksiyon işlemi madde miktarları .....	43

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1: Paratiroid bezlerinin anatomik yerleşimi. ....	4
Şekil 2: Parathormon dizisi.....	6
Şekil 3: Parathormon salınımı .....	7
Şekil 4: PTH ve Ca <sup>+2</sup> kontrolü.....	8
Şekil 5: Parathormonun hedef organ etkileri .....	10
Şekil 6: PTH'nin kemik üzerindeki anabolik etkisinin mekanizması .....	11
Şekil 7: Ca <sup>+2</sup> regulasyonu.....	14
Şekil 8: Rekombinant yöntemle plazmid içerisine gen klonlanması.....	19
Şekil 9: pTZR57R/T vektör haritası .....	27
Şekil 10 : pEGFP-N1 vektör haritası .....	28
Şekil 11 : pTZ57R/T vektörüne PTH ligasyon sonucu .....	48
Şekil 12 : pEGFP-N1 vektörüne PTH gen bölgesi yerleştirilmiş vektör haritası .....	52
Şekil 13 : pEGFP-N1+PTH vektör haritası .....	53

## RESİM LİSTESİ

### Sayfa

<b>Resim 1: A:</b> 1 kb Gene Ruler-DNA Ladder <b>B:</b> 10 bp Benchmark protein ladder ...	29
<b>Resim 2:</b> PTH gen ürününün UV görüntüsü.....	47
<b>Resim 3:</b> pTZR57/R vektörü restriksiyon kesimi; .....	50
<b>Resim 4:</b> AGS ve HeLa hücre hattı morfolojik görüntüleri .....	55
<b>Resim 5:</b> GFP+PTH proteinin SDS-PAGE görüntüsü (36,3 kDa) .....	56



## REKOMBİNANT YÖNTEMLERLE SENTETİK PARATHORMON ÜRETİMİ

### ÖZET

Biyoteknoloji alanında üretilen ürünler içerisinde proteinler oldukça önem taşımaktadır. Rekombinant yöntemler kullanılarak sentetik olarak üretilen proteinler terapötik, endüstriyel ve bilimsel araştırma amaçlı üretimleri gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızdaki amaç, rekombinant teknoloji kullanılarak terapötik kullanımını amaçladığımız parathormonu üretmektir.

Parathormon (PTH) polipeptid yapısında 84 aminoasitlik (aa) tek bir zincir olarak paratiroid bezlerinden salgılanır. PTH'nin başlıca sorumluluğu, kemiklerden kalsiyum ( $Ca^{+2}$ ) Emilimi ile plazma  $Ca^{+2}$  değerlerini düzenlemektir. Böbrekler ve bağırsaktan  $Ca^{+2}$  Emilimi ve aynı zamanda fosfat ( $PO_4^{-3}$ ) atılımını sağlayarak,  $Ca^{+2}$ - $PO_4^{-3}$  metabolizmasındaki homeostaziyi sağlamakta önemli bir role sahiptir. D vitamininin aktif formunun üretimi üzerine olan etkisi ile kalsiyumun bağırsaklardan Emilimini kolaylaştırır. Hormonun az ya da çok salgılanması çeşitli sağlık sorunlarına neden olabilir. PTH'nin az salgılanmasıyla görülen en önemli endokrin rahatsızlık hipoparatiroidizm olarak adlandırılır. Çalışmamızda hipoparatiroidizme alternatif tedavi yöntemi olması planlanan sentetik PTH üretimi hedeflenmiştir. Bu çalışmada, hiperplazi dokudan alınan örnekten mesajcı ribo nükleik asit (mRNA) izolasyonu ve daha sonrasında komplementer deoksiribo nükleik asit (cDNA) eldesinin spesifik primerler ile DNA fragmentleri oluşturan, DNA polimeraz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmaları sonucunda PTH geni elde edilmiştir. Rekombinant PTH (rPTH) N-Terminal (1-84) kodlayan gen, PEGFP-N1(ökaryotik plazmid vektör) klonlama vektörüne sekresyon sinyalinin ardına yerleştirilip, moleküler klonlama teknikleri kullanılarak klonlanmıştır. Konak organizma olarak One Shot® Mach1™ T1<sup>R</sup> *Escherichia coli* kompetent suşu kullanılmıştır. Vektör içerisine aktarılan rPTH geni, hücre kültüründe HeLa (Henrietta Lacks, serviks kanseri) ve AGS (ATCC®CRL-1739™,

Gastrik Adenokarsinoma) hücre hatlarına transfeksiyon ajanı ile 24 sa., 37 santigrat (°C) ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ettüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 sa.lik kültür sıvısından aktivasyon ölçümü ile PTH seviyesi ölçülmüş ve ekspresyon düzeyi sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuç ile medikal alanda çalışmaları sürdürülen sentetik PTH'nin elde edilmesi ile geliştirilen N- terminal (1-84) formülasyonu hipoparatiroidi tedavisi için umut verici olabilmesi ve rekombinant ilaç üretimi alanında bilimsel çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hipoparatiroidi, Klonlama, Parathormon, Rekombinant, Rekombinant hormon.



# PRODUCTION OF SENTHETIC PARATHORMONE BY RECOMBINANT METHODS

## SUMMARY

Proteins have a great importance within the field of biotechnologically derived products. Synthetically produced proteins using recombinant methods are produced for therapeutic, industrial and scientific research purposes. The aim of our work is to produce parathormone, which we aim to use therapeutically using recombinant technology.

Parathormone (PTH) is secreted by the parathyroid glands as a single chain of 84 amino acids (aa) in the polypeptide structure. The primary responsibility of PTH is to regulate plasma calcium ( $\text{Ca}^{+2}$ ) levels by  $\text{Ca}^{+2}$  absorption from the bones. It has an important role in providing homeostasis in  $\text{Ca}^{+2}$ - $\text{PO}_4^{-3}$  metabolism by providing kidney and intestinal  $\text{Ca}^{+2}$  absorption as well as phosphate ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) excretion. Parathyroid hormone (PTH) promotes absorption of calcium from the bone in 2 ways. The rapid phase brings about a rise in serum calcium within minutes and appears to occur at the level of the osteoblasts and osteocytes and when PTH binds to receptors on these cells, the osteocytic membrane pumps calcium ions from the bone fluid into the extracellular fluid. The effect of vitamin D on the production of the active form facilitates absorption of calcium from the intestines. More or less secretion of the hormone can cause a variety of health problems. The most important endocrine discomfort associated with low secretion of PTH is called hypoparathyroidism. In our study, planned synthetic PTH production was targeted as an alternative treatment method of hypoparathyroidism.

In this study, the PTH gene was obtained as a result of isolation of messenger ribonucleic acid (mRNA) from the sample taken from the hyperplasia tissue and subsequent polymerase chain reaction (PCR) experiments using DNA polymerase enzyme, which generates DNA fragments with specific primers of complementary deoxyribose nucleic acid (cDNA). The gene encoding the recombinant PTH (rPTH) N-Terminal (1-84) was placed behind the secretion signal in the cloning vector of PEGFP-N1 (eukaryotic plasmid vector) and cloned using molecular cloning techniques. As a host organism One Shot® Mach1™ T1<sup>R</sup> Escherichia coli competent



strain was used. The rPTH gene introduced into the vector is introduced into the cell culture with HeLa (Henrietta Lacks, cervical cancer) and transfection agent on AGS (ATCC® CRL-1739™, Gastric Adenocarcinoma) cell lines for 24 h, 37 celsius (°C) left to incubate. After 24 hours, intact parathormone level in the culture fluid was measured with activation measurement and expression level was evaluated with sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis. The results acquired in this study and ongoing synthetic parathormone development studies in the medical scope for N-Terminal (1-84) PTH formulation, it was aimed to promise for hypothyroidism treatment and to contribute to scientific researches in the recombinant medicine production.

**Key words:** Hypoparathyroidism, Cloning, Parathormone, Recombinant, Recombinant Hormone

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Organizmanın gerekli fonksiyonel dengesini sağlamak ve muhafaza etmek için vücuttaki çeşitli fonksiyonların düzenlenebilmesi belirli bir endokrin sistemin dengesi ile gerçekleşebilmektedir. Bu sistemin düzenleyicileri ise hormonlardır. Hormonlar, vücuttaki organların ya da dokuların faaliyetlerini düzenlerler. Endokrin organlardan paratiroid bezi üst ve alt olmak üzere 2 çift bezden oluşur. Bezin yerleşimi embriyolojik olarak gelişimi ile yakından ilişkili olup tiroid bezinin arka tarafında, onun kapsülü içinde yerleşmiştir. Parankimasında bulunan esas hücreler paratiroid bezinin hormonu PTH salgırlar. Normal bir paratiroid bezi 5x3x1 milimetre (mm) boyutunda ve yaklaşık 40 miligram (mg) ağırlığındadır. Bu kadar küçük olmalarına rağmen salgıladıkları PTH ile kan  $Ca^{+2}$  düzeyinin normal sınırlar içinde tutulmasını sağlamaktadırlar.

Parathormon paratiroid bezinden sentezlenen 84 aa'lık bir polipeptittir. Kana sekrete edildikten sonra başlıca karaciğer ve böbreklerde 34-37 aa'lık bölgeden yıkıma uğrar ve hormonun asıl biyolojik aktivitesini sağlayan N-terminal fragmanlarına ayrılır. Paratiroid hormonun vücutta etki ettiği dokular arasında en önemlisi  $Ca^{+2}$  regülasyonunun sağlandığı kemik dokusudur. Parathormon kemik üzerinde anabolik (yapıcı) ve katabolik (yıkıcı) etki üzerinden dengeyi sağlar. Anabolik etkiyi kemik minerilizasyonunu osteoblast ve osteositler üzerinden artırarak gerçekleştirir. Kemikte, 1,25-hidroksi kolekalsiferol ( $1,25(OH)_2D_3$ ) ve kalsitonin varlığında hem osteoblastik hem de daha belirgin olarak osteoklastik aktiviteyi stimüle ederek kemikten kana  $Ca^{+2}$  geçişini artırarak, diğer bir etki mekanizması olan katabolik etki gösterir. Diğer bir hedef organ ise böbreklerdir. PTH böbrekteki parathormon reseptörleri (PTHr1) üzerine etki ederek böbrekten süzülen sıvıdan hücre dışı alana  $Ca^{+2}$  geri emilimini, böbrekten süzülen sıvıya fosforun (P) atılımını artırır. Kalsiyumun renal tubüler sıvıdan geri emilimini artırır ve aynı zamanda inorganik  $PO_4^{-3}$ , sodyum ( $Na^+$ ) ve potasyumun ( $K^+$ ) geri emilimini azaltır. Ayrıca PTH böbrekte D vitamini metabolizmasında önemli rolü olan  $1\alpha$ -hidroksilaz ( $VD3-1\alpha$ ) aktivitesini uyarır. Bu enzim D vitamininin 25 hidroksi kolekalsiferol ( $25(OH)D$ ) formunu aktif formu olan kalsitriole dönüştürülmesini artırır. Bir diğer etkisi ise D

vitamini sentezini stimüle ederek indirek yoldan bağırsaktan  $Ca^{+2}$  ve  $PO_4^{-3}$  emilimini artırmaktır.

Erişkinlerde insan vücudunda yaklaşık 1000 gram (g)  $Ca^{+2}$  bulunmaktadır. Vücutta bulunan kalsiyumun %99'u kemiklerde depolanmış şekilde bulunurken, %1'inden azı kemik dışında bulunmaktadır. Kemik dışı  $Ca^{+2}$  hücre içi ve hücre dışı alanda %45'i serbest iyonize halde bulunur. Fizyolojik fonksiyonları yerine getiren, aktif olan serbest (iyonize) formdur. Kan kalsiyumu PTH ve D vitamininin kemik, böbrek ve ince bağırsaklar üzerine etkisiyle, normal sınırlar içinde tutulur. Parathormon esas olarak negatif feedback  $Ca^{+2}$  mekanizmasıyla kontrol edilmekte, Kan serbest  $Ca^{+2}$  düzeyi düştüğünde paratiroid hücrelerindeki  $Ca^{+2}$  duyarlı reseptörlerin (CaR) aktivitesi azalır ve paratiroid bezlerinden PTH salgısı artar. Kan serbest  $Ca^{+2}$  düzeyi arttığında ise CaR aktivitesi artar ve paratiroid bezlerinden PTH salgısı azalır.

Parathormon seviyesinin düşmesi vücutta düşük  $Ca^{+2}$  seviyelerine ve yüksek P seviyelerine neden olur. Bu durum erken yakalandığında herhangi bir ciddi probleme neden olmayabilir ama yaşam boyu izleme ve tedavi gerektirir. Eksikliğin sebep olduğu hipoparatiroidizm rahatsızlığı günlük alınan  $Ca^{+2}$  ve D vitamini suplementi ile tedavi edilmektedir. Bu durum vücutta  $Ca^{+2}$  ve minerallerin uygun seviyelerini tekrar oluşturmaya yardımcı olmak üzere tasarlanmıştır. Fakat bu hastalığa çözüm değil sadece yetersiz  $Ca^{+2}$  değerini ve D vitamini öncülüğündeki absorpsiyonunun önüne geçip yan etkilerini azaltmaktır.

Rekombinant DNA teknolojisi, genetik rekombinasyon olaylarının yapay olarak gerçekleştirilmesi esasına dayanan ve ilerlemekte olan, endüstriyel seviyede protein üretiminin gerçekleştiği en önemli biyoteknolojik uygulamadır. Bu uygulamalar kullanılarak yapılan çalışmalarla PTH'nin üretilebileceği gösterilmiş olup, hipoparatiroidizm ve osteoporozu alternatif bir tedavi yöntemi olması amacıyla, C terminal (1-34) PTH ve N terminal (1-84) PTH olarak formülize edilmiş ve ticari olarak klinik kullanımı gerçekleştirilmektedir.

Rekombinant yöntemlerle ekspresyon vektörü içerisine yerleştirilen ve hücre kültüründe üretilerek deneysel çalışmalarda geliştirmeyi planladığımız N terminal (1-84) PTH formülasyonu, hipoparatiroidizm tedavisi içinde umut verici olması planlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Paratiroid Bezi

Paratiroid bezinin ve biyolojik rolünün farkedilmesi, tiroidin tanımlanmasından sonra gerçekleşmiştir. Tiroidin varlığının tanımlanmasından sonra paratiroidin isminin verilmesi tiroid bezine dayanılarak yapılmıştır. Paratiroid bezi ilk olarak 19. Yüzyılın sonlarına doğru 1850 yılında Profesör Sir Richard Owen'ın bir hint gergedanını otopsisinde keşfedilmiş ve gözlemleri ile " tiroide bağlı sarı renkte ufak sıkı glandüler yapıda ki kitle" olarak tanımlanmış ve 1855 yılında Robert Remak tarafından yayınlanmıştır [1-3]. İsveç Uppsala Üniversitesinde tıp eğitimi alan anatomi uzmanı Ivar Sandström, 1880 yılında insanda ve hayvandaki varoluşunu anatomik ve histolojik yapısını ortaya çıkarmış ve paratiroid bezinin pozisyonundan yola çıkarak "Paratiroid" adı vererek bu keşfi ile isveç tıp kaynaklarında yayınlamıştır [4-6].

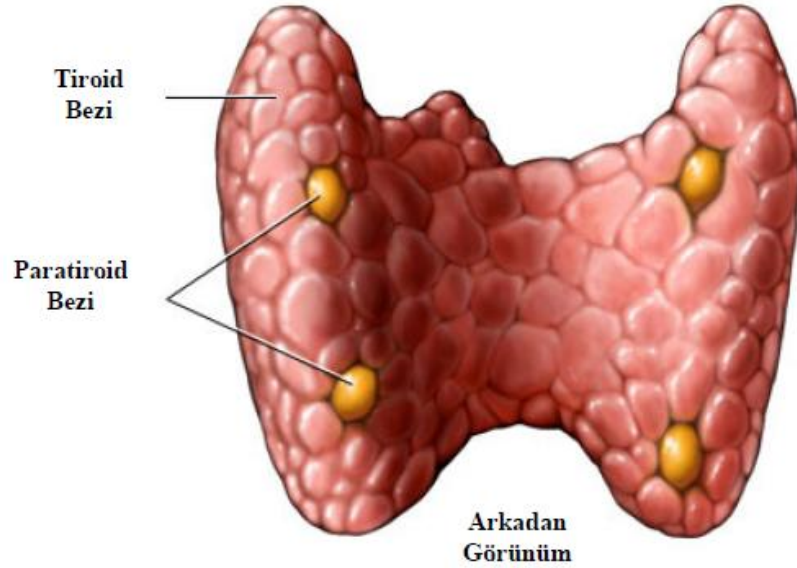
Bezlerin fizyolojisi ile ilgili kapsamlı bilgiler ise daha ileriki zamanlarda bilim ve teknoloji alanındaki ilerlemelere paralel olarak ortaya çıkmıştır. John Hopkins hastanesinde görev alan William Stewart Halsted ve Evans paratiroidlerin cerrahi anatomisini, paratiroidektomi ameliyatları sonrası görülen tetani komplikasyonlarını ve bu bulgulara dayanarak paratiroid bezlerinin vücuttaki  $Ca^{+2}$  metabolizmasının düzenlenmesinde rolü olabileceği fikrini 1906 yılında ortaya atmıştır [7]. Mac Callum ve Vogel paratiroid bezlerinin kan  $Ca^{+2}$  kontrolü işlevinin güçlü savunucularındandı. Diğer bulgular arasında,  $Ca^{+2}$  infüzyonu ve büyük dozlarda ağız yoluyla alınan kalsiyum laktat (E327) tetaniyi önlemektedir. Bu bulgular paratiroid bezlerinin amacının kanın  $Ca^{+2}$  seviyesini kontrol etmek olduğu sonucuna vardırı. Yayımlanan makalesinde paratiroid infarktının tiroid ameliyatlarında hipokalsemik etki için muhtemel riskini ilk olarak açıklamışlardır [8, 9].

İlk paratiroidektomi, 1925 yılında Viyana Tıp Fakültesinde şiddetli kemik hastalığı olan bir kişide Felix Mendel tarafından yapılmış ve vakanın boyun bölgesinde yerleşik olan paratiroid tümörü eksize edilmiştir [4, 10]. Paratiroid bezlerinden sentezlenen PTH ise ilk olarak Kanada'da bulunan Alberta Üniversitesinde James Collip tarafından 1924 yılında izole edilmiştir [8, 11, 12].

Daha sonraki yıllarda tespit edilen olgularda serum  $Ca^{+2}$  seviyesini artırdığı,  $PO_4^{-3}$  seviyesini azalttığı ve idrarla birlikte  $Ca^{+2}$  atılımını hızlandırdığının bulunması ile PTH tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır [1, 13].

## 2.2. Paratiroid Bezi Fizyolojisi

Paratiroid bezlerinin temel fizyolojik görevi PTH salgılaması ve hipokalsemi oluşumunu engellemektir. Paratiroid bezlerinin ortalama büyüklükleri 5x3x1 mm, şekil ve renk açısından kırmızımsı kahverenginden, sarımsı kahverengiye kadar farklı renklerde olabilirler. Bu değişiklik içerdiği yağ dokusunun yapısına, esas hücrelerin sayısına ve kanlanmasına bağlı olarak değişir [14]. Bezin her bir ağırlıkları 10 mg ile 80 mg arasında değişmekte olup, ortalama olarak 35-40 mg'dır ve çoğunlukla 2 çift paratiroid bezi vardır (Şekil 1) [15, 16].



Şekil 1: Paratiroid bezlerinin anatomik yerleşimi [17].

Paratiroidler yumuşak yapıda olması dolayısıyla sert yapıdaki tiroid nodülünden ayrılmasına yardımcı olur. Makroskopik olarak küresel ve yassı olmakla birlikte, tiroidin arkasında subkapsüler pozisyonda oval, yuvarlak veya damla şeklinde olur. Paratiroidler kan damarları bakımından zengin bir dokudur. Kan damarlarının beze giriş ve çıkışı fibroz yapıya sahip tümsek yapıdadırlar. Bir veya iki besleyici kan damarı bezin hemen altında çıplak gözle görülebilir ve lenf bezinden ayrılmasına yardımcı olur.

Paratiroid bezinin parankimal hücreleri esas hücreler (chief cell), paratiroid bezinin PTH salgılayan sekreatuar hücreleridir. Sitoplazmalarında glikojen ve salgı granülleri bulunur.

Histolojik bulgulara göre bezin esas hücreler olarak adlandırılan sadece bir temel hücre tipinden oluştuğunu, tanımlanmış diğer hücrelerin ise bu hücrenin morfolojik çeşitleri olduğunu göstermektedir [6, 18-20].

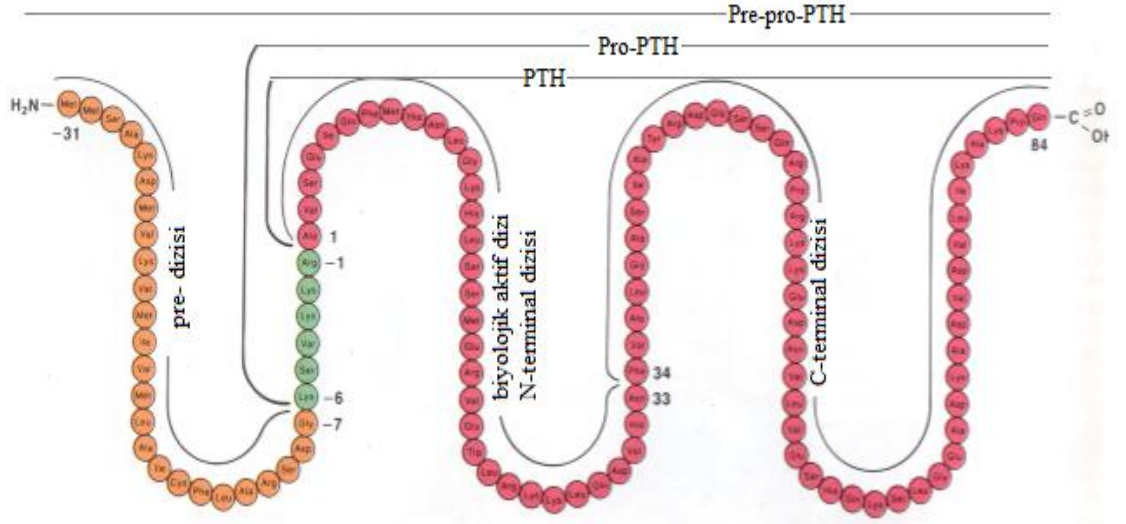
### **2.3. PTH**

Amerikalı cerrah Adolph Melancton Hanson, paratiroid bezinin aktif maddesini hidroklorik asit kullanarak, deneysel tetaniyi köpekler üzerinde tedavi etmeye çalışmıştır. Paratiroidektomi sonrası  $Ca^{+2}$  seviyelerini yükselten ve belli bir süre boyunca verildiğinde osteoporoza sebep olan maddeyi sığır paratiroid bezlerinden ekstrakte etmeye çalışarak gözlemlerini 1923 ve 1924 yıllarında yayınlamıştır [21, 22]. Aynı zamanda, çalışma arkadaşları ile birlikte insülini keşfeden nobel ödüllü Edmonton Üniversitesi biyokimya profesörü Bertram Collip, tetaniye sebep olan paratiroid bezinin ekstraktının hormon ürettiğini öne sürmüştür. Paratiroid bezini ekstraktını sıcak hidroklorik asit ile paratiroidektomi olan köpeklere enjekte ederek deneklerin daha uzun süre yaşam sürdürmelerini ve elde ettiği ekstraktın yeni bir tedavi yöntemine hizmet etmesini sağlamıştır. Çalışmalarını daha ileriye taşıyarak, tetaniden muzdarip hastalara klinik olarak hazırladığı hormon ile tedavi etmiştir. PTH'nin ilk olarak izole edildiği ve tedavi amaçlı kullanıldığı çalışmalarını yayınlamıştır [11, 12, 23].

### **2.4. PTH Fizyolojisi**

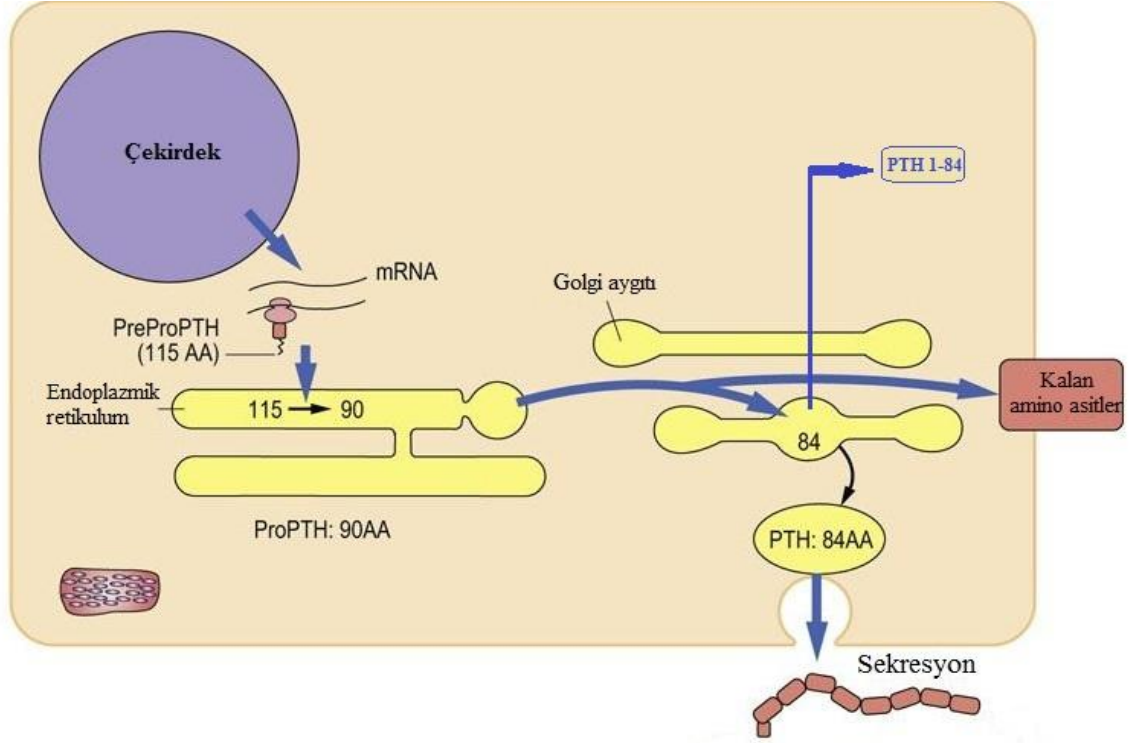
Parathormon paratiroid bezlerinden salgılanan, 11. kromozomda tek gen tarafından kodlanan, tek zincirli, 84 aa içeren ve 9500 dalton moleküler ağırlığa sahip olan vücudun  $Ca^{+2}$  ve P dengesinden sorumlu hormondur [24, 25]. Esas hücrelerde PTH üretiminin ilk basamağı, ribozomlardan 115 aa'li polipeptid preproPTH sentezidir. PreproPTH endoplazmik retikuluma girince N-terminal'den 25 aa ayrılır ve 90 aa'li proPTH'ye dönüşür.

Oluşan proPTH golgi cisimciğine girdiğinde 6 aa daha ayrılır ve 84 aa'li PTH oluşur. Çalışmalarda PTH'nin biyolojik aktivitesinden N-terminaldeki 1-34 aa sorumlu olduğu gösterilmektedir (Şekil 1.2) [23, 24, 25].



Şekil 2: Parathormon dizisi [26].

Sentezlenen PTH, ya doğrudan kana salgılanır ya da sekretuar granüllerde depolanarak ekzositoz ile hücreden atılır (Şekil 3). Hormonun fizyolojik etkisi böbrek ve kemiklerde PTHR1 aktivasyon aracılığı ile direk ve bağırsaklarda dolaylı olarak etki eder [27, 28]. Ekstrasellüler sıvıda  $Ca^{+2}$  iyonunun düşmesine karşılık, paratiroid bezlerinde CaSR uyarımının düşmesi, PTH sekresyonunun artmasına sebep olur. Ayrıca,  $Ca^{+2}$  kendisinde agonist olarak CaSR etki ederek aktivasyonunu sağlar [29, 30]. Parathormon kemiklerde ve böbrekte PTHR1'e bağlanır. Parathormon tip 1 reseptörü G-protein ailesinden olup, PTH uyarısıyla hücre içinde protein kinaz A ve C'yi uyararak sinyal yolağını başlatır [31]. Reseptör interaksyonu için PTH N-terminal sekansındaki aa'lerin olması sinyal yolağını başlatmak için gereklidir [32].



Şekil 3: Parathormon salınımı [6].

Kalsiyum geri emilimi ve idrardan  $Ca^{+2}$  atılımının azaltılması ise böbrekler tarafından gerçekleşir. Kemiklerde osteoklastların rezorpsiyon uyarımı ile kemik yapımı ve böbrekte kalsifediolün kalsitriole dönüşümünü uyararak bağırsaklardan  $Ca^{+2}$  absorpsiyonunu artırmaktadır [33,34].

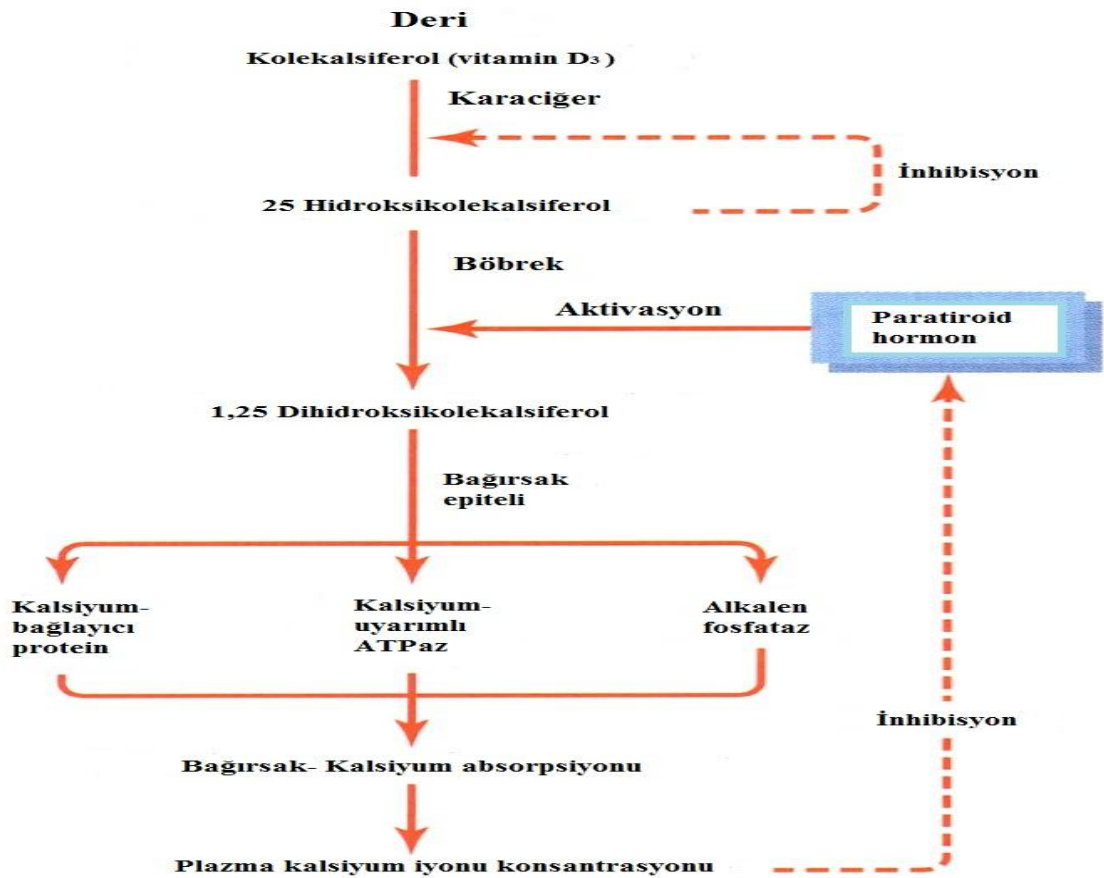
İntakt PTH (iPTH)'nin serumdaki normal düzeyi 10-55 pg (pikogram)/ ml (mililitre)'dir. Yarı ömrü yaklaşık 10 dakika (dk.) dır. Salgılanan polipeptid karaciğer kuppfer hürelerinde parçalanarak biyolojik olarak inaktif olan orta ve C-terminal fragmanları oluşur. Bu fragmanlar da gerektiğinde böbrekler tarafından temizlenir [25, 35].

PTH stimülasyonuna aralıklı olarak maruz kalan bazı genler; IGF-1, amfiregulin, Runx2, TGF-beta, nükleer faktör NF-kB ligant (RANK-L) ve M-CSF' dir. Fakat PTH aralıklı maruz kalma ile kronik maruziyetin kemik oluşumunda ve erimesini uyarıcı paradoksal mekanizmasını aydınlatmak için yapılan çalışmalar devam etmektedir [36, 37].



## 2.5. PTH Salınımı ve Kontrolü

Parathormonunun sentezini regule eden düzenleyici tropik bir hormon yoktur. Parathormon salınımını esas belirleyen etmen serum içerisindeki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu tarafından regule edilirken, bununla birlikte  $Mg^{+2}$  ve vitamin D düzeyleri de PTH sentezi üzerinde etkilidir. Ekstrasellüler sıvıda  $Ca^{+2}$  ve PTH arasında negatif feed-back ilişkisi vardır ve serum  $Ca^{+2}$  değeri fizyolojik sınırların altına indiğinde homeostazik dengeyi sağlamak için PTH salınımı artar (Şekil 4). Normal düzeyde plazma  $Ca^{+2}$  seviyesi 8,5-10,5 mg/dl (desilitre) olup, yarı yarıya iyonize ve proteine bağlı şekilde dolaşır. % 45'i serbest iyonize formda, %45 albümin proteinine ve %10'da organik anyonlara bağlıdır. Albümin ve vücut sıvısının pH'si, plazma içerisinde  $Ca^{+2}$  dağılımını ayarlayan en önemli iki faktördür [38]. Kalsiyum metabolizmasının ana bileşeni hücrelerdeki  $Ca^{+2}$  reseptörleridir. Parathormon hedef hücre membranı üzerindeki çok özel reseptörlere bağlanır; bu reseptörler renal hücreler, kemik hücreleri, kondrositler, adipositler, vasküler düz kaslar, fibroblastar ve plasental trofoblastlarda bulunur. [6, 25, 35, 39].



Şekil 4: PTH ve  $Ca^{+2}$  kontrolü [26].

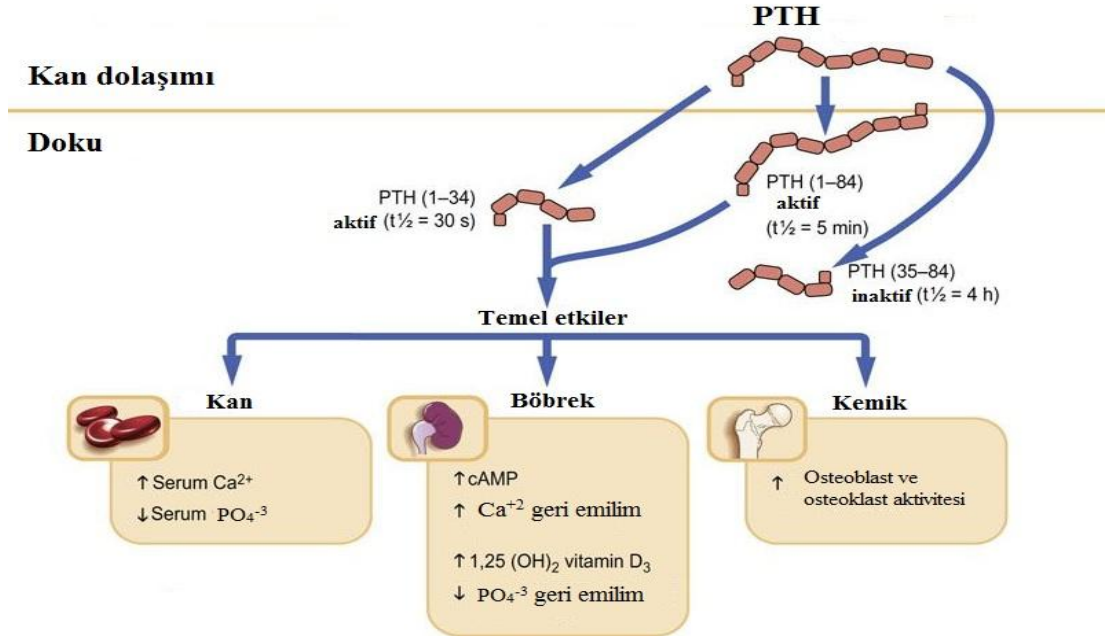
Hedef organlardaki reseptörlerine bağlanan PTH, intrasellüler mediyatör olarak siklik adenozin monofosfatı (cAMP) kullanır ve serum  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu arttırmaya çalışır.  $Ca^{+2}$  kontrolünü yöneten hücrelerde; paratiroid, kemik hücreleri ve kalsitonin salgılanan hücrelerde iyonize  $Ca^{+2}$  reseptörü bulunur. Hücreler  $Ca^{+2}$  seviyesindeki en küçük değişimleri bile algılayarak hücrede fonksiyonel değişimlerin ortaya çıkmasını sağlarlar. Serum  $Ca^{+2}$  yoğunluğunda 0,1 mg/dl'lik azalma miktarı PTH salınımını 2 kat artırabilir ve yanıt olarak birkaç saniye içerisinde depo granüller içindeki preform PTH salınır. On beş dk. içerisinde de PTH sentez hızında artış olur. Paratiroid hücrelerinin kalsiyuma verdiği cevap, hücre zarında yer alan ve G proteinleri ile bağlantılı CaSR aracılığı ile sağlanır. PTH'nin N-terminal üzerindeki 1, 3 ve 17. serin aa'nın fosforilasyonu ile reseptör aktivasyonu gerçekleşir [40]. Aynı zamanda yüksek  $Ca^{+2}$  PTH'nin sentezini düzenlemesi haricinde, hücre içerisinde yıkılmasını da yönlendirir [41].  $1,25(OH)_2D_3$  paratiroid bezleri üstüne direk etkisi preproPTH mRNA sentezini yavaşlatarak PTH sentezini azaltır.

Hipokalsemi dahil, bütün uyarıların PTH salgılanmasını uyarması, paratiroid hücrelerinde adenilat siklaz aktivitesinin uyarımı ve hücre içinde cAMP artışı ile depo sekresyondan sorumlu granüllerin artması sonucu olur. cAMP'yi inhibe eden fosfodiesteraz enziminin (FDE) inhibe edilmesi de ekzositozu artırır. Adenil siklazı  $Ca^{+2}$  inhibe eder. Paratiroid hücrelerinde cAMP düzeyini azaltan diğer ajanlar ise alfa adrenerjik katekolaminler, prostaglandin F2 alfa gibi metabolitlerdir [40, 42, 43]. Serum magnezyum ( $Mg^{+2}$ ) düzeyi PTH salınımının regülasyonunda  $Ca^{+2}$  etkisine benzer fizyolojik rol oynar.  $Mg^{+2}$ , PTH sentezi için gereklidir, yalnız  $Mg^{+2}$  düşük potansiyelde  $Ca^{+2}$  reseptör agonisti olması ve  $Mg^{+2}$  plazma değerinin kalsiyumdan düşük olması nedeniyle fizyolojik değişimlere ve PTH salınımına etkisi daha azdır. Ekstrasellüler magnezyumun artışı PTH sekresyonunu inhibe ederken, paratiroid hücrelerinin agonist ile stimüle olması cAMP akümülyasyonunu inhibe eder [44-47]. Parathormon salınımına etki eden bir diğer element ise potasyum ( $K^+$ )'dur. Potasyumun yüksek konsantrasyonu histamin reseptörleri ( $H_2$ ) aracılığıyla PTH salınımını uyarır. Lityum içeren ilaçların alınması da PTH sentezini artırır. Kemoterapi bazlı ilaçlar mikrotübüler yapıyı bozarak PTH salgısını inhibe eder. Büyüme hormonu, kortizon ve kalsitonin gibi çeşitli hormonlar PTH salgılanmasını indirekt olarak stimüle eder.

## 2.6. PTH Hedef Organ Etkileri

Parathormonun majör etki ettiği üç hedef organı vardır; kemik, böbrekler ve bağırsaklardır. Hedef organların her biri üzerine sonuç etkisi hücre dışı sıvıda  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu arttırmaktır. PTH'nin varlığında kemik dokusu üstündeki etkisi serum kalsiyumu dengede tutmak ve bu dengeyi ekstrasellüler sıvıda  $Ca^{+2}$  arttırıcı etkisini; iskelette osteoblast ve osteoklast aktivitesi ile kemikten kalsiyumun mobilize olarak plazmaya geçmesi, kalsiyumun böbreklerde ki renal tübüler sıvıdan reabsorbsiyonunu arttırmasının yanında inorganik fosfatın renal tübüler sıvıdan reabsorbsiyonunu inhibe etmesi,  $VD3-1\alpha$ -hidroksilaz aktivasyonunu ile  $1,25(OH)_2D_3$  sentezinin artışı ile  $Ca^{+2}$  emilimini bağırsaklardan arttırması sonucunda gerçekleştirir (Şekil 5).

Böbrekler ekstrasellüler  $Ca^{+2}$  homeostazisi için kritik öneme sahiptir. Normal serum  $Ca^{+2}$  seviyesinin altına inildiğinde, neredeyse tüm  $Ca^{+2}$  tübüler sistemdeki glomerüler filtrasyondan emilerek kana geri yollanır.  $Ca^{+2}$  miktarı arttığında ise idrar ile dışarı atılır [6].

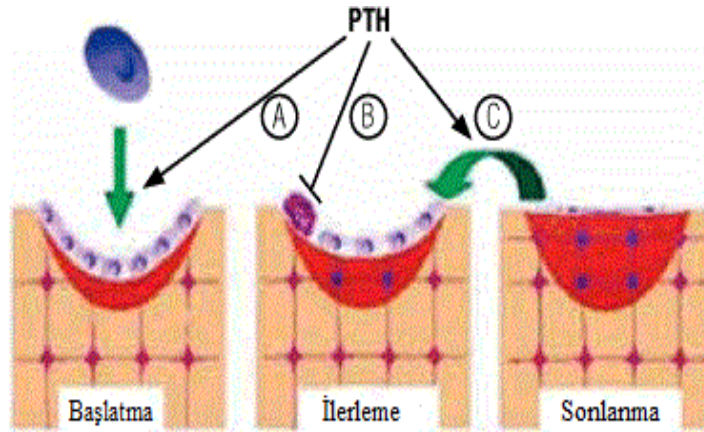


Şekil 5: Parathormonun hedef organ etkileri [6].

### 2.6.1. PTH ve kemik dokusu etkisi

Toplam kemik kalsiyumun yaklaşık% 1'i, iki yönlü akış yoluyla PTH ve kalsitrolün etkisi altında her ay değişir. Parathormon düzeyi, kemik dokusunda iki evreli hem anabolik hem de katabolik etki gösterir. Düşük konsantrasyonlar da PTH anabolik etki ile kemiklerde lizozomal enzimler gibi enzimlerin sentezinin arttırarak organik matriksin oluşmasını, minerallerin depolanmasını, osteoblastların sayısını ve kollajen sentezine etki ederek reabsorbsiyonu ve mineralizasyonu artırır (Şekil 6). Parathormon, doğrudan ilişkili primer kemik hücreleri osteoblastlardaki osteoblastik enzim aktivitesini kemik yapımında paralel olarak plazmada alkalin fosfataz seviyesini arttırır ve fizyolojik sınırlar içerisinde sağlıklı kişilerde hem kemik formasyonunu hem rezorbsiyonunu stimüle ederek kemik homeostazisi sağlanır [48-50].

Parathormon sekresyonunun artması durumunda kemik dokusunda katabolik, rezorptif aktivite hakim olur. Katabolik etki öncelikle ilk birkaç sa. içerisinde kalsiyumfosfat tuzlarının yıkımı ile gerçekleşen erken fazdır ve en önemli etkileri osteositlerin aktivasyonu sonucunda  $Ca^{+2}$  rezorbsiyonun kemiklerden salınımı ile ekstrasellüler sıvıda dengelenmesini sağlar. Geç fazda ise PTH'nin salınımının artması ile 24 sa.lik süreçte gerçekleşen fazdır. Kemiklerde osteoklast hücrelerinin proliferasyon ve aktivitesi sonucunda kemikte osteoklastik rezorbsiyon gerçekleşir ve kemik matriksin yıkımını gösteren, hidroksiprolin ve diğer kollajen ürünlerinin idrarla atılımını artırır [51].



**Şekil 6:** PTH'nin kemik üzerindeki anabolik etkisinin mekanizması; PTH osteoblast aktivitesini artırır; A. osteoblast gelişimini artırır, B. Osteoblast apoptozunu inhibe eder, C. Hücreleri matriks sentezinin sürdürülmesi için aktive eder [52].

Parathormonun kemik dokuda geç fazda gerçekleşen etkisi osteoklastik ve osteoblastik aktiviteyi arttırması ile kemik depozisyonundan daha çok kemik rezorbsiyonuna sebep olmasıdır. Diğer taraftan, D vitamini yokluğunda PTH'nin kemik doku kaybı üzerindeki etkisi önemli oranda azalır ve muhtemelen kalsitriolün hücre membranında  $Ca^{+2}$  transportunun artırma üzerine olan etkisi sonucunda gerçekleşir [52].

### **2.6.2. PTH ve böbrek üzerine etkisi**

Böbreklerde PTH'nin temel fizyolojik etkisi, glomerülden filtre olan  $Ca^{+2}$  reabsorbsiyonunu artırma ve  $PO_4^{-3}$  atılımını sağlamaktır.  $Ca^{+2}$  reabsorbsiyonun büyük bir kısmı proksimal tübüllerin henle kulpunda trans epitelyal voltaj gradientini artırarak,  $Ca^{+2}$  pasif transfüzyon yoluyla granüllerdeki distal tübüldeki  $Ca^{+2}$  kanallarının hücre yüzeyine ulaşmasını sağlamaktır [48, 53]. Parathormon, proksimal ve distal tübüler reabsorbsiyonu arttırarak  $Na^+/Ca^{+2}$  bağımlı  $PO_4^{-3}$  transportunu inhibe eder ve ürik asit ile daha fazla  $PO_4^{-3}$  atılımını sağlar ve aynı zamanda  $Ca^{+2}$  klirensini azaltır. Böbrekler plazmadaki  $Ca^{+2}$  değişikliklerine hızlı bir şekilde cevap oluşturur ve plazma  $Ca^{+2}$  değerinin kısa sürede dengelenmesini sağlar.

Parathormon hücre dışındaki fosfatın konsantrasyonunu iki mekanizma ile ayarlar; böbrekler üzerinde fosfatürük etki ile plazmadaki  $PO_4^{-3}$  miktarının azalması ve kemiğin rezorpsiyonunu ortaya çıkaran fosforun plazmadaki  $PO_4^{-3}$  düzeyini yükseltmesidir. Glomerül filtrasyondan geçen inorganik fosforun büyük bölümünün reabsorbsiyonu proksimal tübülde aktif transport olur ve PTH bu iletiyi inhibe eder. Fosfatüri, PTH salınımından on-on beş dakika içerisinde görülen en erken etkisidir. Parathormon,  $PO_4^{-3}$  absorpsiyonuna paralel olarak  $Mg^{+2}$  ve hidrojen ( $H^+$ ) reabsorbsiyonunu proksimal tübüllerden arttırarak,  $Na^+/K^+$  ve bikarbonat ( $HCO_3^-$ ) reabsorbsiyonunu da inhibe eder [54].

### **2.6.3. PTH ve bağırsak üzerine etkisi**

Parathormonun bağırsaklardan doğrudan  $Ca^{+2}$  emilimi üzerine herhangi bir etkisi yoktur. Parathormonun bağırsaklar üzerine etkisi dolaylı olarak D vitamini metaboliti

olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sentezini regüle ederek bağırsaklardan Ca<sup>+2</sup> ve PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> absorpsiyonunu sağlamaktır [54]. Günlük alınan Ca<sup>+2</sup> miktarının %80 kadarı üst gastrointestinal sistemden absorbe olur. PTH inhibe olduğunda 25(OH)D vitamini, 24,25(OH)<sub>2</sub> dihidroksi kolekalsiferol'e dönüşür.

Kolekalsiferol bağırsak mukozasında bulunan hücrelere girerek ve sitozol da reseptörlere bağlanarak Ca<sup>+2</sup> bağlayan protein oluşumuna etki eder. Bu olayda kalsiyumun mukozadaki hücrelere geçişini ve plazmaya taşınmasını kolaylaştırır [56].

Parathormon, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> salınımını arttırmakla bağırsaktan PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> absorpsiyonunu artırır. Parathormonun bağırsakta Ca<sup>+2</sup> absorpsiyonunun artırmasının hiperkalsemik etkiye sebep olabilmesi için aktif vitamin D metabolitlerinin sentezinin artması gerekir. Fakat bu metabolitlerin sentezi yavaştır ve PTH sentezinden sonra, 24 sa.ten daha uzun bir süre gereklidir [48, 57].

## **2.7. PTH Metabolizması**

PTH metabolizması karaciğerde kuppfer hücrelerinde gerçekleşir. Bu mekanizma dolaşımında farklı N-terminalinden kesik PTH fragmanlarını dolaşıma salar. Bu küçük parçalar C-terminal parça olarak adlandırılırlar, çünkü peptidin karboksil kısmına sahiptirler. Bu parçalar; böbrekler tarafından dolaşımdan temizlenir, yalnızca kronik böbrek yetersizliği (CRF) olan hastalar da kanda akümülyasyonu gerçekleşir, Parathormondan (1-84) daha uzun yarı ömre sahiptir, sadece PTH'nin degradasyon ürünü değil, hatta paratiroid bezinden de sentezlenirler ve normal bir bireyde toplam PTH'nin % 15-30'unu oluştururlar [23].

## **2.8. Parathormonun Diğer Etkileri**

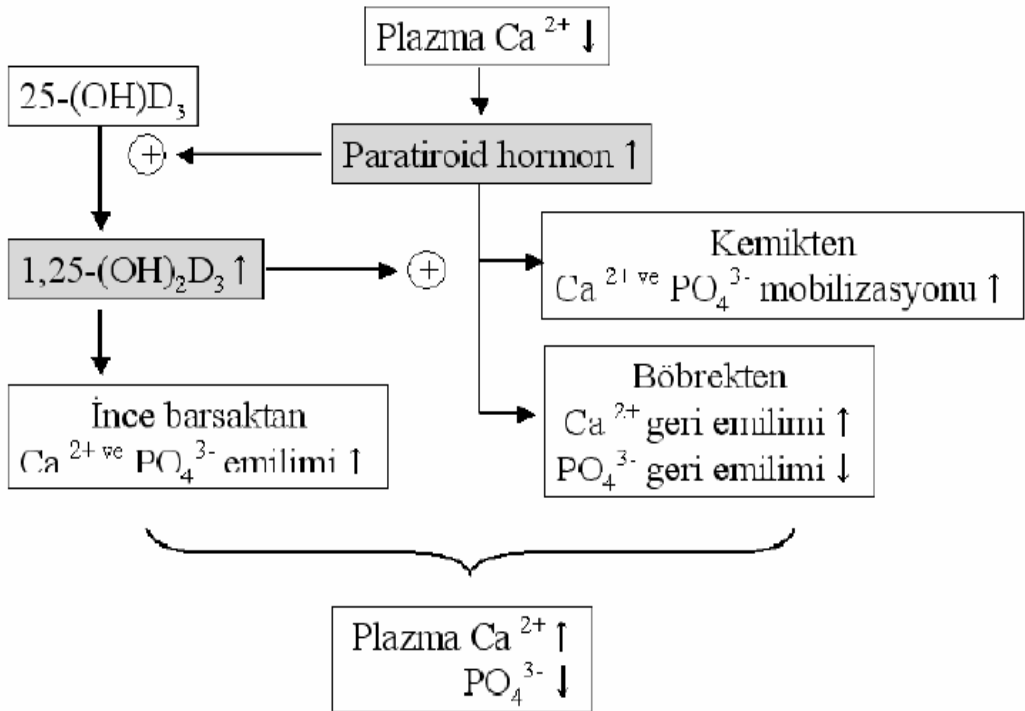
Parathormon artışı veya azlığı durumunda kasların, santral sinir sisteminin, periferik sinirlerin ve diğer endokrin bezlerin fonksiyonunda, plazmadaki Ca<sup>+2</sup> yoğunluğundaki değişikliklerde sapmalar görülür. Böbrek ve karaciğerde glikoneojenezi arttırabilir. Meme bezlerinde Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunu ve izole yağ hücrelerinde lipolizisi arttırır [6, 54].

## 2.9. PTH İyonik Metabolizması

### 2.9.1. PTH ve Ca metabolizması

Kalsiyum insanların tüm vücut sıvılarında yer alan, sekresyon, farklılaşım ve motilite gibi birçok fizyolojik süreçte rol oynayan, ayrıca kofaktör ve intrasellüler ikincil haberci molekül olarak görev alan bir mineraldir [58]. Erişkin bir insanda yaklaşık olarak 1000 g  $Ca^{+2}$  bulunmaktadır.

Kalsiyum miktarının %99'u kemiklerde, %1 ise intrasellüler ve ekstrasellüler sıvıda bulunmaktadır. Beslenme ile alınan kalsiyumun %35'i D vitamini sentezinin etkisiyle bağırsaklar tarafından emilir. Plazmada  $Ca^{+2}$  ayarlanması, kalsiyumun kendisi ve bazı hormonlar tarafından yönetilmektedir. Hormonlardan en önemlisi kalsitrioldür (Şekil 7). Uzun vadede, PTH osteoblastlara direk etki ve osteoklastlara ise indirek etki ederek  $Ca^{+2}$  metabolizmasındaki değişiklikleri indükler. PTH üretiminin devamlılığı pre-osteoklastları aktif osteoklasta transforme ederek kemik yapımını uyarır.



Şekil 7:  $Ca^{+2}$  regülasyonu [6].

PTH, interlökin-1 ve 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ile birlikte RANK-L reseptör aktivasyonu ile osteoblastik üretimi uyarır. Pre-osteoklastların yüzeyi üzerindeki bu reseptörler, RANK-L aktivasyonu ile aktif osteoklast dönüşümünü indükler. Diğer bir taraftan, PTH kemik yapımını uyarırken aynı zamanda osteoblast proliferasyonu ve farklılaşımına yardım eder ve apoptozunu geciktirir. Bu özelliğe dayanarak klinikte osteoporoz tedavisi için kullanılmaktadır [23, 54, 59].

### 2.9.2. PTH ve Mg metabolizması

Parathormon ve Mg<sup>+2</sup> arasındaki ilişki ile ilgili yapılan çalışmalar ekstrasellüler Mg<sup>+2</sup> seviyesindeki değişikliklerin, Ca<sup>+2</sup> değişikliklerine benzer etkiler oluşturduğu tespit edilmiştir. Mg<sup>+2</sup> düşük etkide bir Ca<sup>+2</sup> reseptörünün agonisti olması ve kan düzeyinin kalsiyumdan düşük olmasına bağlı olarak, magnezyumdaki fizyolojik değişikliklerin PTH salınmasına etkisi vardır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda normal fonksiyonda düşük Mg<sup>+2</sup> düzeyi PTH sentezini inhibe eder [45]. Kronik hipomagnezi düşüklüğü halinde paradoks bir hipoparatiroidi gelişir. Yapılan değerlendirmeler bu durumun hücre içi sıvıda Mg<sup>+2</sup> eksikliği, sekretuar mekanizmalarla ilişkili olarak, PTH salınımını inhibe ettiği düşünülmektedir [46, 60, 61].

### 2.9.3. PTH ve D vitamini

D vitamini, esas rolü Ca<sup>+2</sup> homeostasini ve PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> metabolizmasını düzenleyen, bağırsaklardan absorbe olan ve yağda eriyen bir vitamindir. Daha iyi bir tanımla, besinsel olmayan ultraviyole ışın kaynağından oluşan ve bu oluşumda güneş kaynağından gelen UVB ışınına maruz kalınmasıyla konsantrasyonunu arttıran vitaminsel mineraldir. Yüksek rakımlarda UVB ışınına daha az maruz kalınması vücutta düşük D vitamini konsantrasyonuna sebep olmaktadır. Sentezlendiği yerden karaciğere giderek vitamin D<sub>3</sub> ve daha sonra metabolizma edilerek 25(OH)D formuna dönüşür. PTH ve hipofosfatemini renal enzim olan VD3-1α-hidroksilazı uyararak vitamin D<sub>3</sub>ü kalsitriole dönüştürür. 1,25(OH)D, D vitaminin en aktif formu olup bağırsaklardan Ca<sup>+2</sup> absorpsiyonunu sağlar.

D vitamini ile PTH ilişkisi; serum PTH seviyesi ile serum 25(OH)D seviyesinde negatif ilişki bulunması ve D vitamini suplementlerinin PTH seviyesini baskılamasıdır. Bu fizyolojik rol, hipokalsemi tedavisinde Ca<sup>+2</sup> suplementlerinin tek



başına yeterli olmadığını göstermektedir. Düşük PTH seviyesinde 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sentezi bozulur ve aynı zamanda Ca<sup>+2</sup> absorpsiyonu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> eksikliğinde azalmaktadır [62-64].

## 2.10. Hipoparatiroidizm ve Etiyolojisi

Hipoparatiroidizm, yetersiz PTH salınımının neden olduğu düşük Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonu sonucu oluşan hipokalsemik bulguya sebep olan hastalıktır. Edinsel hipoparatiroidizm en sık olarak boyun bölgesine uygulanan cerrahi operasyon sırasında paratiroid bezlerin tamamının istenmeden çıkarılması veya hasarlanması nedeni ile oluşabileceği gibi daha sıklıkla kan akımının kesilmesi sonucunda ortaya çıkar. Amerika ve Avrupa da yapılan çalışmalarda 4.000'de 1 birey kısmi veya tamamının alındığı tiroid ameliyatında paratiroidin zarar görmesinden kaynaklı hipoparatiroidi gelişmekle birlikte 2/3 birey tiroid operasyonu olmadan, otoimmün hastalıklar nedeniyle idiyopatik hipoparatiroidi olmaktadır. Türkiye de ise yapılan tiroid operasyonlarından 100.000'de 18 olasılıkla görülmektedir. Bir diğer sebep, nadir görülen genetik mutasyonlardan kaynaklı CATCH-22 (DiGeorge sendromu), otoimmün düzenleyici (AIRE) gen ve CaSR mutasyonunun sebep olduğu otozomal dominant hipokalsemi (ADH)'dir [64, 65].

Hipoparatiroidizmin klinik etkileri hipokalsemi, hiperfosfatemi ve tetani ile açıklanmaktadır. Ortaya çıkan durum iskelet nöromuskülerde iritabiliteye neden olur. Distal ekstremitelerde ve ağız çevresinde parestesisi, kas krampları, laringospazm, Chvostek ve Trousseau belirtileri, tetani ve nöbet görülür. Konvansiyonel terapide aktif vitamin D ve Ca<sup>+2</sup> suplementi takviyesi, serum Ca<sup>+2</sup> seviyesini normal sınırlara getirmekle beraber, Ca<sup>+2</sup>-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> homeostazisini fizyolojik seviyede normalleştirememesi ve ek komplikasyon riskini artıran durumlarla karşı karşıya getirmesi hastaların yaşam kalitesini düşmesine sebep olur. Birçok çalışmada rPTH (1-84) ve N-terminal PTH fragmanı terapi amaçlı kullanılmaktadır. Her iki takviyede serum Ca<sup>+2</sup> seviyesini normale getirirken, vitamin D ve Ca<sup>+2</sup> suplementi ihtiyacını azaltmaktadır. Fakat hormon enjeksiyonu Ca<sup>+2</sup> seviyesini yükseltirken, bu seviyenin istenilen fizyolojik konsantrasyonda etki etmesini sağlamak için daha fazla çalışma gerekmektedir [8, 66, 67].

### 2.10.1. Klinik bulgu; hipokalsemi

Hipoparatiroidizmin sıklıkla görülen komplikasyonu hipokalsemidir. Serumdaki  $Ca^{+2}$  seviyesinin 8,5 mg/dl'nin ve iyonize  $Ca^{+2}$  düzeyinin 1,12 mmol/l'nin altında olması ile ortaya çıkan klinik tablodur. Hipokalsemi tiroidektomi operasyonlarından sonra 48 sa. içerisinde ortaya çıkar. Toplam  $Ca^{+2}$  değeri 4,5 mg'm, iyonize  $Ca^{+2}$  değerinin ise litrede 0,62 mmol'un altına düştüğünde ağır hipokalsemi seyriyle karşılaşılır.

Tiroidektomi sonrasında görülen hipokalseminin oluşum nedenleri; Paratiroid bezinin cerrahi olarak eksizyonu, paratiroid bezinin devaskülarizasyonu, artan endotelin-1 salgısı, diseksiyon sonrası gelişen venöz staz, ödem ve kapsüller hematomdur. Operasyondan sonraki bir yıl içerisinde takviye terapiye rağmen plazma  $Ca^{+2}$  düzeyi hala normal değer altındaysa kalıcı hipokalsemi görülür.

### 2.10.2. Hipokalseminin sistemler üzerine etkisi

#### *Nöromusküler Sistemdeki Sonuçlar*

- Parestezi; perioral bölgede ve parmaklarda parestezi, karıncalanma hipokalseminin ilk belirtisi
- Tetani, chovestek ve trousseau belirtileri, larenks spazmı, karpopedal spazm
- Pseudo Tümör Cerebri, intrakranyal basınç artışı ve papil ödemi
- Fokal veya Generalize epileptik ataklar
- Ekstrapiramidal belirtiler
- Organik beyin sendromu, psikoz, anksiyete

#### *Kardiyovasküler Sistemdeki Sonuçlar;*

- EKG'de QT uzaması
- Konjestif kalp yetmezliği
- Digitalis toksikasyonu
- Ventriküler ileti bozuklukları

#### *Dermatolojik sonuçlar;*

- Kuru cilt, atopik egzama
- Bölgesel alopesi
- Kırılğan tırnaklar

### ***Oftalmik sonuç;***

- Subkapsuler Katarakt [68].

### **2.10.3. Hipoparatiroidizm tedavisi**

Hipoparatiroidizm fizyolojik etkisi olarak ortaya çıkan hipokalsemi ve nöromusküler duyarlılık için geleneksel olarak uygulanan tedavi yöntemi  $Ca^{+2}$  ve D vitamini suplementi takviyesidir. Bu takviyeler farklı bölgelerdeki enstitüler tarafından farklı konsantrasyonlar da ayarlanmaktadır. Parathormon aktif  $1,25(OH)_2D_3$  sentezi için böbrek  $VD_3-1\alpha$ -hidroksilaz enzimini uyarır ve bunun sonucu olarak hipoparatiroidizmde PTH eksikliğinin yanı sıra  $1,25(OH)_2D_3$  vitamini eksikliğiyle de baş edilmelidir. Bu yüzden ki, konvansiyonel tedavide  $Ca^{+2}$  ile D vitamini takviyesi birlikte alınmaktadır.

D vitamini aktivasyonu için al fakalsidol ( $1\alpha$ -hidroksivitamin D) ve  $1,25(OH)_2D_3$  takviyesi kullanılmaktadır. Kalsitriol daha güçlü kalsemik etkiye sahiptir. Aktif D vitamini analogları ve  $Ca^{+2}$  takviyesi ile serum  $Ca^{+2}$  düzeylerinin normalize edilmesine rağmen, hastaların yaşam kalitesinin bozulmasına (QoL test-hastaların yaşam kalitesini ölçen test) ve bir takım komorbidite riski altında kalmalarına neden olmaktadır [69].

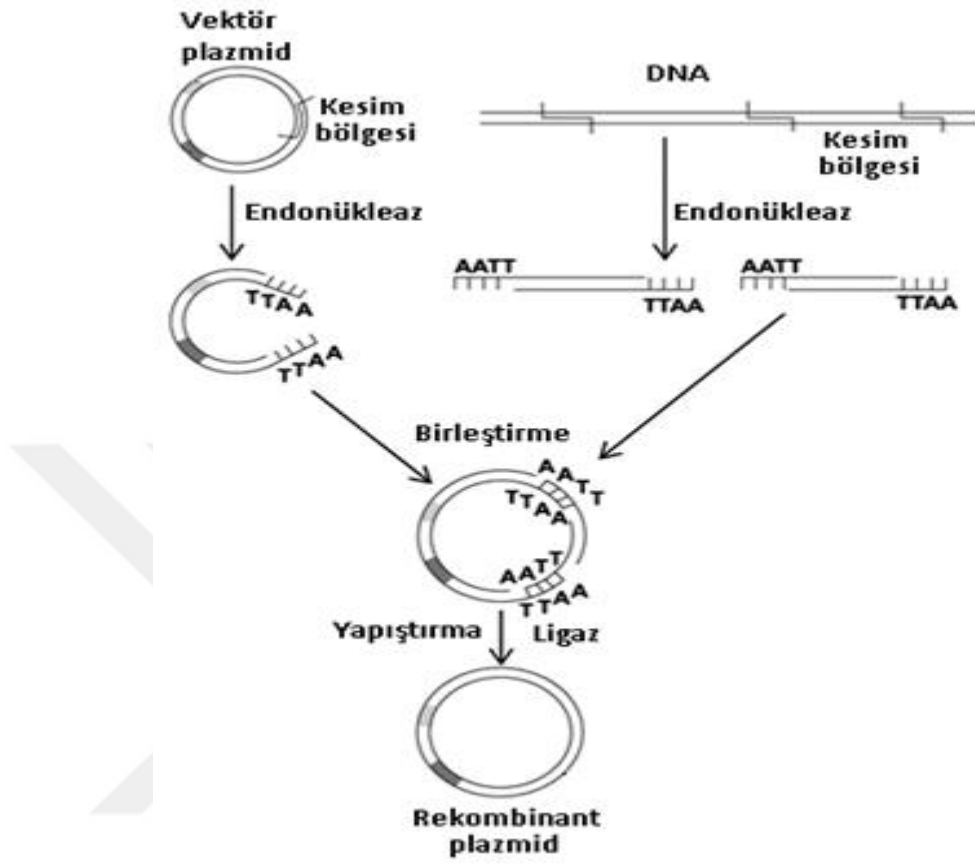
### **2.11. Rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretimi**

Rekombinant DNA teknolojisi, herhangi bir canlının DNA'sından elde edilen dizilerin, vektör adı verilen taşıyıcı moleküllerin içerisine aktarılarak farklı DNA parçalarının birleşmesi ile üretilen yeni genetik kombinasyonların oluşturulmasını kapsayan bir teknolojidir.

Bu alanda yapılan muameleler, genlerin herhangi bir organizmadan alınarak yeni bir biyolojik bileşen üretilmesi ve üretilen genlerin gerek temel, gerekse uygulamalı araştırmalar için kullanılması olarak tanımlanabilir.

Bu teknolojinin en yaygın kullanılmıştırğı alan biyoteknoloji, biyolojik moleküllerin endüstriyel üretimiyle gelişen en önemli alandır. Farmakoloji alanında uygulanan ve terapötik anlamda üretilen tüm biyoteknolojik protein üretimine farmasötik biyoteknoloji denir. Bugün, en yaygın olarak kullanılan ticari biyoteknoloji

ürünlerden biri insülinidir. Rekombinant DNA teknolojisinde en yaygın olarak kullanılan vektörler plazmidlerdir (Şekil 8).



Şekil 8: Rekombinant yöntemle plazmid içerisine gen klonlanması [70].

Rekombinant yöntemlerle üretilen proteinlerin başında gelen ve sistematik düzenleyiciler olan hormonlar ticari seviyede üretilen biyoteknolojik ürünlerdir [71].

## 2.12. Rekombinant PTH üretimi

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada rekombinant metodlarla üretilen ve çalışmaları halen devam eden PTH, osteoporoz başta olmak üzere hipoparatiroidide tedavi edici etkisinin olduğu kanıtlanmış ve geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Osteoporoz kemik hassasiyetinde kırılabilirliğin artması ile kemik kütlelerinde azalma ve kemik yapısında bozulma ile karakterize edilmiştir. Osteoporoz tedavisinin temeli biyofosfanat gibi kemiği güçlendirici ajanlar kullanmaktır. Buna rağmen,

biyofosfanat iskelet kütlesinin %25 kaybı olan hastada kemik mineral yoğunluğunu (BMD) %4-8 oranında arttırmaktadır [72]. PTH içeren, “osteobolik” ajanlar ise BMD’yi arttırmada daha tesirli ve terapötik potansiyele sahiptirler.

Forteo™ teriparatide PTH (1-34) ürünü FDA (Food and Drug Administration) tarafından 2002 yılında onaylanmıştır. Amerika, Avrupa ve Güney Amerika da ise faz III çalışmalarını geçmiş ALX111 (rPTH (1-84)) ilacı anabolik ajan olarak erkek ve kadın osteoporoz tedavisi için onaylanmıştır [36, 73-76]. Daha sonra yapılan farmakokinetik çalışmalar da daha detaylı çalışma ve zamanla ortaya çıkabilecek komplikasyonlara kadar güvenilirliğini kanıtlamış raporlar yayınlanmıştır [77]. Günlük tavsiye edilen doz miktarı ile 2 yıldan uzun süre içerisinde osteoblastik aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir [78]. Bir de, sınırlı periyotta PTH kullanımı kemik formasyonuna rezorpsiyondan daha fazla katkıda bulunmaktadır. Bu sınırlı süre içerisindeki tedavi periyoduna “anabolik pencere” adı verilmektedir [79].

Kapsamlı çalışmalar içerisinde yapılan PTH (1-34) takviye terapisi sırasıyla %13 bel omuru ve %6 femur boyunda BMD artışı olduğunu göstermiştir [80]. Terapinin devam eden 8 aylık sürecinde %65’ten %75’e kırılma riskinin azaldığı gösterilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada ise nadir görülen çene kemiği nekrozunda konvansiyonel tedavi olarak PTH takviyesinin iyileştirici etkisi gösterilmiştir [81]. PTH’nin anti-osteoporoz ilacı olduğu kanıtlanmış, fakat yüksek ücreti, enjeksiyon yolu ve güvenilirliği konusundaki şüpheler doğrultusunda ilk uygulanacak terapi yöntemi olarak kabul görmemiştir. Üstelik yapılan bazı çalışmalarda ratlara verilmesi sonrasında bir çeşit kemik kanseri türevi olan osteosarkoma vakalarına sebep olduğunun görülmesiyle, FDA tarafından 2 yıllık limit ile kullanımı sınırlandırılmıştır. Klinik kullanımında insanda henüz osteosarkomaya sebep olduğu görülmemesi ve kanıtlanmamış olmasına rağmen risk üzerindeki çalışmalar devam etmektedir [82-84].

Başarılı elde edilmiş çalışmalara dayanarak PTH tamamlayıcı takviye olarak hipoparatiroidizm tedavisinde kullanımı değerlendirilmektedir. Birçok vakada, hipoparatiroidizmde gelişen kallus formasyonu ve ağrı çözümünü yüksek dozda  $Ca^{+2}$  ve vitamin D supplementi ile tedavinin zorluğu rapor edilmiştir. Günlük çift doz PTH kullanımının, serum  $Ca^{+2}$  düzeyinde daha az dalgalanmayla etkili olduğu ve normokalsemi seviyesi elde edilirği,  $Ca^{+2}$  ve vitamin D supplementi ihtiyacını da azalttığını göstermiştir [85].

Çalışmamızda rekombinant PTH üretimi gerçekleştirilmiştir. İnsan PTH genine ait dizi, paratiroid hücrelerinin kültüründen elde edilen mRNA'nın cDNA'ya çevrilmeyle elde edilmiştir. Daha sonra ökaryotik ekspresyon vektörüne aktarılan gen, hücre kültüründe HeLa ve AGS hücre hatlarına transfeksiyon ile aktarılmış ve üretimi sağlanmıştır. Hücre kültürü sıvısına salgılanan PTH, biyokimyasal analizler ile kantitatif olarak tespit edilmiştir. Elde edilen hormon SDS-PAGE elektroforez ile de gösterilmiştir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Cihazlar

Tez aşamasında kullanılan cihazlar aşağıdaki tabloda yer almaktadır.

**Tablo 1:** Kullanılan cihazların listesi

<b>Cihaz Adı</b>	<b>Cihazın Firması</b>	<b>Kullanım Amacı</b>
Santrifüj	Hettich	Tüm moleküler çalışmalar da kullanılmıştır.
Yatay Jel Elektroforez Sistemi	Major Science	PZR ürünlerinin yürütülmesin de kullanılmıştır.
Çalkalamalı Etüv	Benchmark	Protein boyamasının inkübasyonun da kullanılmıştır.
Etüv	Nüve	Agar petriyelerinin inkübasyonun da kullanılmıştır.
Jel Görüntüleme Sistemi	Fusion Fx7	Agaroz da yürütülen DNA fragmanlarının görüntülenmesin de kullanılmıştır.
PZR Cihazı	Biorad	Klonlanacak DNA ürününün aplikasyonun da kullanılmıştır.
Spektrofotometre	Thermo Scientific	DNA miktar tayinin de kullanılmıştır.
Nanodrop	Maestro	Protein miktar tayinin de kullanılmıştır.
Dikey Jel Elektroforez Sistemi	Biorad	SDS-PAGE analizin de kullanılmıştır.
Otomatik Pipetler	Eppendorf,	Tüm moleküler çalışmalar da kullanılmıştır.
Distile Su Cihazı	Sartorius Stedim Biotech	Tüm moleküler çalışmalar da kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4°C)	Beko	Örnekler ve tamponların saklanması da kullanılmıştır.
pH metre	Hanna Instruments	Tampon pH ayarlaması da kullanılmıştır.
Vorteks	Stuart	Örneklerin homojenizasyonun da kullanılmıştır.
Florascope Mikroskop	Zeiss	Hücrelerin görüntülenmesin de kullanılmıştır.

Buz Makinesi	Scotsman	Soğuk ortamda gerçekleştirilen çalışmalar da kullanılmıştır.
Güç Kaynağı	Consort,	Elektroforez cihazının çalıştırılmasın da kullanılmıştır.
Hassas Tartı	Precisa	Kimyasalların miktar tayinin de kullanılmıştır.
Derin Dondurucu (-20°C)	Vestel	Örneklerin saklanması da kullanılmıştır.
Otoklav	Nüve	Laboratuvar malzemeleri sterilizasyonun da kullanılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj	Nüve	Protein izolasyonun da kullanılmıştır.
Memeli Hücre Kültürü Etüvü	Fisher Scientific	Hücre hattı büyütme aşamasın da kullanılmıştır.
Derin Dondurucu (-80°C)	Haier	Örneklerin saklanması da kullanılmıştır.

### 3.1.2. Ticari kitler

Ticari olarak satın alınan kitler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 2:** Kullanılan ticari kit listesi

<b>Kitler</b>	<b>Marka</b>	<b>Kullanım amacı</b>
Transform Aid Bacterial Transformation Kit	Thermo Fisher Scientific	Kompetent bakteriler içerisine plazmid transformasyonu için kullanıl.
Genejet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific	Plazmidlerin hücreden izolasyonu için kullanılmıştır.
Turbofect Transfection Reagents	Thermo fisher scientific	Hücre içerisine plazmid transfeksiyonu için kullanılmıştır.
PCRPurification Kit	Thermo Fisher Scientific	PZR ürününü izole etmek için kullanılmıştır.
Rapid DNA Ligation kit	Thermo Fisher Scientific	PZR ürünlerinin ligasyonu için kullanılmıştır.
İnsTAclone PCRcloning kit	Thermo Fisher Scientific	PZR ürünlerinin klonlamasın da kullanılmıştır.
Direct-zol™ RNA MiniPrep	Zymo research	Dokudan RNA izolasyonu için kullanılmıştır.
Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific	RNA dan cDNA transkripsiyonu için kullanılmıştır.
FastAP Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific	PZR ürünü defosforilasyonu için kullanılmıştır.



GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific	PZR ürününün agaroz jel içerisinde purifikasyonu için kullanılmıştır.
----------------------------	--------------------------	---

### 3.1.3. Kimyasallar

Tez aşamasında kullanılan kimyasallar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

**Tablo 3:** Kullanılan kimyasallar listesi

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Marka</b>	<b>Kullanım Amacı</b>
Absolute Etanol	Emsure	Moleküler çalışmalar da kullanılmıştır.
Agaroz	Biorad	Elektroforez jel yapımın da kullanılmıştır.
Ampisilin	Sigma	Antibiyotik
Aps (amonyumper sülfat)(%10)	Fisher Biossiure	SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır.
Asetikasit	Emsure	SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır.
Coomassie mavisi	Thermo Fisher Scientific	Protein boyama da kullanılmıştır.
DNA Yükleme Boyası	Biorad	DNA boyama da kullanılmıştır.
Edta (Etilendiamin tetraasetik asit)	Sigma	Protein izolasyonunda kullanılmıştır.
Etanol	Emsure	Benç ve malzeme temizliği de kullanılmıştır.
Etidyum bromür	Millipor	DNA etiketleme de kullanılmıştır.
FBS (Fetal Sığır Serum)	Gibco	Hücre besleyici serum olarak kullanılmıştır.
HCl (Hidroklorik Asit)	Emsure	SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır.
İmidazole	Santa Cruz	Protein parçalama da kullanılmıştır.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck	Protein parçalama da kullanılmıştır.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	Protein parçalama da kullanılmıştır.
LB (luria bertani)	Merck	Bakteri büyütme aşamasında kullanılmıştır.

Metanol	Emsure	Coomassie boyasını seyreltme de kullanılmıştır.
NaCl ( Sodyüm Klorür)	Merck	Protein parçalama da kullanılmıştır.
PBS (Fosfat tamponlu tuz)	Applichem	Hücre yıkama solüsyonu olarak kullanılmıştır.
PMSF (Fenil metan sülfonil florit)	Santa Cruz	Protein izolasyonun da kullanılmıştır.
Poliakrilamit (%40)	Fisher Bio Reagents	SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır.
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	Gibco	Protein izolasyonun da kullanılmıştır.
SDS	Fisher Bio Reagents	SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır.
Temed (% 10)	Sigma	SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır.
Tris	Fisher Bio Reagents	SDS-PAGE analizinde kullanılmıştır.
Triton X 100	Sigma	Protein parçalama aşamasında kullanılmıştır.
$\beta$ -Merkaptoetanol	Sigma	Protein SDS-PAGE yüklemesinde kullanılmıştır.

### 3.1.4. Enzimler

Tez aşamasında kullanılan enzimler;

**Taq DNA polimeraz:** DNA replikasyonu sırasında ortamdaki nükleotidleri kullanarak polimerizasyonu sağlayan enzimdir. Ticari olarak Bioline marka enzim satın alındı. PZR uygulamalarında kullanılmıştır.

**EcoR1:** Restriksiyon endonükleaz enzimidir. TA ve GFP-N1 vektörünün kesilmesinde kullanılmıştır.

**Sma1:** Restriksiyon endonükleaz enzimidir. pEGFP-N1 vektörünün kesilmesinde kullanılmıştır.

**BamH1:** Restriksiyon endonükleaz enzimidir. TA ve GFP-N1 vektörünün kesilmesinde kullanılmıştır.

**Ligasyon enzimleri:** Kesilen vektörlerin birbirlerine bağlanmasında kullanılmıştır.

### 3.1.5. Primerler

Klonlanacak olan PTH gen bölgesine uyumlu, PZR aşamasında gen bölgesine bağlanıp reaksiyonun devamını sağlayacak oligonükleotitler dizayn edilir ve ticari olarak sentezletirilmiştir.

Kullanılan primerler aşağıda verilmiştir:

**Tablo 4:**pTZR57R/T vektör-PTH geni için belirlenen primerlerin özellikleri

Oligo adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz sayısı	Tm (°C)
PTH-Forward (Sentromer DNA Teknolojileri)	ACATATGATACCTGCAAAAAGACATG	25	58.98
PTH-Reverse (Sentromer DNA Teknolojileri)	ATCTAGATTCATTTTCACTGGGATT	25	59.74

**Tablo 5:** pEGFP-N1 vektör- PTH geni için belirlenen primerlerin özellikleri

Oligo adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz sayısı	Tm (°C)
PTH-Forward (Sentromer DNA Teknolojileri)	ACATATGATACCTGCAAAAAGACATG	25	58.98
PTH-Reverse (Sentromer DNA Teknolojileri)	TTCTAGACTGGGATTTAGCTTTAGTT	26	57.60

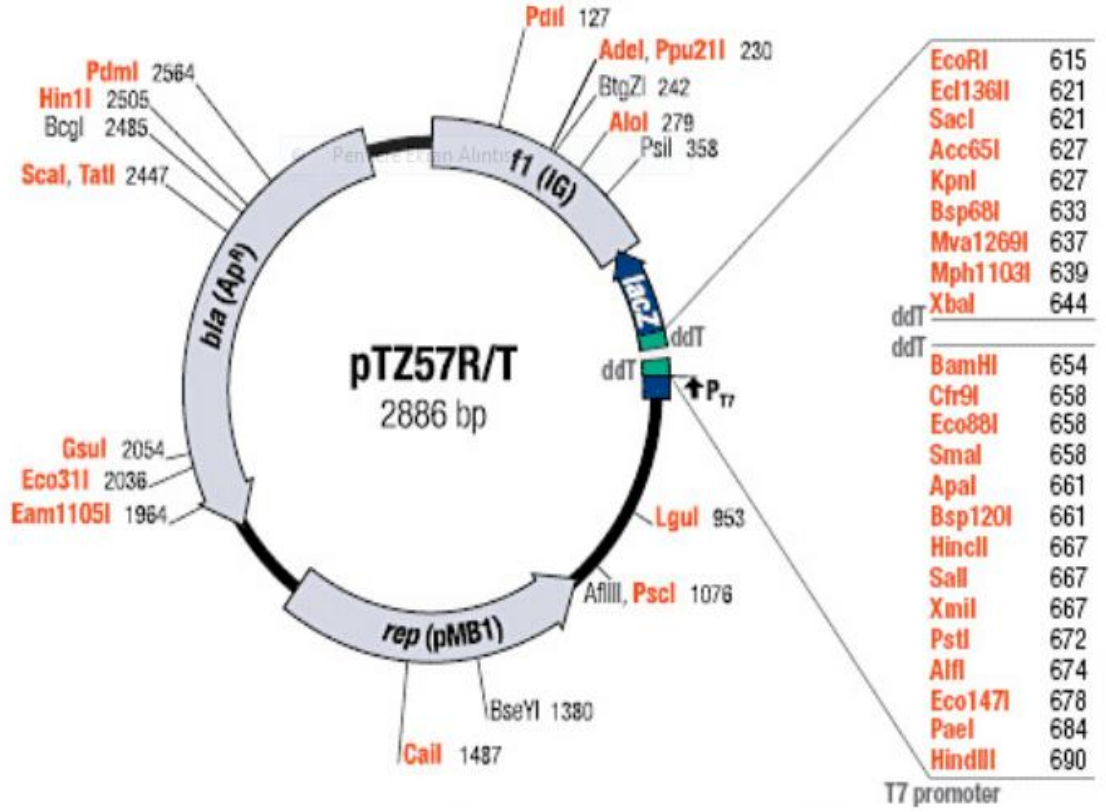
### 3.1.6. Mikroorganizma

- ***Escherichia Coli* One Shot® Mach1™-T1R kompetent hücreleri;**

*Escherichia coli* suşuna aittir ve rekombinant protein üretimi için kompetent hücre olarak kullanılmıştır.

### 3.1.7. Vektör sistemi

PTZ57R/T vektörü (Thermo scientific, #K1213) direk olarak PZR ürünlerinin klonlanmasında kullanılmıştır. TA klonlama yöntemi için PZR ürününün sonuna fazladan Adenin bazı eklenerek klonlanmıştır. Vektör haritası Şekil 9.da belirtilmiştir.

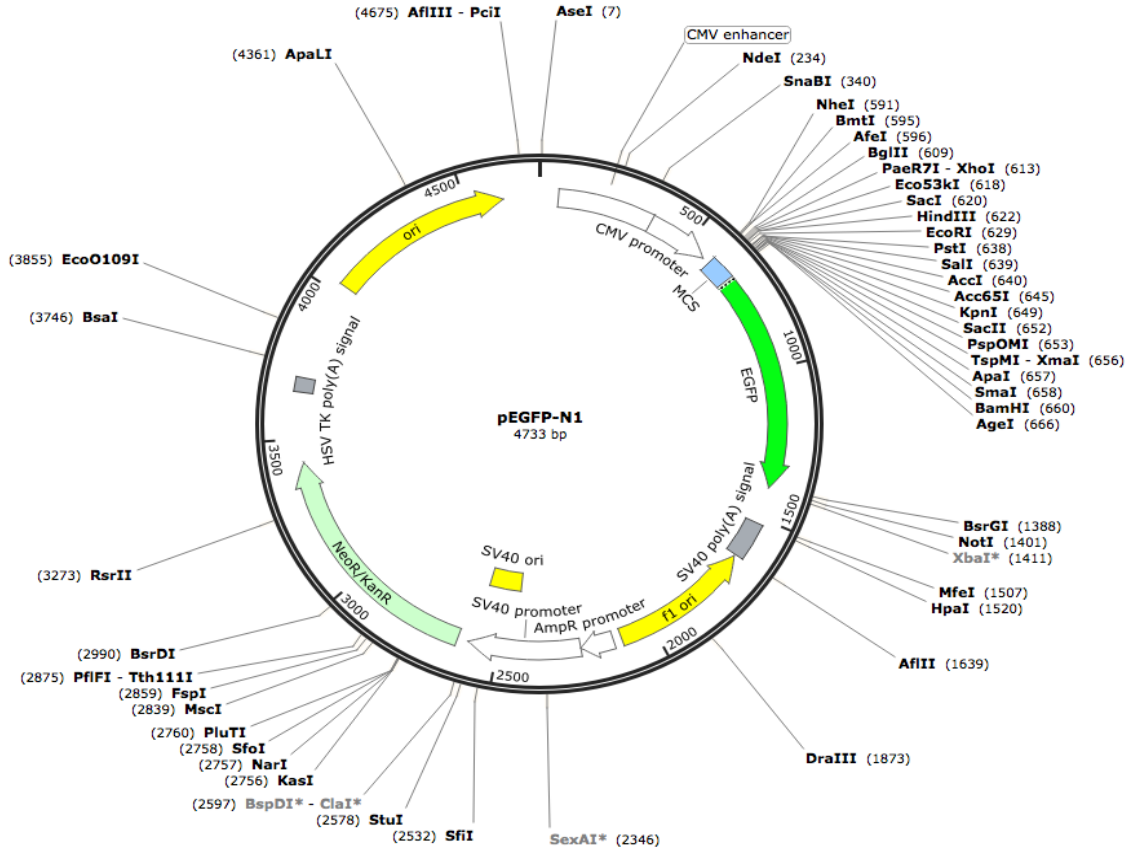


Şekil 9: pTZ57R/T vektör haritası

Tablo 6: pTZ57R/T vektör sisteminin özellikleri

pTZ57R/T Vektörün Özelliği	pTZ57R/T Vektörün Fonksiyonu	pTZ57R/T Vektörün Baz Pozisyonu
rep (pMB1)	Replikasyondan sorumlu baz	1122-1736
Başlatma pozisyonu		1136 (±1)
bla (ApR)	β-lactamaz - ampisilin resistans geni	1896-2756
LacZ α-peptide	Mavi/beyaz rekombinant klonların ayırım taraması	449-739
Multiple cloning site (MCS)	Haritalama, tarama ve ekzisyon klonlanmış insert	615-695
Cloning site	Ek ile ligasyon için 3'-ddT kuyruklu DNA uçları	650-651
T7 promoter	<i>Escherichia coli</i> suşların da IPTG ile indüklenerek T7 RNA polimerazın üretilmesini sağlar.	697-716

- pEGFP-N1 vektörü



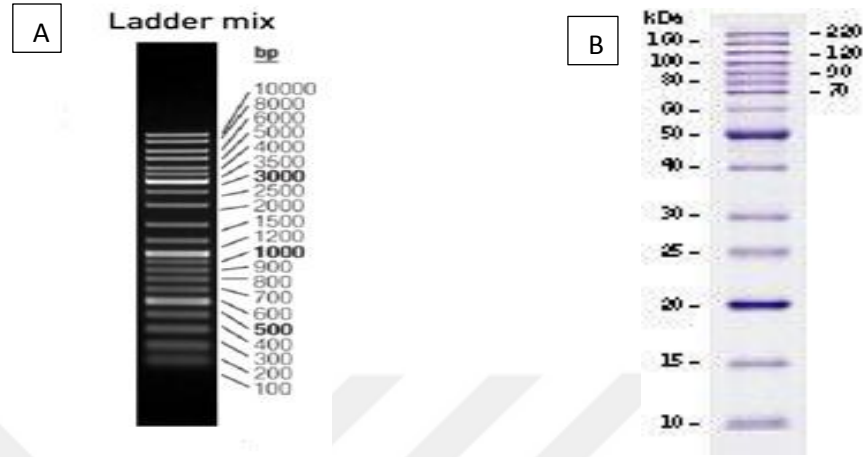
Şekil 10 : pEGFP-N1 vektör haritası

Tablo 7: pEGFP-N1 vektör özellikleri

pEGFP-N1 vektörün Özellikleri	pEGFP-N1 vektörün Fonksiyon	pEGFP-N1 vektörün Baz pozisyonu
Plazmid türü	Memeli ekspresyonu	-
Promotor	CMV	1-589
Başlatma noktası	Transkripsiyon	583
Boyut	-	4700 kb
Bakteriyel direnç	Ampisilin	2166-2171, 2189-2194
pUC plazmid	Replikasyon (origin of replication)	4008-4651

### 3.1.8. DNA ve protein markerleri

Agaroz jel elektroforezin de, “Page Ruler 1kb Gene Ruler DNA ladder” ve Protein elektroforezin de ise “PageRuler Protein Ladder” kullanılmıştır. “Thermo Fisher Scientific (İstanbul)” markasından satın alınmıştır.



Resim 1: A: 1 kb Gene Ruler-DNA Ladder

B: 10 bp Benchmark protein ladder

### 3.1.9. Tampon ve solüsyonlar

#### SDS-PAGE için gerekli tamponlar

- **1 Molar (M) Tris pH 8,8 (1 litre (l))**

181,65 g Tris base 800 ml distile su içerisinde çözdürülür ve daha sonra pH değeri 1 milimolar (mM) HCl ile 8,8'e ayarlanır. Distile su ile 1 l'ye tamamlanır.

- **1 M Tris pH 6,8 (1 l)**

61 g tris base 700 ml içinde çözülür ve 1mM HCl kullanılarak pH değeri 6,8'e ayarlanır. Son hacim olarak 1 l'ye tamamlanır.

- **10X Tris Glycine running buffer (4 l)**

121,1 g Tris base 3 l içerisinde çözülür ve üzerine 576 g glisin eklenir. 200 ml %20'lik SDS eklendikten sonra distile su ile 4 l'ye tamamlanır.

- **5X Sample buffer (100 ml)**

1 ml 0,2 M Tris pH (6,8) üzerine 3 ml %10'luk SDS eklenir. Daha sonra 2 ml %20 gliserol eklendikten sonra %0,005 oranında 0,5 ml ve 10 mM bromophenol blue ile karıştırılıp 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır. Son olarak 30 µl 10 mM β- merkaptotanol eklenir.

- **Destain solüsyonu (500 ml)**

50 ml asetik asit ve 200 ml metanol karıştırılır. Daha sonra 250 ml distile su ile toplam 500 ml'ye tamamlanır.

- **%10 SDS (100 ml)**

10 g toz SDS 80 ml distile su içerisinde çözündürülür ve solüsyon 100 ml'ye tamamlanır.

- **Coomassie blue solüsyonu (500 ml)**

0,5 gr Coomassie R250, 50 ml asetik asit, 200 ml metanol ve 250 ml distile su ile toplam 500 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

- **APS solüsyonu (2 ml)**

20 mg ammonyum peroksi disülfat alınıp 2 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlanır.

- **Etidyum bromür (10 ml)**

10 ml olacak şekilde 500 mikrolitre ( $\mu$ l)'lik hacimlerde 10  $\mu$ l etidyum bromür eklenir ve distile suda çözündürülerek stok solüsyon olarak hazırlanır. Stok solüsyon daha sonraki kullanımlar için 4°C'de muhafaza edilir. Agaroz jel elektroforezi sırasında son hacimde 1  $\mu$ g/ml olacak şekilde kullanılır.

### **Protein izolasyonu için gerekli tamponlar**

- **Protein lizis solüsyonu (pH 7,8)**

0,3 ml 1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,7 ml 1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2,3 g 400 mM NaCl, 0,75 g 100 mM KCl, 10 ml %10 Glycerol, 0,5 ml %0,5 Triton X-100 ve 0,068 g 10 mM İmidazole eklenir. Protein lizis tamponu için malzemeler son hacim 100 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır.

- **P.I.C.(Protease İnhibitor Cocktail) solüsyonu**

Aprotinin, Bestatin, E-64, Leupeptin ve Pepstatin A maddeleri içerir. Serin, sistein, aspartik proteazlar ve aminopeptidazların inhibasyonunu sağlayan DMSO formundaki inhibasyon solüsyonudur. Protein izolasyonu sırasında lizis buffer ile birlikte kullanılır.

- **PBS (Phospahte Buffered Saline) (pH 7,2)**

Hücre kültürü aplikasyonlarında kullanılan dengeli tuz solüsyonudur. Potasyum fosfat monobazik, NaCl ve sodyum fosfat dibazik içerir. Hücrelerin yıkanma aşamasında kullanılır.

### **Agaroz jel elektroforez için gerekli tamponlar**

- **10X TAE (Tris Aceticacid Edta) tamponu (1 l)**

48,4 g Tris base, 11,4 ml Soğuk asetik asit ve 3,7 g EDTA eklenir. 1 l distile su ile tamamlanıp pH değeri 8,4 ayarlanır.

- **%1 Agaroz jel ( 100 ml)**

1 g agaroz, 100 ml TAE solüsyonu içerisinde çözündürülür ve 1 µl etidyum bromür eklenir.

- **6X Loading tamponu**

10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bromofenol mavisi, 0,03% ksilen siyanol FF, 60% gliserol ve 60 mM EDTA içeren DNA yükleme boyasıdır. Elektroforez aşamasında jel kuyularına DNA ile birlikte yüklenir.

### **PZR tamponları;**

- **10X PZR tampon**

PZR ürünlerinin oluşumunda, ortamdaki enzimlerin çalışabileceği optimum konsantrasyonu sağlar. 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl ve 50 mM magnezyum klorid içerir. PZR sırasında kullanılır.

### **Transformasyon ve büyütme medyumları**

- **SOC medyum**

*E. coli*'nin bakteriyel hücre transformasyonu sırasında, transformasyonun verimini artırmak amaçlı kullanılmıştır. Kompozisyonunda; 2% tripton, 0.5% maya ekstraktı, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> ve 20 mM glikoz içermektedir.



- **1X LB-sıvı medyum (500 ml)**

10 g Triptofan, 5 g Maya Ekstraktı ve 5 g NaCl( sodyüm klorür) içerir. 500 ml LB medyum için malzemeler eklenip 121 °C'de 20 dk. otoklav yapılır ve daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilir.

- **LB-Ampisilin agar**

10 g Triptofan, 5 g Maya ekstraktı, 5 g NaCl ( sodyum klorür), 15 g Agar ve 100 µl Ampisilin 1 l medyum için, 500 ml içerisinde çözündürülüp 1 l'ye tamamlanır. Medyum 121 °C'de 20 dk.. otoklav yapıldıktan sonra ılımaya bırakılır ve en son aşamada ampisilin antibiyotiği eklenir. Steril petri kaplara döküldükten sonra +4 °C'de muhafaza edilir.

**Ampisilin stok solüsyonu**

100 mg/ml ampisilin distile su içerisinde çözündürülür ve 1,5 ml'lik miktarlara ayrılarak +4°C'de muhafaza edilir.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. PTH gen eldesi

Bezmialem Vakıf Üniversitesi etik kuruldan alınan 71306642-050.01.04 nolu izin ile total paratiroidi cerrahi operasyon geçirecek gönüllü hastalardan operasyon sırasında alınan hiperplazik dokudan mRNA izolasyonu yapılmıştır. PTH gen dizilimi için gerekli kalıp DNA, paratiroid dokusundan izole edilen mRNA'lardan elde edilmiştir.

#### • *Dokudan RNA izolasyonu*

Dokudan RNA izolasyon işlemi yapılmadan önce elde edilecek RNA'nın ortamdaki nükleaz enzimleri tarafından zarar görmemesi için kullanılacak olan tüm cihazlar, araç gereç ve ortam hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile sterilizasyon işlemi yapılmıştır. RNA izolasyonu için "Zymo research direkt-zol™ miniprep kit" kullanılmıştır. İzolasyon aşamasına geçmeden önce doku tartımı yapılmıştır. RNA izolasyon aşamaları aşağıdaki gibidir.

- 20 mg doku tartılır ve üzerine 600 µl eklenen TRI reagent® eklenir. Homojenizasyon seramik boncuk kullanılarak homojenizatör ile parçalanır.
- 14.000 rpm (dakikadaki devir sayısı), +4 °C'de 5 dk. santrifüj edilir.
- Liziz edilen ve TRI reagent® içeren örnekler santrifüj sonrası süpernatant farklı steril ependorflara alındıktan sonra 1:1 oranında etanol (%95-100) ile karıştırılıp vorteks yapılır.
- Karışım kitten çıkan Zymo-Spin™ IIC Column kolonlarına transfer edilir ve karışım 12000 rpm, +4 C°, 1 dk. santrifüj edilir.
- Tüm kolonlara 75 µl DNA digestion buffer ve 5 µl DNaz eklenir ve 15 dk. buz üstünde inkübasyona bırakılır.
- 400 µl Direct-zol™ RNA PreWash kolon içerisine eklenir ve 12000 rpm, +4 C° de ve 1 dk. santrifüj edilir. Alt sıvı atılarak bu basamak iki defa tekrarlanır ve her santrifüj sonrası kolon Rnaz'dan arındırılmış tüp içerisine transfer edilir.
- 700 µl RNA Wash Buffer kolona eklenir ve 12000 rpm, +4 C° de ve 1 dk. santrifüj edilir. Kolon Rnaz'dan arındırılmış tüp içerisine transfer edilir.

- RNA'yı ayrıştırmak için 50 µl Dnaz / Rnaz'dan arındırılmış su kolonlara eklenir ve 2 dk. buz üstünde inkübasyona bırakılır.
- Kolon membranına hapsolan RNA'yı elde etmek için 14.000 rpm, +4 °C'de, 2 dk. santrifüj edilir.
- Spektrofotometre de RNA miktar tayini ve saflığı ölçüldükten sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanır.

### *cDNA eldesi*

Tek zincirli bir gen bölgesi olan mRNA, çift zincirli cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA transkripsiyonu için “Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” kullanılmıştır. Kit malzemeleri buz üzerinde çalışarak hazırlanmıştır.

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
10X revers transkripsiyon tamponu	2,0 µl
25X dNTP karışımı (100 mM)	0,8 µl
10X RT Random primerler	2,0 µl
MultiScribe™ Revers transkriptaz	1,0 µl
RNaz inhibitörü	1,0 µl
Nükleaz-free H <sub>2</sub> O	3,2 µl
<b>Toplam reaksiyon hacmi</b>	<b>10 µl</b>

Her bir kuyuya 2X revers transkripsiyon karışımından 10 µl ve üzerlerine 10 µl mRNA örnekleri pipetlenerek eklenir. Kuyular kapatılarak santrifüj edilip, PZR cihazına konulur.

**Tablo 8:** Revers transkriptaz PZR adımları

<b>Ayarlar</b>	<b>1.Adım</b>	<b>2.Adım</b>	<b>3.Adım</b>	<b>4.Adım</b>
Isı	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dk..	120 dk..	5 dk..	∞

### 3.2.2. Primer tasarlama

Gen ekspresyonunu belirleyebilmek için PZR aşamasında kullanılacak bölgeye özgü primer bioinformatik bilgisayar programlarında tasarlanıp, daha sonra ticari olarak satın alınmıştır.

PTH (ürün baz sayısı : 462 bp) genomik dizisi,

```
ATGATACCTGCAAAAAGACATGGCTAAAAGTTATGATTGTCATGTTGGCAATTTGTTTTCTAACAAAATC
GGATGGGAAATCTGTTAAGTAAGTACTGTTTTGCCCTTGGAAATGGATTTTTTATGTTGACTTTATCAT
TTCGAAGTGGGGAGCTAATGGGAAGTGGCCCTCTCTGTTTCTTCTTCCCAGGAAGAGATCTGTGAG
TGAAATACAGCTTATGCATAACCTGGGAAAACATCTGAACTCGATGGAGAGAGTAGAATGGCTGCGTA
AGAAGCTGCAGGATGTGCACAATTTTGTGGCCCTTGGAGCTCCTCTAGCTCCCAGAGATGCTGGTTCC
CAGAGGCCCGAAAAAAGGAAGACAATGTCTTGGTTGAGAGCCATGAAAAAAGTCTTGGAGAGGCAGA
CAAAGCTGATGTGAATGTATTAATAACTAAAGCTAAATCCCAGTGAAAATGAATcTAGATA
```

PTH gen dizisi için tasarlanan Primerler ;

<b>PTH- forward</b>	ACATATGATACCTGCAAAAAGACATG
<b>PTH-reverse</b>	ATCTAGATTCATTTTCACTGGGATT

### 3.2.3. İzole edilen PTH geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

Kalite ve miktarı belirlenen cDNA kalıp olarak kullanılarak spesifik genomik bölgenin çok sayıda kopyasının elde edilmesi yöntemi olan PZR ile çoğaltılmıştır.

PZR işlemi için aşağıdaki tabloda verilen PZR bileşenleri belirtilen miktarda PZR tüpleri içerisine konularak hazırlanmıştır. PZR tampon için “Thermo Scientific Phusion Flash high fidelity PZR master mix” kullanılmıştır.

**Tablo 9:** PZR’de kullanılan madde miktarları

<b>Madde</b>	<b>Miktar</b>
Master mix	12,5 µl
Primer F	1,25 µl
Primer R	1,25 µl
DNA	2 µl
dH <sub>2</sub> O	6 µl
<b>Toplam</b>	<b>25 µl</b>

PZR bileşenleri dikkatli bir şekilde oda sıcaklığında PZR tüpleri içerisine eklenip, tüm bileşenlerin karışması için spin yapılmıştır. PZR bileşenleri aşağıda verilen program kullanılarak yapılmıştır.

**Tablo 10:** PZR için kullanılacak olan sıcaklık ve döngü bilgileri

<b>Basamaklar</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Zaman</b>	<b>Döngü sayısı</b>
İlk denatürasyonu	98 °C	10 sn.	<b>33 döngü</b>
Denatürasyon	95 °C	3 sn.	
Bağlanma	60 °C	5 sn.	
Uzama	72 °C	10 sn.	
Final uzama	72 °C	1 dk.	

İzole edilen DNA'nın miktarı ve varlığı UV spektrofotometresinde 260 nanometre (nm)'de ve DNA'nın saflığı 280 nm/ 260 nm absorbansına bölünmesi ile belirlenmiştir. PZR ürünü doğru uzunluktaki genomik alanın çoğaltılıp çoğaltılmadığını belirlemek üzere agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Yukarıda verilen programda yürütülen PZR çalışmasının çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için 100 ml % 1'lik jel hazırlanmıştır. 1 kb DNA standartı ile beraber jele yüklenir ve 30 dk. 80 voltta yürütülen elektroforezden sonra U.V. ışık altında DNA bantları görüntülenip kaydedilmiştir.

### **3.2.4. Vektör dizaynı**

#### ***TA vektöre klonlama***

PZR işleminden sonra elde edilen gen kopyaları geni taşıyacak olan vektör içerisine ligasyon tekniği kullanılarak yerleştirilmiştir. “İnsTA klon kiti” kullanılarak pTZ57R/T vektörüne TA klonlama metodu ile klonlanmıştır.

#### ***Ligasyon***

Vektör ve geni bağlayacak enzim olan DNA ligaz enzimi tampon çözeltiyle birlikte tüpe eklenmiştir. PZR ürünü ile vektör miktarı için en verimli olacak olan ölçü konsantrasyon ile doğru orantılı olarak 1:1 oranında eklenmiştir. Ligasyon karışımı hazırlandıktan sonra PZR cihazında inkübasyona bırakılmıştır.

**Tablo 11:**Ligasyon için kullanılan madde miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
İnsert 1 (PTH)	2 µl
İnsert 2 (vektör pTZ57R/T )	3 µl
Ligasyon tamponu	6 µl
Enzim (T4 DNA ligaz)	1 µl
dH <sub>2</sub> O ( nükleaz-free)	18 µl
<b>Toplam</b>	<b>30 µl</b>

Kısa süreli vorteks yapılır ve miks 22 °C’de bir sa. inkübasyona bırakılmıştır. Bir sonraki transformasyon işlemi için +4 °C’de saklanmıştır.

### **3.2.5. Kompetent hücre hazırlama?**

Transformasyon için gerekli hücreler luria bertani (LB) agar; %1 triptofan, %0,5 maya ekstraktı, %0.5 sodyum klorid, %1.5 agar içerisinde büyütülür. Bir gece büyümeye bırakılan hücreler içerisinde tek bir koloni alınarak 25 ml LB sıvı besiyeri içerisinde 37 °C’ de ve 4-6 sa. süreyle inkübasyona bırakılır. Hücreler daha sonra 10 dk. buz üzerinde bekletilip 4100 rpm’de, +4 °C ve 10 dk. santrifuj edilir. Hücre peleti 10 ml kalsiyum klorür (CaCl) içerisinde çözündürülür ve 10 dk. buz üzerinde inkübe edilir. İnkübasyondan sonra 4100 rpm’de 10 dk. santrifuj edilir. Hücre peleti 5 ml soğuk 1 M CaCl ve %15 gliserol tüp içerisine eklenerek -80 °C’de depolanmıştır.

### **3.2.6. E. coli hücresine vektör transformasyonu**

Rekombinant üretilen plazmidlerin çoğaltılması için hazırlanan kompetent hücre ve One Shot® Mach1™-T1R *E.coli* hücreleri içerisine aktarımı gerçekleştirilmiştir. Transformasyon öncesi aşağıda verilen hazırlık aşamaları yapılır;

- Bir gün öncesinde ampisilin içeren agar petripleri hazırlanır; bunun için 6,4 gr LB agar, 200 ml distile su ve 200 µl ampisilin antibiyotik eklenir. Petriplerde agarın donması ile birlikte ters çevrilerek +4 °C’de bırakılır.
- Hazırlanan petripler 37 °C de bir süre ılımaya bırakılır.
- Transformasyonda kullanılacak hücreler 100 µl alınarak 1,5 ml S.O.C. medyum içerisine alınır ve 37 °C’de çalkalayıcı etüvde 2 sa. inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 14.000 rpm’de 1 dk. santrifuj edilerek hücre peleti transformasyon için buza bırakılır.
- Transformasyon için bakteriyel transformasyon kiti kullanılmıştır; Kitin hazırlık aşamasında ise kit içerisinde bulunan A ve B solüsyonlarının her birinden 250 µl alınarak T solüsyonu oluşturulur ve ependorf tüp içerisinde buzda bekletilir.

Hazırlık işlemi tamamlandıktan sonra transformasyon işlemine geçilmiştir. Transformasyon için “InsTAclone PCR Cloning kit” içerisindeki transformasyon malzemeleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- Kompetent peleti üzerine T solüsyonu 200 µl eklenir ve buzda 5 dk. bekletilir.
- Buzdan alınan solüsyon 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası süpernatant atılır ve kalan T solüsyonundan 300 µl hücre peletinin üzerine eklenip 5 dk. buz da bekletilir.
- Süre sonunda örnekler buzdan alınıp ligasyon sonunda elde edilen vektörden 5 µl ve T solüsyonundan 70 µl alınarak nazıkçe karıştırılıp 5 dk. süre ile buzda bekletilir.

Buzda bekletilen plazmid solüsyonu transformasyon için agar petrilerin üzerine yayılarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılır. Ekim yapılırken dezenfekte edilmiş tezgahta tüm tüpler ve ekim özesi ateşe tutularak steril edildikten sonra işlemler gerçekleştirilir.

#### ***Pozitif transformasyon analizi***

Pozitif koloni ve istenilen vektörün elde edilmesi için bazı analiz yöntemleri ile doğrulanması sağlanmıştır.

#### ***Antibiotik analizi***

Transformasyon aşamasından sonra ampisilin ile seçici besiyerine ekilen hücrelerden plazmid transfer edilen hücreler, ampisiline dirençli gen bölgesi içerdiğinden dolayı ortamda çoğalırken, plazmid içermeyen hücreler ampisiline karşı direnç gösteremediğinden yaşayamazlar. Petri üzerinde büyüyen ve diğer kolonilerden ayrı olarak bulunan koloniler seçilerek bir sonraki aşama olan dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### ***Plazmid izolasyonu***

Doğruluğu analiz edilmiş vektör içeren kolonileri büyütme işlemi LB besiyeri ve 1/100 oranda ampisilin eklenerek çalkalamalı etüv içerisinde 37 °C'de 3 sa. süreyle inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Çoğalan hücrelerden plazmid izolasyonu yapılmıştır.

- 3 sa. süreyle çoğaltılan hücreleri alınıp 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılır.
- Elde edilen pelet üzerine 250 µl resüspension çözeltisi ilave ettikten sonra homojen oluncaya kadar pipetleme yapılır.

- Süspanse edilen karışım üzerine 250 µl lizis tamponu eklendikten sonra karışım viskoz ve açık bir hale gelinceye kadar, tüpler 6-8 defa hafifçe alt üst edilerek karıştırılıp, oda ısısında birkaç dk. inkübe edilir.
- Solüsyon üzerine 350µl nötrolizasyon tamponu eklenir. Tüp 6-8 kez alt üst edilerek karıştırılır. Karışım 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek, plazmid DNA dışındaki genomik DNA, protein ve lipidlerin dibe çökmesi sağlanır.
- Süpernatant dikkatlice alınarak Genejet spin kolon tüp içerisine eklenir ve 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildikten sonra dipte kalan sıvı dökülür.
- Kolon üzerine 500µl yıkama solüsyonu eklenip, 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildikten sonra dipte kalan sıvı dökülür ve bu aşama iki kez tekrarlanır. Bu sayede kolondaki tuzlar ve kalıntılar ortamdan uzaklaştırılmış olur.
- Herhangi bir şey ekmeden kolon 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilerek etanol ortamdan uzaklaştırılır.
- Kolon yeni bir tüpe konularak üzerine 50 µl elüsyon tamponu eklenip, 14.000 rpm'de 1 dk. santrifüj edildikten sonra dipte kalan plazmidi içeren sıvı toplanarak, -20°C'de kullanıncaya kadar depolanır.
- Plazmidlerin 10µl'si % 1 agarose jelde görüntülenip, nanodrop'ta OD (optical density) ölçümü yapılır.

### 3.2.7. Dizi analizi

Dizi analizi PZR ürününün vektöre klonlanması aşamalarında baz dizisinde olabilecek mutasyonlar ve eksiklikleri belirlemede kullanılmıştır. TA klonlama ile elde ettiğimiz klonlama vektörü pTZ57R/T dizi analizine gönderilmiş ve PZR ürünümüzün doğru yerleşip yerleşmediği kontrol edilmiştir. Analiz sonucuna göre bir sonraki işleme geçilmiştir.

### 3.2.8. Restriksiyon kesimi

pTZ57R/T vektörü restriksiyon enzimlerinden BamH1 ve EcoR1 ile kesimi yapılmıştır. Reaksiyon miksi pipetelenerek 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.



**Tablo 12:** Restriksiyon kesim işlemi madde miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
Reaksiyon Tamponu	15 µl
BamH1	2,5 µl
EcoR1	2,5 µl
Vektör	15 µl
dH <sub>2</sub> O	25 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>50 µl</b>

### **3.2.9. Restriksiyon ürünü**

#### ***Agaroz jel yükleme***

Restriksiyon kesim işlemine tabi tutulan pTZR57R/T vektörü ve kesilen PTH gen parçası %1 agaroz jel ve TAE tamponu içerisinde elektroforetik olarak analiz edilmiştir. Stok solüsyondan alınan 100 ml TAE tamponu ile 1 g agaroz mikrodalga içerisinde homojen hale gelene kadar ısıtılır ve daha sonra soğumaya bırakılır. Elektroforez plakanın içerisine dökülmeden önce 1 µl etidyum bromür eklenir ve oda sıcaklığında polimerize olmaya bırakılır. 15 µl örnek ve 2 µl yükleme boyası ile beraber eklenerek kuyulara pipetlenir. Elektroforez güç kaynağı 30 dk. süreyle 100 V ayarlanır. Yürütülen jel UV ışık altında 260 nm’de görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

#### ***Jel ekstraksiyon işlemi***

Ligasyon işlemi sonucunda, ürünü 15 µl agaroz jele yüklenerek, istenilen ürününün oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir. Bunun için %1’lik agaroz jel 100 V, 30 dk. yürütülmüş ve UV ışık altında görüntüleme cihazında kontrol edilmiştir.

Kesilen vektörün ve PTH ürününün doğruluğu DNA marker ile kontrol edilmiştir. Elde edilen restriksiyon ürününün U.V. ışık altında yer tayini yapıldıktan sonra ekstraksiyon aşamasına geçilmiştir. PTH geni jel içerisinden “GeneJET Gel Extraction Kit” ile izole edilmiştir.

- Jel belirlenen bölgeden steril bistüri ile kesilir ve ağırlığı ölçülerek 1,5 ml’lik ependorf tüpe aktarılır.

- Jel miktarıyla 1:1 oranında üzerine binding buffer eklenir.
- Jel karışımını 60 °C’de 10 dk. ısı bloğu üzerinde jel eriyene kadar inkübe edilir.
- Karışım GeneJET pürifikasyon kolon içerisine aktarılır ve 1dk. santrifüj edilir.
- Tekrar 100 µl binding buffer eklenerek 1dk. santrifüj edilir.
- 700 µl wash buffer kolon içerisine eklenip 1dk. santrifüj edildikten sonra sıvı kısmı atılarak boş olarak 1dk. daha santrifüj edilir.
- 50 µl elüsyon tamponu eklenerek santrifüj edilir. Elde edilen DNA ürününün saflığı ve miktarı spektrofotometrede ölçülür.

### 3.2.10. Sub-klonlama - pEGFP-N1 vektör

#### *pEGFP-N1 vektör restriksiyon kesimi*

Restriksiyon enzimleri olan EcoR1 ve BamH1 ile vektör kesilerek PTH gen ile ligasyonu yapılmıştır.

**Tablo 13:** Vektör pEGFP-N1 restriksiyon kesim işlemi madde miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
Vektör ( pEGFP-N1)	12 µl
Enzim EcoR1	1 µl
Enzim BamH1	1 µl
dH <sub>2</sub> O	11 µl
Restriksiyon enzim Tamponu	5 µl
<b>Toplam</b>	<b>25 µl</b>

#### *Vektör defosforilasyonu*

Vektörün kendi üzerine kapanmaması (self-ligation) için 5’ ucudaki fosfor gruplarını kaldırarak defosforile işlemine tabi tutulmuştur. Defosforilasyon için Alkalin Fosfataz (AP) enzimi içeren “Thermo fisher scientific” markasından alınan “Rapid DNA Ligation Kit” kullanılmıştır.

**Tablo 14:** Vektör pEGFP-N1 defosforilasyon işlemi madde miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
Enzim (AP)	4 µl
Tampon	6 µl
DNA	20 µl
dH <sub>2</sub> O	20 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>50 µl</b>

Vektör defosforile işlemi için PZR cihazı içerisine yerleştirilip 37 °C’de 10 dk. ve sonrasında enzimin inaktivasyonu için 72 °C’de 10 dk. bekletilmiştir.

### ***pEGFP-N1 vektör ligasyonu***

Defosforile edilen plazmid DNA ve kesilen PTH geni ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon işlemi vektör-insert molar oranı 1:3 olarak “Rapid DNA ligation kit” ile yapılmıştır. Ligasyon karışımından 5 µl alınarak bir sonraki transformasyon işlemine geçilmiştir.

**Tablo 15:** Vektör pEGFP-N1 ligasyon işlemi madde miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
Vektör DNA (pEGFP-N19)	2 µl
İnsert DNA (PTH)	6 µl
Rapid DNA ligasyon tamponu	4 µl
T4 DNA ligaz	1 µl
dH <sub>2</sub> O	7 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>20 µl</b>

### **3.2.11. Klonlama**

Ligasyon işlemi ile oluşturulan rekombinant plazmid vektör pEGFP-N1+PTH çoğaltılması için kompetent hücrelere plazmid aktarımı gereklidir. Transformasyon kompetent *Escherichia coli* suşun içerisine transforme edilerek gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.12. pEGFP-N1 vektörle GFP sekresyon sinyali ile klonlama**

PZR işleminden sonra elde edilen gen kopyaları geni taşıyacak olan vektör içerisine klonlanmıştır. Elde edilen PTH geninin içerisinde var olan ve transkripsiyonu sonlandıran stop kodon bir sonraki aşamada çıkartılarak GFP sinyali ile gözlemlenebilecek hücre transfeksiyonu oluşturulmuştur. Bu işlem için yeni bir reverse primer dizayn edilmiştir.

Pirmer dizaynı ile PZR işlemi tekrarlanmıştır. İnsert PTH ve vektör pEGFP-N1 ligasyonu yapılmıştır.

**Tablo 16:** vektör pEGFP-N1 restriksiyon işlemi madde miktarları

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar</b>
Reaksiyon tamponu	18 µl
SmaI	2 µl
Vektör (pEGFP-N1)	10 µl
dH <sub>2</sub> O	20 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>50 µl</b>

Bir sonraki işlem, vektör ligasyonu “Rapid DNA Ligation Kit” kullanılarak yapılmıştır. Kompetent *E.coli* hücresine vektör transformasyonu “TransformAid Bacterial Transformation Kit” ile yapılmıştır. Transforme edilen hücrelerin bir gecelik inkübasyonundan sonra plazmid izolasyonu “Genejet Plazmid Miniprep Kit” kullanılarak yapılmıştır.

### **3.2.13. Transfeksiyon**

Transfeksiyon için “Turbofect Transfection Reagent kit” ile hücreler muamele edilmiştir. Öncelikle transfeksiyon edilecek hücreler hazırlanır. Bu işlem için HeLa (Henrietta Lacks, Serviks Kanser Hücreleri) ve AGS (ATCC® CRL-1739™, İnsan Gastrik Adenokarsinom Hücreleri) kullanılmıştır. Hücreler hücre kültürü ortamında slide chamber üzerinde 2 gün büyümeye bırakılır. Büyüme aşamasında fenol kırmızısı ve glutamin içeren 20 ml RPMI medyum ve 1 ml FBS kullanılmıştır.

Transfeksiyon için kit hazırlık aşamaları;

- Toplam kuyucuk sayısı kadar preparat hazırlanır.
- Her bir kuyu için; 4 µl transfeksiyon ayıracı, 8 µl DNA ve 188 µl RPMI medyumun eklendiği solüsyon 20 dk. oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Transfeksiyonun gerçekleşmesi için hücrelerin üzerindeki FBS’li medyum alınarak 2 ml serumsuz medyum eklenir.
- Her bir kuyuya medyum üzerine 200 µl ayırac+DNA karışım eklenir.
- Bir gece boyunca 37 °C’de etüvde inkübasyona bırakılır.

Bir sonraki gün hücrelerin üzerindeki serumsuz ayıracın olduğu medyum alınır ve ayıracın kalıntılarını temizlemek için PBS ile yıkanır. Elde edilen medyumdan PTH analizi yapılmıştır. Hücrelerin üzerine tekrardan serumlu medyum eklenerek PTH

üretimine devam edip protein ölçümü yapılabilmesi için bir gece daha etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

### ***Transfeksiyon tayini***

Transfeksiyondan sonra elde edilen ve daha sonra serumlu medyum ile tekrar inkübasyona bırakılan hücrelerin transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için ilk olarak PTH ölçümü yapılmıştır. Daha sonra hücrelerin florasan mikroskopunda görüntüleri alınmıştır. EGFP-PTH geni kodlayan plazmidi alan hücrelerin U.V. ışığı altında görüntüsü alınmıştır.

### ***PTH ölçümü***

Elde edilen rekombinant PTH'nin ölçümü "ARCHITECT Intact PTH kiti" kullanılarak yapılmıştır. Protein miktarı nanodrop ile belirlenmiştir.

### **3.2.14. Protein izolasyonu**

Hücreler -20 dereceden alınarak buz üzerinde çözülmeye bırakılır. PBS ile toplanan hücreler üzerindeki tamponun ayrımı için 14.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir. Supernatant atılır. İzolasyon için 400 µl RIPA-LB, 5 µl PIC ve 1 µl PMSF eklenerek 20 dk. buz üzerinde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon aşamasından sonra 14.000 rpm ve +4°C'de 15 dk. santrifüj edilir. Hücre peleti içerisinde tüm hücre yağları, enzimleri ve nükleik asitler bulunmaktadır. Supernatant kısmı ise istediğimiz proteinlerden oluşmaktadır. Supernatant alınarak protein ölçümü yapılmıştır.

### ***Protein konsantrasyon tayini***

Protein konsantrasyonu nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. 1 µl distile su ile blank ölçümü yapıldıktan sonra, 1 µl protein örneklerinin protein değeri ölçülmüştür. N1-PT ve GFP-PT olmak üzere 280 nm de ölçümleri yapılmıştır.

### **3.2.15. SDS-PAGE**

PTH proteinin varlığını tespit etmek için SDS-PAGE işlemi yapılmıştır. Elektroforez işlemi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- Elektroforez camları kullanılmadan önce su ve alkol kullanılarak iyice temizlenir, sonra camlar arasında 0,75mm olacak şekilde sistem oluşturulur.

- Ayırma jeli hazırlanır, jeli hazırlarken en son aşamada TEMED ve APS eklendikten sonra camlara dökülür.
- Ayırma jeli döküldükten sonra polimerleşmenin sağlanması ve jelin üst kısmının düz bir şekil alması ve baloncuk oluşmaması için dikkatlice eklenir. 15-20 dk. arasında oda ısısında jel polimerleşmesi beklenir.
- Yığılma jeli, ayırma jelinin üzerine döküldükten sonra taraklar yerleştirilir. 15-20 dk. arasında polimerleşmesi sağlanır.
- Jel hazırlandıktan sonra; Protein örneği 1:1 oranında yükleme tamponu ile karıştırılıp 5 dk. 95°C'de inkübe edilir. SDS oda ısısında eklendiğinde protein örnekleri proteazlar tarafından parçalanır, bunu önlemek için buz üzerinde tutulur, proteazları inhibe etmek için ise kaynatma işlemi gerçekleştirilir. Kaynama işleminden sonra örnekler buz üzerinde 5 dk. soğutulur.
- Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra kuyular SDS elektroforez yürütme tamponu ile yıkanır.
- Jeller tanka yerleştirildikten sonra iç kısım 1X SDS elektroforez yürütme tamponu ile doldurulur. Örnekler kuyulara aynı miktar ve yoğunlukta eklenir yoksa yan kuyucuklara yayılma olabilir. Kuyucuklara protein örneklerinden 20µl yüklenir.
- Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için belirteç olarak, "Benchmark protein ladder markörü (Thermo)" kullanılmıştır.
- Jeller 100 V akımda yaklaşık 2 sa. yürütülür.
- Camlar açılıp jel çıkarıldıktan sonra boyama işlemine geçilir. Hazırlanan jelin üst kısmı daha düşük yoğunlukta olduğundan dolayı kopması daha kolaydır ve dikkatlice camdan ayrılması sağlanır.
- Jel coomassie mavi boyada 40 dk. çalkalayıcıda inkübe edilir. Sonrasında fazla boyanın giderilmesi için jel yıkama çözeltisi eklenir.
- Bantlar belirginleşip fazla boya giderildikten sonra boya uzaklaştıran solüsyon değiştirilir ve bu şekilde bir gece boyunca jel şeffaf bir hal alana kadar inkübe edilir. Boyadan arınan jel görüntüsü alınmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile parathormon gen bölgesi eldesi

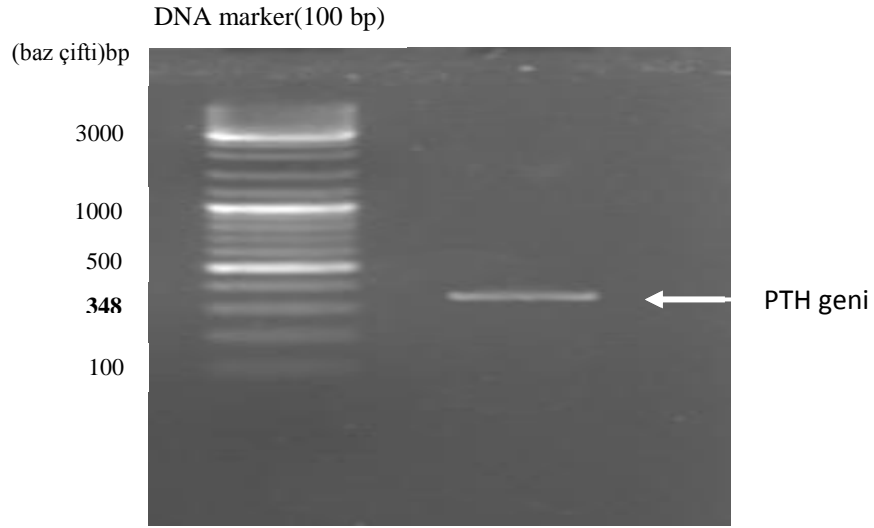
Bu çalışmada, parathormon gen bölgesinin ekspresyonu için, rekombinant parathormon geni taşıyan PEGFP-N1+PTH vektörü oluşturulmuştur. Elde edilmek istenen PTH geni hiperplazi hastasından doku nakli için alınan örnekten mRNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyon aşamasından sonra mRNA'dan cDNA elde edilmiştir. PTH geni primerleri dizayn edildikten sonra, revers transkriptaz PZR ile elde edilen cDNA ürününden PZR yapılmış ve analiz edilmiştir. İlk olarak gen pTZ57R/T çoğaltma vektörü içerisine eklenerek elde edilmiş ve daha sonraki aşamada ekspresyon vektörü olan pEGFP-N1 vektörü içerisine aktarılmıştır.

### 4.2. PZR ile çoğaltılan gen bölgesinin bulgusu

İzole edilen PTH gen bölgesi için tasarlanan primerler kullanılarak PZR işlemi yapılmıştır. PZR işleminde optimum ürün elde etmek için, en uygun Tm sıcaklığını yani primerlerin bağlanma ısısı belirlenerek optimum bağlanma sıcaklığında PZR işlemi yapılmıştır. PZR işlemi sonucunda 348 bp büyüklüğünde ürün elde edilmiştir.

PTH- Transkript 348 bp;

```
ATGATACCTGCAAAAAGACATGGCTAAAGTTATGATTGTCATGTTGGCAATTTGTTTTCTTACAAAATC
GGATGGGAAATCTGTTAAGAAGAGATCTGTGAGTGAAATACAGCTTATGCATAACCTGGGAAAACATC
TGAACCTCGATGGAGAGAGTAGAATGGCTGCGTAAGAAGCTGCAGGATGTGCACAATTTTGTGGCCCTT
GGAGCTCCTCTAGCTCCCAGAGATGCTGGTTCCCAGAGGCCCGAAAAAAGGAAGACAATGTCTTGGT
TGAGAGCCATGAAAAAAGTCTTGGAGAGGCAGACAAAGCTGATGTGAATGTATTAAGTAAAGCTAAAT
CCCAGTGA
```



**Resim 2:** PZR işleminden sonra elde edilen ve elektroforez analizi ile doğruluğu tayin edilen PTH gen ürününün UV görüntüsü

PZR programı kullanılarak elde edilen ürün, %1 lik agarose jelde yürütüldükten sonra görüntüleme cihazında UV görüntüsü alınmıştır.

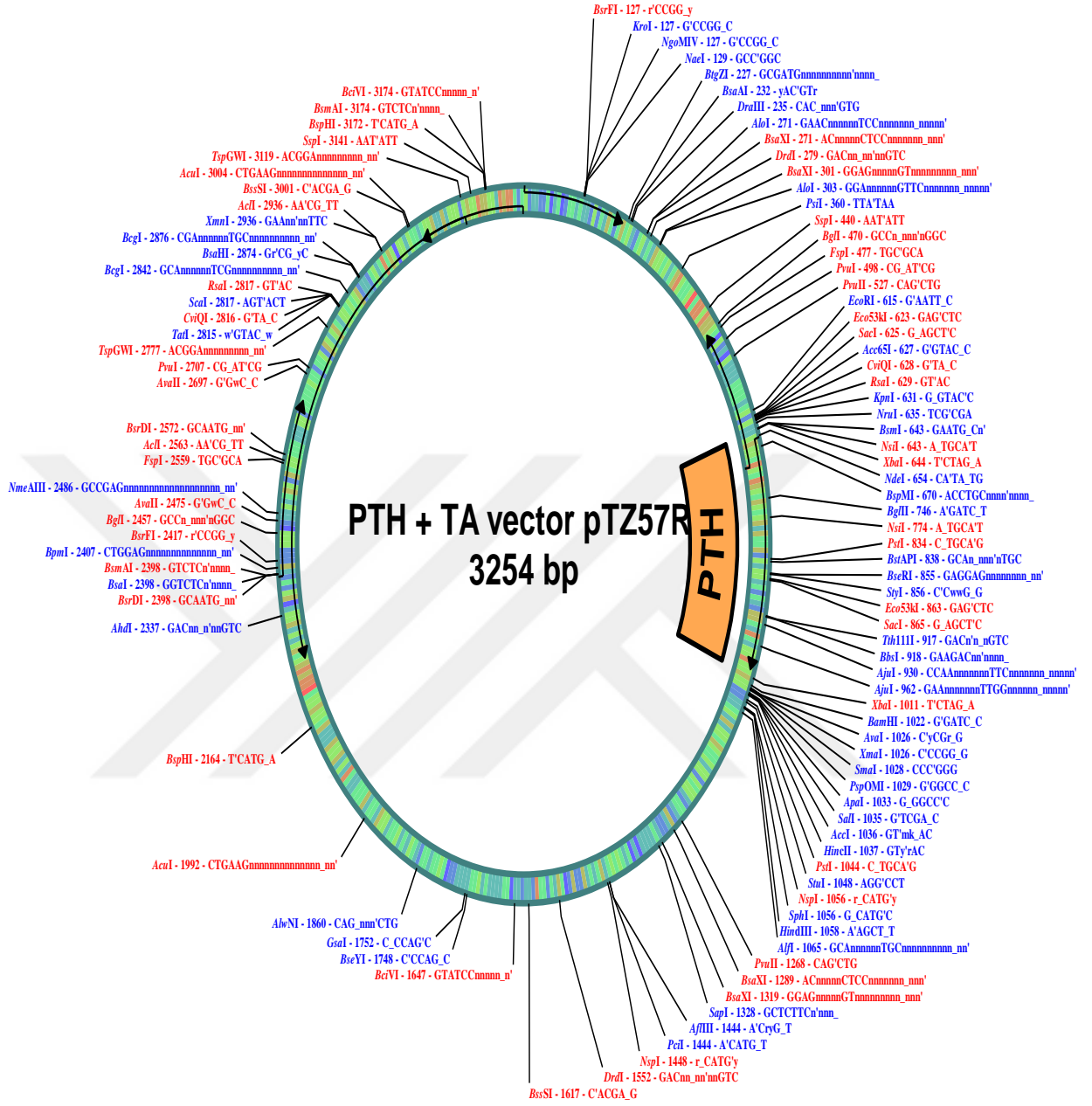
### 4.3. Vektör eldesi

PZR ile çoğaltılan gen bölgesi çoğaltma vektörüne aktarılmıştır. Bunun için pTZ57R/T vektörü kullanılmıştır. Bu vektöre PZR ile çoğaltılan gen bölgesi DNA Ligaz enzimi ile vektörde açık bulunan uçlara bağlayarak vektör hazırlanmıştır.

#### 4.3.1. Ligasyon bulgusu

PTH gen bölgesinin PZR işlemi esnasında, PZR programının uzama aşamasında ekzonükleaz aktivitesi olmayan taq polimeraz enzimi kullanılmıştır. Uç kısımlarına T (timin) nükleotidleri eklenerek lineer hale getirilmiş pTZ57R/T vektörüne, gen bölgesinin uç kısımlarına poli A (adenin) nükleotidleri eklenen PZR ürünü olan, PTH gen bölgesinin bağlanması sağlanır. Ligasyon işlemi sonrasında PZR ürünün, pTZ57R/T vektörüne yerleştiği ve sirküler bir yapıya dönüştüğü varsayılmıştır.





Şekil 11 : pTZ57R/T vektörüne PTH ligasyon sonucu

### 4.3.2. Dizi analizi bulgusu

İzole edilen plazmidlerin 50µl'si sekans analizi için kullanılmıştır. Sekans analizi gen aktarımı yapılan plazmide, genin doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği ve PZR işlemleri sırasında eklenen gen bölgesinde herhangi bir mutasyonun olup olmadığını test etmek amacıyla yapılmıştır. Sekans analizi ve doğrulaması ticari firma tarafından analiz edilir.

Sekans analizi yapılan bölgenin, PTH gen bölgesiyle % 95 oranında benzerlik gösterdiği, farklılık oluşturan kısmın ise plazmide ait bölgede bulunduğu tespit edilmiştir.

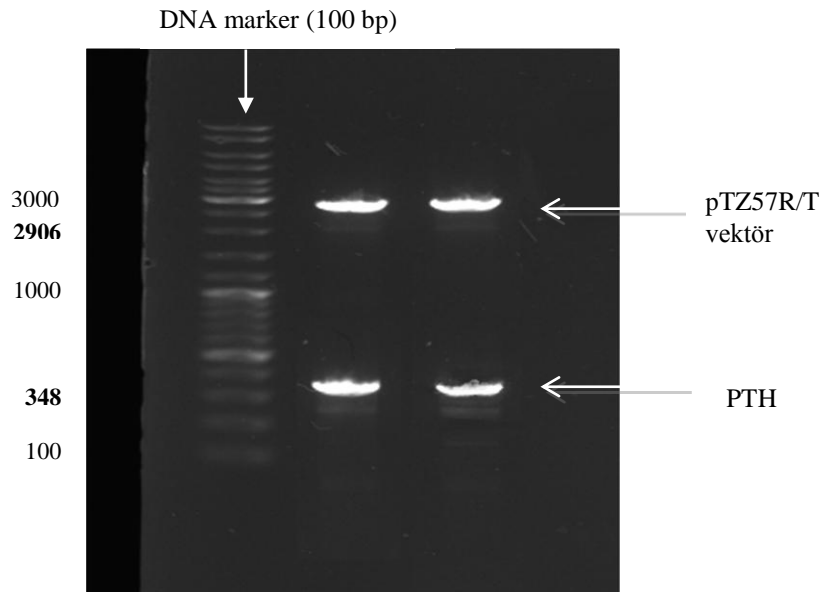
#### Dizi analizi- PTH-pTZ57R/T nükleik asit sekansı sonucu;3254 bp

```
66GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC
119GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGC
178CACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGAT
237TTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGCTTGGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGT
296GGGCCATCGCCCTGATAGACGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAA
355TAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTG
414ATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAA
473AAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTCCATTCGCCATTCAGG
532CTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGC
591GAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAC
650GACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGAT
709TacaatATGATACCTGCAAAAAGACATGGCTAAAGTTATGATTGTCATGTTGGCAATTTGT
768TTTCTTACAAAATCGGATGGGAAATCTGTTAAGAAGAGATCTGTGAGTGAAATACAGCT
827TATGCATAACCTGGGAAAACATCTGAACTCGATGGAGAGAGTAGAATGGCTGCGTAAGA
886AGCTGCAGGATGTGCACAATTTTGTTGCCCTTGGAGCTCCTCTAGCTCCCAGAGATGCT
945GGTTCCCAGAGGCCCGGAAAAAAGGAAGACAATGTCTTGGTTGAGAGCCATGAAAAAAG
1004TCTTGAGAGGCAGACAAAGCTGATGTGAATGTATTAACATAAAGCTAAATCCCAGTGA
1062AAATGAAtctAgatAATCGGATCCCGGGCCCGTCGACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGC
1120TTTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTG
1178TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
1236TAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG
1294CCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCG
1352CGGGGAGAGGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCT
1410GCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGG
1468TTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA
1526AGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCC
1584TGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTA
1642TAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCC
1700TGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCCTTTCTCA
1758TAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
1816GTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTG
1874AGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGAT
1932TAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC
```

1990GGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG  
2048GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTT  
2106TTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTG  
2164ATCTTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGG  
2222TCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTT  
2280TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC  
2338AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCC  
2396CCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAAT  
2454GATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCC  
2512GGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTA  
2570ATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGT  
2628TGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTTCAGC  
2686TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG  
2744TTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACT  
2802CATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTT  
2860TCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGA  
2918GTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAA  
2976AGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTG  
3034TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTA  
3092CTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG  
3150AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTTCAATATTATTGA  
3208AGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAA  
3254ATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT

#### 4.4. Ptzr57R/T restriksiyon analizi

PTH gen ve pTZ57R/T vektörü BamHI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesilen vektör ve gen agaroz jelde yürütülerek teyit edilmiştir. Jelde yürütülen PTH gen parçası jel ekstraksiyon kiti kullanılarak kesip alındıktan sonra saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir.



**Resim 3:** pTZ57R vektörü restriksiyon kesimi; marker: 100 bp DNA ladder

#### **4.5. pEGFP-N1 vektör ligasyonu ve klonlama bulgusu**

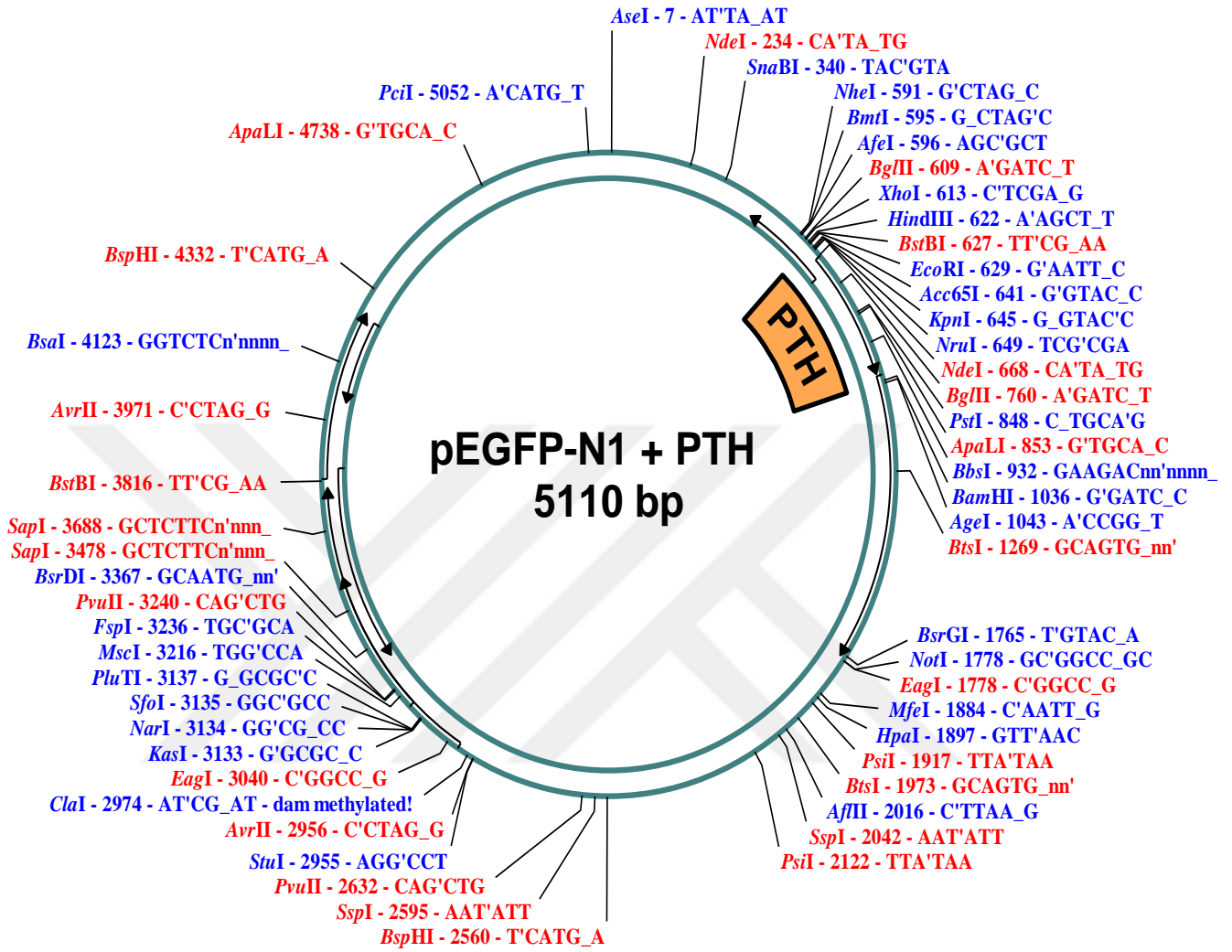
Kesilen PTH geni pEGFP-N1 vektör içerisine insert edilmiştir. PTH geni üzerinde tasarlanan stop kodona sahip primerler ile yalnızca PTH sentezleyen plazmid elde edilmiştir. Yeni primerler dizayn edilerek stop kodon kaldırılmış ve kontrol amaçlı GFP+PTH sentezleyen yeni plazmidler elde edilmiştir. Florasan mikroskop altında GFP kodlayan hücreler gözlemlenmiştir.

Klonlama stratejisinde oluşturduğumuz vektörün içerisindeki PTH geni BamH1 ve EcoRI kesim noktalarından kesilerek insert edilmiştir. PTH geni pEGFP-N1 içerisine standard klonlama metodları ile uygulanmıştır. PZR ürünleri ekspresyon vektörüne ligasyon metoduyla eklenip, ligasyon karışımı kompetent hücre içerisine insert edilmiştir.

#### **4.6. Plazmid eldesi**

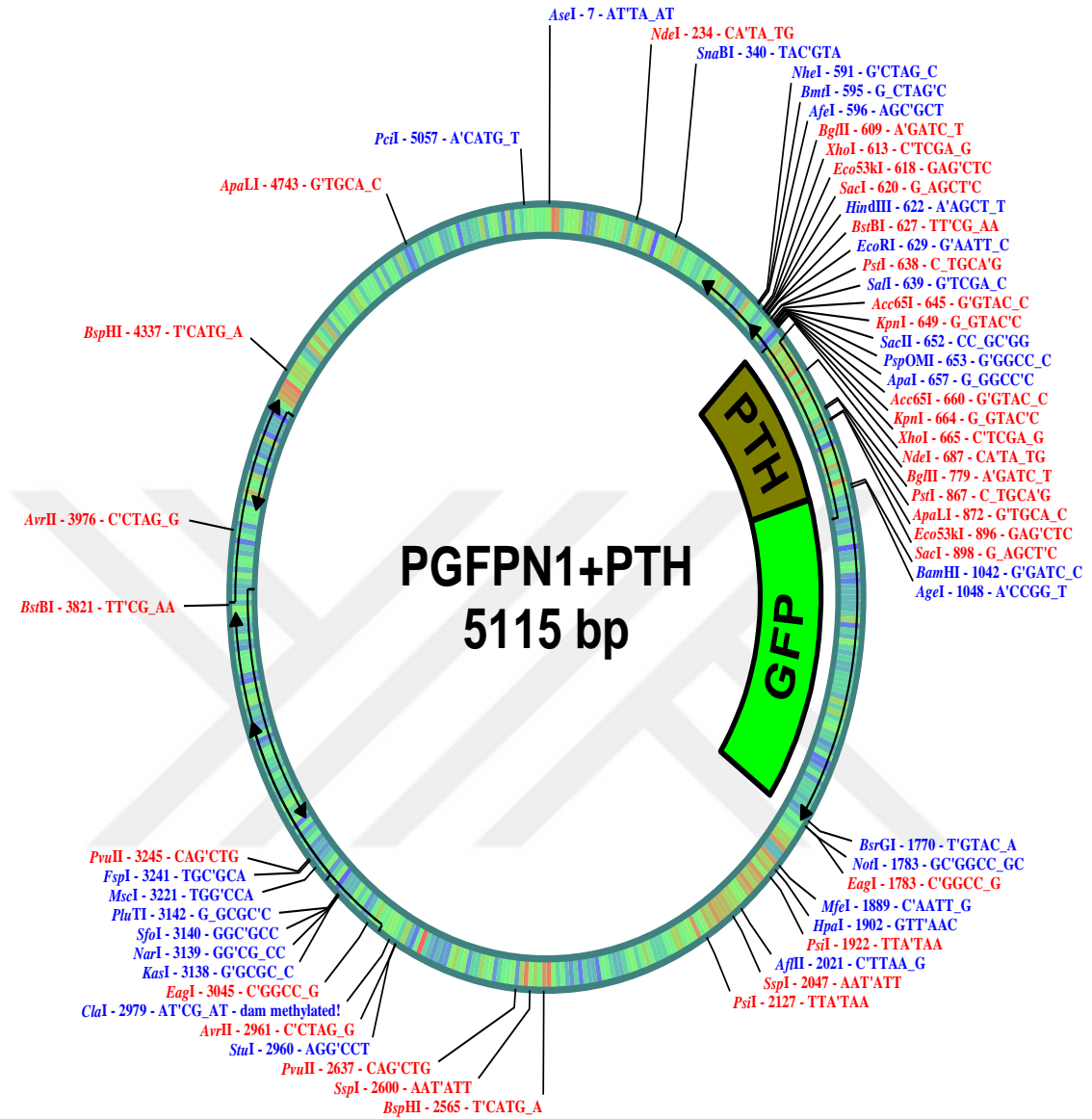
Bir sonraki klonlama sürecinde ilk adım istenilen rekombinant PTH geninin PZR ile amplifikasyonudur. Elimizdeki PTH gen PZR ürünü için yeni primerler dizayn edilerek sinyal sekresyonu olarak GFP-PTH transkripti elde edilmiştir. PZR ürünlerinin büyüklüğü 1 kbp DNA markerleri ile kıyaslanmıştır. Ürünler doğru boyut ve büyüklüğe sahiptir. Plazmid DNA'sı miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. DNA konsantrasyonu; pEGFP-NI+PTH: 330 ng/μl ve PTH+N1: 280 ng/μl plazmid elde edilmiştir.

#### 4.7. pEGFP-N1 vektörü



Şekil 12 : pEGFP-N1 vektörüne PTH gen bölgesi yerleştirilmiş vektör haritası

#### 4.8. GFP sinyali veren pEGFP-N1+PTH vektörü



Şekil 13 : pEGFP-N1+PTH vektör haritası

#### **4.9. Rekombinant PTH üretimi**

pEGFP-NI vektörüne PTH geninin doğru yerleştirildiği belirlenen plazmidlerin transfeksiyonu yapılmıştır. Hücre kültüründe elde edilen plazmidler transfeksiyon kiti ile AGS ve HeLa hücre hatlarına transfekte edilmiştir.

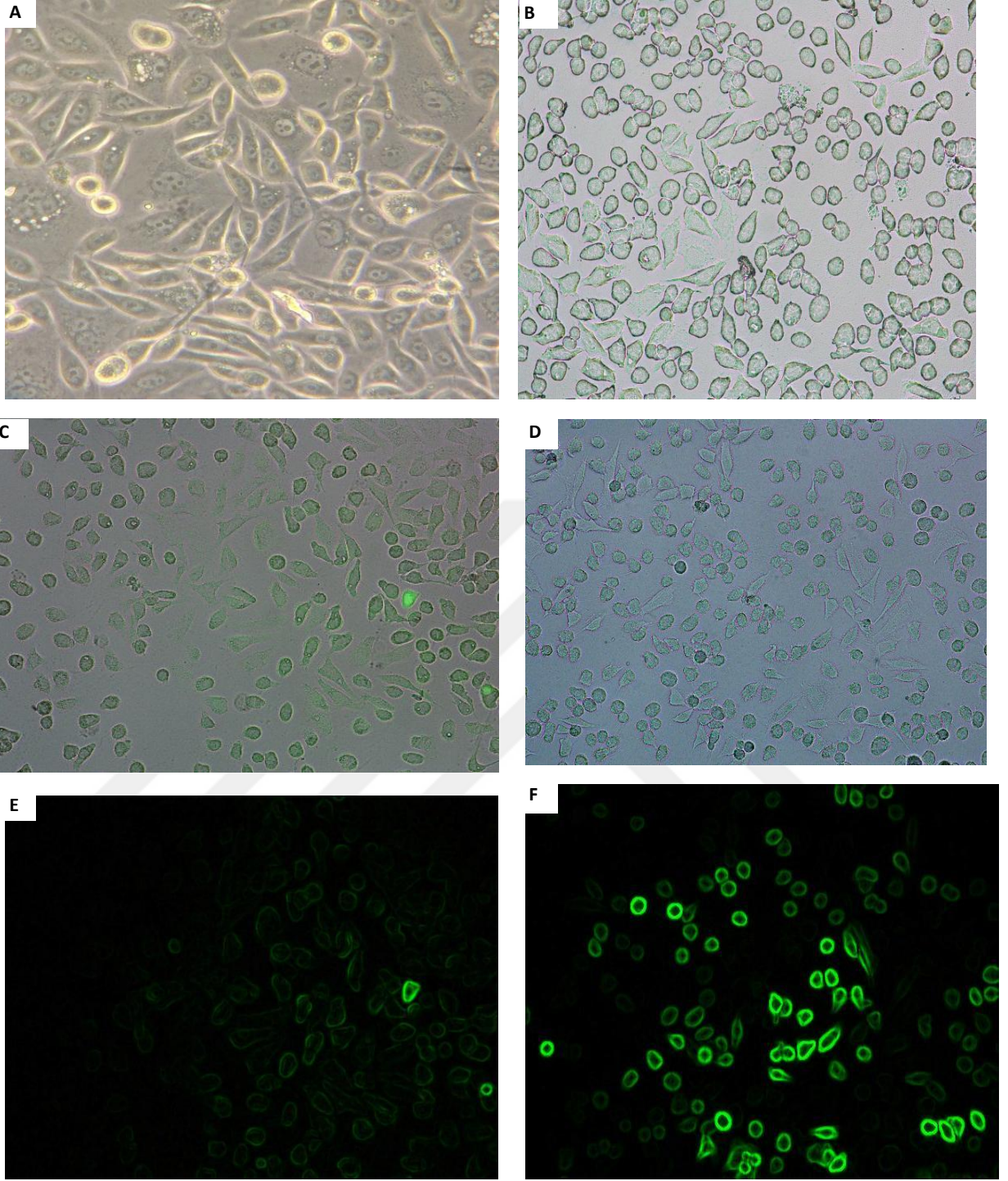
#### **4.10. Transfeksiyon ölçümü**

AGS ve HeLa hücre hatlarına transfeksiyon ajanı kullanılarak PTH geni içeren plazmidler hücre içerisine transfer edilmiştir. Her iki plazmidi içeren hücreler 16 sa.lık inkübasyondan sonra transfeksiyon reaktifi alınarak hücreler PBS ile yıkayıp serum ilavesi yapılmıştır. 24 sa.lık inkübasyondan sonra alınan serumlardan PTH ölçümü yapılmıştır. Her iki plazmidin transfekte olduğu AGS ve HeLa hücrelerindeki PTH seviyesi sırasıyla 1,2 pg/ml ve 1,4 pg/ml ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları transfeksiyonun başarılı olduğunu göstermektedir.

#### **4.11. Protein konsantrasyon ölçümü**

Transfekte hücrelerden protein izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen proteinler nanodrop cihazında protein konsantrasyon ölçümü yapılmıştır. PTH+N1: 10.587 mg/ml ve EGFP-N1+PTH: 13.841 mg/ml olarak ölçülmüştür. PTH geninin transfekte edildiği hücre hatlarının morfolojik görüntüsü mikroskoptan alınmıştır.

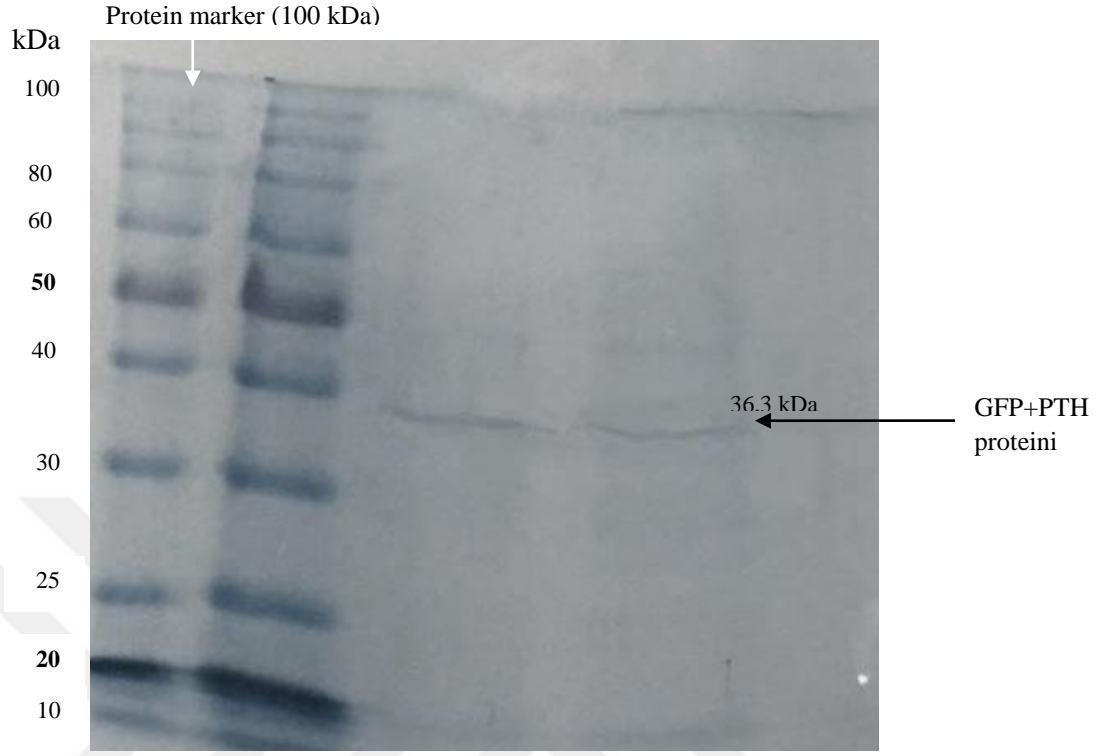




**Resim 4:** AGS ve HeLa hücre hattı morfolojik görüntüleri; A,C ve E AGS hücre hattı (40 X,10X,10X); B, D ve F HeLa hücre hattı görüntüleri (10X); E ve F; EGFP (Enhanced GFP) yeşil florasan protein sekresyon sinyali üreten proteinin, yeşil florasan ışık altındaki görüntüsüdür.



#### 4.12. SDS-PAGE analiz bulgusu



**Resim 5:** GFP+PTH proteinin SDS-PAGE görüntüsü (36,3 kDa) (Protein ladder: 100 kDa)

## 5.TARTIŞMA

Çalışmamızda hipoparatiroidizm tedavisine ışık tutacak çalışmaların deneysel olarak hücre kültürü, hayvan modellemesi, hormon reseptör ilişkilerinde ve hücrede gen aktarımının transfer yöntemlerinin geliştirmesinde kullanılmak üzere rhPTH (1-84) oluşturup daha sonraki çalışmalara basamak olmasını sağlamaktır.

Fizyolojik olarak PTH,  $Ca^{+2}$  homeostazisinde endokrin düzenleyici anahtar rolü oynamasının yanında,  $Ca^{+2}$  metabolizmasını, osteoblastik ve renal tübüler hücrelerdeki reseptörleri aktive ederek kemik ve mineral metabolizmasını  $Ca^{+2}$ , P,  $Mg^{+2}$  ve PTH'nin arasındaki dengeyle gerçekleştirir [86, 87]. Paratiroidektomi sonrası gelişen veya idiopatik hipoparatiroidi sonrası mineral kemik rahatsızlığı, hipokalsemi, hiperkalsiru, hiperfosfatemi ve  $Mg^{+2}$  düşüklüğü genel olarak kemik ve böbrek rahatsızlıkları ile gelişen başlıca hastalıklardır [88, 89]. Paratiroidektominin yanısıra özellikle total tiroidektomi operasyonlarından sonra %10 oranında geçici hipoparatiroidizm görülebilmektedir. Yapılan araştırmalarda ve Sağlık Bakanlığının 2013 verilerine göre ülkemizde yılda 100 bin civarında tiroid cerrahisi uygulanmaktadır. Tiroid ameliyatlarının büyük çoğunluğu hipoparatiroidizmle ilişkisiz olmasına rağmen operasyonu geçiren vakaların %1-3'ünde komplikasyonlar ortaya çıkmakla birlikte, bildirilen kalıcı hipoparatiroidizm olasılığı %0,5-6,6 arasında değişmektedir. Bu verilere göre yıllık insidans 100.000'de 18,6 olduğu yapılan araştırmada saptanmıştır. Bu da her yıl aynı oranda kalıcı hipoparatiroidi teşhisi konan hasta oranını artırması ve yaygınlığı itibari ile bu alanda yapılacak tüm çalışmalar da büyük önem arz etmektedir [90, 91].

Parathormon çok sayıda çalışmanın ana konusudur. PTH'nin ve PTH etkili anabolik ajan analoglarının kemik modellemesinde önemli fonksiyonu vardır [92, 93]. Paratiroid hormonun osteoblast proliferasyonu, osteoblastik apoptozu önleme, osteoklast inhibisyonu gibi anabolik etkisi mevcuttur. Moleküler modülasyon süreciyle bağlantılı olan bu oluşumlar üzerindeki rolü tam olarak belirlenememesinin yanında, bu alanda yapılan araştırmalar halen devam etmektedir [94-97].

Öncelikle PTH'nin biyolojik aktivitesinin sorumlu moleküler mekanizmayı anlamak ve biyoaktivitesi ile ilgili yapısal özelliklerinin bilinmesi gerekir. Bu amaçla,

proteinin konformasyonel çalışmaları yayınlanmaktadır [98, 99]. Parathormonun aa dizilimi ile yapılan çalışmaların bir çoğunda N-terminal ve C-terminal ayrı ayrı olarak çalışılmaktadır [100]. Çalışmalarda ağırlıklı olarak biyolojik aktivitenin gerçekleştiği düşünüldüğü N terminal üzerinde durulmaktadır [99, 101]. Parathormonun yapı-fonksiyon çalışmaları sonucunda, genel olarak bozulmamış olan tüm biyolojik aktivitelerinin, N-terminal dizilimindeki ilk 34 aa'lik kısımdan sorumlu olduğu ispat edilmiş ve tüm hormonun bütününe benzer kemik aktivitesini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. [98, 102, 103]. Bu araştırmalar sonrasında birçok klinik çalışmalarda N-terminal sekansının 34 aa'lik peptid kullanılarak tedavi yöntemleri uygulanmıştır [100, 104]. Ticari anlamda ilk olarak 2002 yılında kullanılmaya başlanan Teriparatid, [94] rekombinant insan PTH (1-34) peptidi olup, kemik kırılmaları için yüksek riskli olan veya daha önceki osteoporoz tedavilerine yanıt vermemiş, bunları tolere edemeyen idiyopatik ve hipogonadal postmenopozal kadınlar için FDA onayı alınarak tedavilerde kullanılmaktadır [75, 105-107].

Yapılan hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, paratiroid hormonun C-terminal kısmının da kemikte önemli biyolojik etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Bringhurst ve arkadaşları [108], C-PTH parçalarının osteosit apoptozunu artırabileceğini ve osteoblastların daha önceki hücre kültürü çalışmalarında, PTH'nin en azından son 30 veya daha fazla amino asidi içeren C-terminal fragmanlarının alkalik fosfataz üretimini uyaracağını ve diğer osteoblast aktiviteye sahip olabileceğini de göstermişlerdir. PTH'nin C terminal kısmı için ayrı bir reseptörün mevcut olduğuna dair çalışmalar da bulunmaktadır [109].

Parathormonun (1-34) anabolik ajan olarak kullanımı ilk olarak osteoporoz tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [103, 110]. Parathormonun hücresel mekanizması, osteoporoz tedavisinde kullanılan ve kemik formasyonunu stabilize eden antirezorptif ajanlardan farklı olarak kemik yapımını artırır [92, 111-113]. Bu sebeple kemik üzerine etkisi farklı kullanımlarda anabolik ve katabolik olduğundan, rPTH'nin kullanımı ve uygulanmasının şekli yüksek önem arz etmektedir. Uygulama şekline bağlı olarak kemik formasyonunu ve rezorbsiyonunu artırabilir veya azaltabilir [114]. Parathormon, aralıklı enjeksiyonla verildiğinde, iskelet üzerinde güçlü anabolik etkiler sergiler [79, 89]. Günlük enjeksiyonlar serum PTH seviyesinde aralıklı yükselmeye, osteoblastik uyarılmaya ve kemik yoğunluğunda

artışa, kortikal ve trabeküler yüzeylerde yeni kemik oluşumuna, dolayısıyla kemik kütlesi ve gücünde artışa yol açtığı kanıtlanmıştır [94, 115, 116]. Fakat devamlı infüzyonlar serum PTH seviyesini sürekli yükselterek ciddi kemik rezorbsiyonuna ve kemik mineral yoğunluğunda azalmaya neden olduğu da gösterilmektedir.

Araştırmaları devam eden PTH (1-34)'nin, 40 yaş üzeri kadınlarda gelişen nonosseöz kanserlerdeki oran ve kanser insidansındaki belirgin fark anlamlı olarak görülmüştür. Yapılan çalışmalar da PTH/PTHrP reseptörünün kemik ve böbreklere ek olarak, birçok normal doku, epitelyal ve endotel kaynaklı, meme ve böbrek kanseri de dahil olmak üzere bazı katı tümörlerde bulunmuştur. Kullanılan ticari PTH'nin halen risk grubunda varolması PTH kullanımını sınırlandırmıştır. Şu ana kadar insanda osteosarkomaya sebep olduğu ile ilgili hiçbir çalışma yoktur [81, 117]. Ancak uygulama sırasında teorik olarak kemik dışı kanser indüksiyonu olasılığına dair araştırmalar ve kanser öyküsü olan hastalarda yapılan klinik gözlemler sonucu riski yükselttiği belirlenmiştir [118].

Hayvanlarda kanserojenlik çalışmaları göz önüne alındığında, osteosarkom için artmış risk altında olabilecek hastalarda teriparatidin ve muhtemelen diğer PTH peptidlerinin kullanılmasını önlemek için bazı uyarılar yapılmıştır. PTH tedavisinin kanser indükleme yönünde endişelendiren mevcut kanıtların varlığından dolayı, son beş yıl içinde kanser öyküsü olan hastalarda kullanımı kısıtlandırılmıştır [82].

Çalışmamızda deneysel amaçlı kullanımını amaçladığımız rekombinat N-terminal PTH (1-84), PTH (1-34)'ün aksine doğal hormondur ve bu nedenle bu hastalıkta tedavide daha güvenilir sonuç verme olasılığı fazladır [75, 93, 119]. PTH'nin (1-84) etkin yarılanma ömrü PTH (1-34) den daha uzundur. Hipoparatiroidizmli hastalarda hipokalsemi tedavisinde konvansiyonel terapide kalsiyuma ve vitamin D kullanımı gereklidir. PTH (1-84) analogunun, günde bir kez etkili dozla kullanılabilen ilk çalışmalara göre, oral kalsiyum ve D vitamini ihtiyacını belirgin olarak azaltırken serum  $Ca^{+2}$  değerinde daha az dalgalanmayla dengede tuttuğunu göstermiştir. Parathormonun (1-84) lük kısmı hipoparatiroidi için bir terapi olarak kullanımını, teriparatid ile karşılaştırıldığında, farklı biyolojik etkilere sahip olabileceği akla yatkındır. Yapılan çift kör çalışmada, günde ortalama 100 g rhPTH (1-84) veya plasebo ile 6 ay boyunca karşılaştırılmış ve kısa sürede, normal  $Ca^{+2}$  seviyelerini korumak için aktif D vitamini ve  $Ca^{+2}$  takviyelerine olan ihtiyaç, ilacı alan grupta sırasıyla %50 ve %11 oranında düşmüştür. Daha uzun süren çalışmalarda, rhPTH (1-84) replasman tedavisi bu avantajları göstermeye devam etmiştir. Cusano ve

arkadaşlarının çalışmalarında, oral  $Ca^{+2}$  ve vitamin D gereksinimlerinin azaltılması anlamlı bulunmuş ve sürdürülen serum  $Ca^{+2}$  düzeyleri ile birlikte beş yıllık bir süre boyunca muhafaza edilmiştir [120, 121].

Amerikan gıda ve ilaç kurumu tarafından Ocak 2015'te Natpara-rhPTH (1-84), ABD'de onaylanan insan PTH'sinin ilk biyomühendislik kopyası oldu. Fakat Natpara'nın CaSR mutasyonları sonucu hipoparatiroidizm hastalarında ve akut post-cerrahi hipoparatiroidizmlili hastalarda çalışılmamış olması PTH (1-84) için gelecek dönemde daha detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Serum fosfat ve/veya kalsiyum fosfat ürününün kabul edilebilir aralıkta muhafaza edilebilmesi, geleneksel tedavinin optimizasyonuna rağmen, hiperkalsüri veya olumsuz bir idrar biyokimyasal taş risk profili nedeniyle böbrek komplikasyonları riskinin artabileceği, Hastada nefrokalsinoz, nefrolitiazis veya kronik böbrek hastalığı komplikasyonları varlığı, gastrointestinal sistem değişkeninden  $Ca^{+2}$  ve D vitamini emilimini etkileyecek inflamatuvar bağırsak hastalığı veya çölyak hastalığı, kalsiyum algılayan reseptörde gelişen mutasyonların varlığı gibi soruların, hipoparatiroidi de tedavi seçeneği haline gelebilmesi için, daha uzun vadeli araştırma sonuçlarının verilerine ihtiyaç vardır.  $Ca^{+2}$  metabolizmasının bozulmasına bağlı oluşan rahatsızlıkları araştırmak için moleküler ve genetik teknikler kullanılmaya devam edilerek, bu problemin yönetimi ile ilgili yeni bilgiler edinilmeye ve geliştirilmesine devam edilmektedir [122, 123].

Farmasötik ürünler, rekombinant DNA ile yapılan ilk biyoteknolojik ürünlerdir. Rekombinant üretilerek kullanılan biyofarmasötikler üzerindeki çalışmalar ve gelişmeler hızla devam etmektedir. Hipoparatiroidizm tedavisinde öngörülen ve FDA onaylı rekombinant peptidler, hastalığın sonuçlarını iyileştirmeye yönelik kullanılmaktadır. Kemik oluşumunu kemik emiliminden daha fazla teşvik eden ve serum  $Ca^{+2}$  seviyesini dengede tutmaya yönelik kullanılan anabolik maddeler, hipoparatiroidizm hastalar için ideal terapiler olmaya adaydır. Diğer PTH ve PTHrP analoglarının ileri tetkikleri gereklidir, zira mevcut tedavilerin bazı sorunlarının üstesinden gelebilecek alternatif anabolik iskelet ajanları gibi davranma potansiyeline sahiptirler.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz insandaki aktif formda olan rekombinant PTH, kemikler için de anabolik yeni bir ajan sınıfında değerlendirilmektedir. Kemik miktarını arttırmasıyla osteoporoz tedavisinde ve daha detaylı çalışmalar yapıldıktan sonra hipoparatiroidizm de PTH ilaç olarak kullanıma aday bir proteindir [124].

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Parathormonun rekombinant olarak elde edilmesi sonrasında, ticari ve deneysel olarak çok sayıda çalışmada kullanılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar göstermektedir ki, PTH aralıklı uygulandığında, kan kalsiyum düzeyini düzenlemekte ve kemik mineral yoğunluğunu artırmaktadır. Sürekli uygulamada ise kemik rezorpsiyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır. Osteoporoz tedavisinde PTH'nin diğer konvansiyonel tedavi yollarıyla kombinasyonu ve güvenli bir şekilde uzun süreli kullanımı için daha ayrıntılı denemeler ve çalışmalar gereklidir.



## KAYNAKLAR

1. Yaziciođlu, A. *Mediyastinin Paratiroid Tumorleri, Mediyastin Hastalıkları ve Cerrahisi[1]*, 2015. p. 407-408.
2. Hall, B. *Mediyastinal Parathyroid Tumors*. Pearson's Thoracic and Esophageal Surgery, 2008. p. 1677-83.
3. Kocatürk, C., *Mediyastinal Paratiroid Adenomları ve Karsinomları*, Türk Göğüs Cerrahisi Derneđi, Göğüs Cerrahisi Kitabı. 2013: İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd. Şti.
4. Modarai, B., et al., *The Glands of Owen*. Journal of the Royal Society Medicine, 2004. **97**(10):5.
5. Michie, W., et al., *Mechanism Of Hypocalcemia After Thyrotoxicosis*. The Lancet, 1971. **13**: 508-513.
6. Öztekin, Ü., *Paratiroid Adenomlarında Tc-99m Mibi ile Paratiroid Sintigrafisinin Histopatolojik Bulgularla Korelasyonu*, Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi. Nükleer Tıp Ana Bilim Dalı, Sivas, 2013.
7. Halsted, W.S., et al., *The Parathyroid Glandules, Their Blood Supply and Their Preservation on Operation Upon the Thyroid Gland*. Annals of Surgery, 1907. **46**(4): p. 489-506.
8. Potts, J.T., et al., *Parathyroid Hormone: Past and Present*. Journal of Endocrinology, 2005. **187**(3): p. 311-325.
9. Maccallum, W.G., et al., *Further Experimental Studies In Tetany*. The Journal of Experimental Medicine, 1913. **18**(6): p. 618-650.
10. Cope, O., et al., *The Study of Hyperparathyroidism at the Massachusetts General Hospital*. The New England Journal of Medicine, 1966. **274**(21): P. 1174-82.
11. Collip, J.B., et al., *Extraction of a Parathyroid Hormone Which Will Prevent or Control Parathyroid Tetany and Which Regulates the Level of Blood Calcium*. The Journal of Biological Chemistry, 1925. **63**: p. 395.
12. Kalra, S., et al., *The History Of Parathyroid Endocrinology*. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 2013. **17**(2): p. 320-322.
13. Bondeson, A.G., *Mediyastinal Parathyroid Adenomas and Carcinomas In: Shields*. 6th. ed. 2005: General Thoracic Surgery.
14. Usman, A., *Paratiroidler ve Hastalıkları, Temel Cerrahi Kitabı*. 2 ed. Vol. 2 (139) 1996, Ankara Güneş Kitabevi.
15. Johnson, S.J., et al., *Best Practice No 183. Examination of Parathyroid Gland Specimens*. Journal of Clinical Pathology, 2005. **58**(4): p. 338-42.
16. Gray, H., *Gray's Anatomy*. 1980, Churchill Livingstone: Great Britain.
17. Aksoy, A.Y. *Paratiroid hastalıkları*. 2015; Available from: <http://www.arifyavuzaksoy.com/paratiroid-hastalıkları/>.
18. Rosai, J., *Parathyroid Glands; Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 2004: Mosby.
19. Ritter, C.S., et al., *Differential Gene Expression by Oxyphil and Chief Cells of Human Parathyroid Glands*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2012. **97**(8): p. 1499-1505.
20. Bilezikian, J., et al., *The Parathyroids: Basic and Clinical Concepts*. 2015, Academic Press: San Diego. p. 23-39.
21. Hanson, A.M., et al., *The Hormone of the Parathyroid Gland*. Experimental Biology and Medicine, 1925. **22**(8): p. 560-561.

22. Hanson, A.M., et al., *An Elementary Chemical Study of the Parathyroid Glands of Cattle*, 1923. **54**: p. 554-60.
23. Cavalier, E., *Parathormone Determination in the Clinical Laboratory: Biochemical, Analytical and Clinical Aspects*, in *Department of Clinical Chemistry*. 2010, University of Liege: Belgium.
24. Guyton, A.C., *Tıbbi Fizyoloji*. 2001: Nobel Kitapevi.
25. Baştuğ, E., *Paratiroid Lezyonlarının Preoperatif Lokalizasyonunda Tc99m Sestamibi Çift Fazlı Paratiroid Sintigrafisi ile Erken Spect Yönteminin Tanısal Değeri*, Uzmanlık Tezi, İstanbul Tıp Fakültesi. Nükleer Tıp ABD, İstanbul, 2008.
26. Wachtel, H., *Neural Systems and Physiological Controls*. 2008; Available from: [www.colorado.edu/ASEN/asen5426/Lecture23.ppt](http://www.colorado.edu/ASEN/asen5426/Lecture23.ppt).
27. Wass, J.A.H., *Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes*. 2002, Oxford University Press.
28. Saleh, F.R., et al., *Causes of Secondary Hyperparathyroidism in a Healthy Population: the Tromsø Study*. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2006. **24**(1): p. 58-64.
29. Brown, E.M., et al., *Cloning and Characterization of an Extracellular Ca<sup>2+</sup>-Sensing Receptor From Bovine Parathyroid*. *Nature*, 1993. **366**(6455): p. 575-580.
30. Brown, E.M., et al., *Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling*. *Physiological Reviews*, 2001. **81**(1): p. 239-297.
32. Gardella, T.J., et al., *Mutational Analysis of the Receptor-Activating Region of Human Parathyroid Hormone*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(20): p. 13141-13146.
33. Habener, J.F., *Preproparathyroid hormone; amino acid sequence, chemical synthesis, and some biological studies of the precursor region*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978. **75**(6):2616-2620.
34. Walker, M., *Investigation Into the Influence of Parathyroid Hormone on Gene Expression in the Colorectal Epithelium*, in *Department of Surgery College of Medicine, Doctor of Philosophy, University of Birmingham. Department of Surgery College of Medicine, Belgium*, 2010.
35. Ganong, W.F., *Review of Medical Physiology*, 2005: McGraw-Hill Medical.
36. Rosen, C.J., *Parathyroid Hormone Therapy for Osteoporosis*, 2013.
37. Curtis, R.C., et al., *Evaluation of Parathyroid Hormone and Zoledronic Acid in Promoting Bone Healing after Stereotactic Radiation Therapy for Local Control of Osteosarcoma in an Orthotopic Rat Model*, Master of Science, Colorado State University. *Department of Microbiology, Immunology & Pathology*, Colorado, 2014.
38. Froissart, M., et al., *Limitations Of Non-Corrected and Albumin-Corrected Total Calcium Concentrations in CKD Patients*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2009. **24**(7): p. 2291-2292.
39. Silverberg, S.J., et al., *Clinical Spectrum of Primary Hyperparathyroidism*. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorder*, 2000. **1**(4): p. 237-45.
40. Kumar, A., et al., *N-Terminal Phosphorylation of Parathyroid Hormone (PTH) Abolishes Its Receptor Activity*. *ACS Chemical Biology*, 2014. **9**: p.2465-2470



41. Kleeman, C.R., et al., *The Clinical Physiology of Calcium Homeostasis, Parathyroid Hormone, and Calcitonin I*. California Medicine, 1971. **114**(3): p. 16-43.
42. Pierce, K.L., et al., *Seven-transmembrane Receptors*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(9): p. 639-650.
43. Mann, R., et al., *Ligand-Receptor Interactions at the Parathyroid Hormone Receptors: Subtype Binding Selectivity Is Mediated via an Interaction between Residue 23 on the Ligand and Residue 41 on the Receptor*. Molecular Pharmacology, 2008. **74**(3): p. 605-613.
44. Habener, J.F., et al., *Relative Effectiveness of Magnesium and Calcium on the Secretion and Biosynthesis of Parathyroid Hormone in Vitro*. Endocrinology, 1976. **98**(1): p. 197-202.
45. Rodríguez Ortiz, M.E., et al., *Magnesium Modulates Parathyroid Hormone Secretion and Upregulates Parathyroid Receptor Expression At Moderately Low Calcium Concentration*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2014. **29**(2): p. 282-289.
46. Brown, E.M., et al., *Extracellular Calcium Potentiates the Inhibitory Effects of Magnesium on Parathyroid Function in Dispersed Bovine Parathyroid Cells*. USA: Metabolism, 1984. **33**: 171-176.
47. Shoback, D.M., et al., *Interaction of Extracellular Calcium and Magnesium in the Regulation of Cytosolic Calcium and PTH Release in Dispersed Bovine Parathyroid Cells*. Molecular and Cellular Endocrinology, 1984. **38**: p. 179-186.
48. Guyton, A., *Endokrinoloji ve Üreme, Paratiroid Hormonu, Tibbi Fizyoloji*. 1989: Nobel Tıp Kitabevi.
49. Kroll, M.H., *Parathyroid Hormone Temporal Effects on Bone Formation and Resorption*. Bulletin of Mathematical Biology, 2000. **62** (2): p. 163-187.
50. Qin, L., *Parathyroid Hormone: a Double-Edged Sword for Bone Metabolism*. Trends Endocrinology and Metabolism, 2004. **15**(2): p. 60-65.
51. Thomas, T., et al., *Intermittent Parathyroid Hormone Therapy to Increase Bone Formation*. Joint Bone Spine Journal, 2006. **73**(3): p. 262-269.
52. Jilka, R.L., *Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH*. Bone. **40**(6): p. 1434-1446.
53. Blaine, J., et al., *Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2015. **10**(7): p. 1257-1272.
54. Mihai, R., et al., *Parathyroid Disease and Calcium Metabolism*. British Journal of Anaesthesia, 2000. **85**(1): p. 29-43.
55. Nemere, I., *Genomic and Nongenomic Actions of Vitamin D on Calcium Transport in Intestine*. Poultry and Avian Biology Reviews, 1996. **7**: p. 205-216.
56. Nemere, I., et al., *Does PTH Have a Direct Effect on Intestine?*. Journal of Cell Biochem, 2002. **86**(1): p. 29-34.
57. Sayek, İ., *Paratiroid Hastalıkları, Temel Cerrahi*, 2004, Ankara: Güneş Kitabevi.
58. Chattopadhyay, N., et al., *The Calcium-Sensing Receptor: A Window into the Physiology and Pathophysiology of Mineral Ion Metabolism*. Endocrine Reviews, 1996. **17**(4): p. 289-307.

59. Felsenfeld, A.J., et al., *Bone, Parathyroid Hormone and the Response to the Rapid Induction of Hypocalcaemia*. European Journal of Clinical Investigation, 1999. **29**: p. 274-277.
60. Sahota, O., et al., *Vitamin D Insufficiency and the Blunted PTH Response in Established Osteoporosis: The Role of Magnesium Deficiency*. Osteoporosis International, 2006. **17**(7): p. 1013-21.
61. Pang, P.K., et al., *Specific Inhibition of Long-Lasting, L-Type Calcium Channels by Synthetic Parathyroid Hormone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(2): p. 623-7.
62. Lips, P., *Vitamin D Deficiency and Secondary Hyperparathyroidism in the Elderly: Consequences for Bone Loss and Fractures and Therapeutic Implications*. Endocrine Reviews, 2001. **22**(4): p. 477-501.
63. Malabanan, A., et al., *Redefining Vitamin D Insufficiency*. Lancet, 1998. **351** (9105): p. 805-6.
64. Mithal, A., et al., *Global Vitamin D Status and Determinants of Hypovitaminosis D*. Osteoporosis International, 2009. **20**(11): p. 1807-20.
65. Gölcüklü, S., *Paratiroid Hiperplazi ve Adenom Patolojik Tanisi Olan Hastalarda Parathormon Düzeyi ile Lomber Kemik Yoğunluğu İlişkisinin Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi. *İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı*, Malatya, 2015.
66. Nawrot, I., et al., *Total Thyroidectomy is Associated with Increased Prevalence of Permanent Hypoparathyroidism*. Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2014. **20**: p. 1675-81.
67. Michels, C.T., et al., *Parathyroid Disorders*. American Family Physician, 2013. **88**(4): p. 249-57.
68. Çiftçi, M., *Total Tiroidektomi Sonrası Gelişebilecek Hipokalseminin Erken Tanısında Parathormon Ölçümü*, Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi. *Tıp Fakültesi-Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı*, Diyarbakır, 2011.
69. Rejnmark, L., et al., *Hypoparathyroidism: Replacement Therapy with Parathyroid Hormone*. Endocrinol Metabolism, 2015. **30**(4): p. 436-42.
70. Biyoloji, A. 2009; Available from: <http://www.lisebiyoloji.com/biyoteknoloji.html>.
71. Stryiewska, A., et al., *Biotechnology and Genetic Engineering in the New Drug Development. Part I. DNA Technology and Recombinant Proteins*. Pharmacological Reports, 2013. **65**(5): p. 1075-85.
72. Cheng, M.L., et al., *Teriparatide – Indications Beyond Osteoporosis*. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 2012. **16**(3): p. 343-348.
73. Adis, I.L., et al., *ALX 111: ALX1-11, Parathyroid Hormone (1-84) - NPS Allelix, PREOS, PTH, Recombinant Human Parathyroid Hormone, rhPTH (1-84)*. Drugs in R&D, 2003. **4**(4): p. 231-5.
74. Zeng, W.S., *Analyse the Amino Acid Composition of Recombinant Human Parathyroid Hormone 1-34*. Pharmaceutical Biotechnology, 2003. **10**(2): p. 108-111.
75. Schwieter, H.R., et al., *Single-Dose Subcutaneous Administration of Recombinant Human Parathyroid Hormone [rhPTH(1-84)] in Healthy Postmenopausal Volunteers*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 1997. **61**(3): p. 360-376.

76. Rittmaster, R.S., et al., *Enhancement of Bone Mass in Osteoporotic Women with Parathyroid Hormone followed by Alendronate*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2000. **85**(6): p. 2129-2134.
77. Li, Q., et al., *Safety, Tolerability and Pharmacokinetic Study of Recombinant Human Parathyroid Hormone [rhPTH (1-84)] in Chinese Healthy Volunteers*. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 2009. **29**(4): p. 431-434.
78. Neuprez, A., et al., *Bone-Forming Agents in the Management of Osteoporosis*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **22**(5): p. 869-883.
79. Rubin, M.R., et al., *The Anabolic Effects of Parathyroid Hormone*. Osteoporosis International, 2002. **13**(4): p. 267-277.
80. Neer, R.M., et al., *Effect of Parathyroid Hormone (1-34) on Fractures and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteoporosis*. New England Journal of Medicine, 2001. **344**(19): p. 1434-1441.
81. Lau, A.N., *Resolution of Osteonecrosis of the Jaw After Teriparatide [Recombinant Human PTH-(1-34)] Therapy*. The Journal of Rheumatology, 2009. **36**(8): p. 1835-1837.
82. Harper, K.D., *Comments on initial experience with teriparatide in the United States*. Current Medical Research and Opinion, 2006. **22**(10): p. 1927.
83. Harper, K.D., et al., *Osteosarcoma and Teriparatide?*. Journal of Bone and Mineral Research, 2007. **22**(2): p. 334-334.
84. Subbiah, V., et al., *Of mice and men: divergent risks of teriparatide-induced osteosarcoma*. Osteoporosis International, 2010. **21**(6): p. 1041-1045.
85. Winer, K.K., et al., *Synthetic Human Parathyroid Hormone 1-34 vs Calcitriol and Calcium in the Treatment of Hypoparathyroidism: Results of a Short-Term Randomized Crossover Trial*. JAMA, 1996. **276**(8): p. 631-636.
86. Marx, S.J., *Hyperparathyroid and Hypoparathyroid Disorders*. New England Journal of Medicine, 2000. **343**(25): p. 1863-1875.
87. Bieglmayer, C., et al., *Kinetic Analyses of Parathyroid Hormone Clearance as Measured by Three Rapid Immunoassays during Parathyroidectomy*. Clinical Chemistry, 2002. **48**(10): p. 1731-1738.
88. Mahajan, A., et al., *Hypoparathyroidism associated with severe mineral bone disease postrenal transplantation, treated successfully with recombinant PTH*. Hemodialysis International, 2009. **13**(4): p. 547-550.
89. Nakazawa, T., et al., *Effects of low-dose, intermittent treatment with recombinant human parathyroid hormone (1-34) on chondrogenesis in a model of experimental fracture healing*. Bone, 2005. **37**(5): p. 711-719.
90. Erbil, Y., et al., *The impact of age, vitamin D3 level, and incidental parathyroidectomy on postoperative hypocalcemia after total or near total thyroidectomy*. The American Journal of Surgery, 2009. **197**(4): p. 439-446.
91. Sağlık Bakanlığı, T.C. *Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2013*, Available from: [sbu.saglik.gov.tr](http://sbu.saglik.gov.tr).
92. Lawrence, J.P., et al., *Effect of Daily Parathyroid Hormone (1-34) on Lumbar Fusion in a Rat Model*. The Spine Journal, 2006. **6**(4): p. 385-390.
93. Liu, Y., et al., *Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Recombinant Human Parathyroid Hormone after Single- and Multiple-Dose Subcutaneous Administration in Healthy Chinese Volunteers*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2012. **110**(2): p. 154-161.

94. Paschalis, E.P., et al., *Bone Mineral and Collagen Quality in Iliac Crest Biopsies of Patients Given Teriparatide: New Results from the Fracture Prevention Trial*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005. **90**(8): p. 4644-4649.
95. Hodsman, A.B., et al., *Parathyroid Hormone and Teriparatide for the Treatment of Osteoporosis: A Review of the Evidence and Suggested Guidelines for Its Use*. Endocrine Reviews, 2005. **26**(5): p. 688-703.
96. Orwoll, E.S., et al., *Evaluation of teriparatide treatment in adults with osteogenesis imperfecta*. The Journal of Clinical Investigation, 2014. **124**(2): p. 491-498.
97. Sheyn, D., et al., *PTH Induces Systemically Administered Mesenchymal Stem Cells to Migrate to and Regenerate Spine Injuries*. Molecular Therapy, 2016. **24**(2): p. 318-330.
98. Scian, M., et al., *Backbone dynamics of human parathyroid hormone (1–34): Flexibility of the central region under different environmental conditions*. Peptide Science, 2006. **84**(2): p. 147-160.
99. Luck, M.D., P.H. Carter, and T.J. Gardella, *The (1–14) Fragment of Parathyroid Hormone (PTH) Activates Intact and Amino-Terminally Truncated PTH-1 Receptors*. Molecular Endocrinology, 1999. **13**(5): p. 670-680.
100. Reidhaar-Olson, J.F., et al., *Active variants of human parathyroid hormone (1–34) with multiple amino acid substitutions*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2000. **160**(1–2): p. 135-147.
101. Forssmann, W.G., et al., *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characteristics of Subcutaneously Applied PTH-1-37*. Kidney and Blood Pressure Research, 2016. **41**(5): p. 507-518.
102. Audu, C.O., et al., *Recombinant Production of TEV Cleaved Human Parathyroid Hormone*. Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society, 2013. **19**(8): p. 504-510.
103. Jerome, C.P., et al., *Treatment with human parathyroid hormone (1-34) for 18 months increases cancellous bone volume and improves trabecular architecture in ovariectomized cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)*. Bone, 2001. **28**(2): p. 150-159.
104. McNeilly, T., et al., *Recombinant PTH: A Study of the Outcome of Teriparatide Therapy for 138 Patients with Osteoporosis*. The Ulster Medical Journal, 2013. **82**(2): p. 89-93.
105. Im, G.I., et al., *Effect of Teriparatide on Healing of Atypical Femoral Fractures: A Systemic Review*. Journal of Bone Metabolism, 2015. **22**(4): p. 183-189.
106. Babu, S., et al., *Use of Teriparatide to Improve Fracture Healing: What is The Evidence?.* World Journal of Orthopedics, 2015. **6**(6): p. 457-461.
107. Dore, R.K., *Long-Term Safety, Efficacy, and Patient Acceptability of Teriparatide in the Management of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis*. Patient preference and adherence, 2013. **7**: p. 435-446.
108. Selim, A.A., et al., *Role of Calcium Channels in Carboxyl-Terminal Parathyroid Hormone Receptor Signaling*. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2006. **291**(1): p. C114-C121.
109. Schneider, H., et al., *A C-Terminally Truncated Human Parathyroid Hormone Receptor is Functional and Activates Multiple G Proteins*. FEBS Letters, 1994. **351**(2): p. 281-285.

110. Meier, C., et al., *The Role of Teriparatide an Sequential and Combination Therapy of Osteoporosis*. Swiss Medical Weekly, 2014. **144**.
111. Body, J., et al., *A Randomized Double-Blind Trial to Compare the Efficacy of Teriparatide [Recombinant Human Parathyroid Hormone (1–34)] with Alendronate in Postmenopausal Women with Osteoporosis*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002. **87**(10): p. 4528-4535.
112. Yang, Y., et al., *Comparison between recombinant human parathyroid hormone (1–34) and elcatonin in treatment of primary osteoporosis*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2015. **8**(1): p. 79-84.
113. Ying, L., et al., *Comparison of Parathyroid Hormone (1-34) and Elcatonin in Postmenopausal Women with Osteoporosis: an 18-Month Randomized, Multicenter Controlled Trial in China*. Chinese Medical Journal, 2013. **126** (3).
114. Song, J., et al., *Single and Combined use of Human Parathyroid Hormone (PTH) (1-34) on Areal Bone Mineral Density (aBMD) in Postmenopausal Women with Osteoporosis: Evidence Based on 9 RCTs*. International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2014. **20**: p. 2624-2632.
115. Bi, F., et al., *Intermittently Administered Parathyroid Hormone [1–34] Promotes Tendon-Bone Healing in a Rat Model*. International Journal of Molecular Sciences, 2014. **15**(10): p. 17366-17379.
116. Sugiura, T., et al., *Intermittent Administration of Teriparatide Enhances Graft Bone Healing and Accelerates Spinal Fusion in Rats With Glucocorticoid-Induced Osteoporosis*. The Spine Journal, 2015. **15**(2): p. 298-306.
117. Andrews, E.B., et al., *The US Postmarketing Surveillance Study of Adult Osteosarcoma and Teriparatide: Study Design and Findings From the First 7 Years*. Journal of Bone and Mineral Research, 2012. **27**(12): p. 2429-2437.
118. Mittelman, S.D., et al., *A Hypocalcemic Child with a Novel Activating Mutation of the Calcium-Sensing Receptor Gene: Successful Treatment with Recombinant Human Parathyroid Hormone*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006. **91**(7): p. 2474-2479.
119. Wang, H., et al., *Recombinant Human Parathyroid Hormone Related Protein 1-34 and 1-84 and Their Roles in Osteoporosis Treatment*. PLoS ONE, 2014. **9**(2): p. e88237.
120. Cusano, N.E., et al., *PTH(1–84) Is Associated With Improved Quality of Life in Hypoparathyroidism Through 5 Years of Therapy*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2014. **99**(10): p. 3694-3699.
121. Cusano, N.E., et al., *The Effect of PTH(1–84) on Quality of Life in Hypoparathyroidism*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2013. **98**(6): p. 2356-2361.
122. Bilezikian, J.P., et al., *Hypoparathyroidism in the Adult: Epidemiology, Diagnosis, Pathophysiology, Target Organ Involvement, Treatment, and Challenges for Future Research*. Journal of Bone and Mineral Research, 2011. **26**(10): p. 2317-2337.
123. Garfield, N. and A.C. Karaplis, *Genetics and animal models of hypoparathyroidism*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2001. **12**(7): p. 288-294.
124. Cusano, N.E., et al., *Mini-review: new therapeutic options in hypoparathyroidism*. Endocrine, 2012. **41**(3): p. 410-414.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Zekiye DİŞÇİ  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 19.02.1983 / Eyüp  
**E-posta** : [zekiye.dsc@hotmail.com](mailto:zekiye.dsc@hotmail.com)

### ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, Fatih Üniversitesi, Biyoloji bölümü
- **Yükseklisans** : 2017, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji ABD, Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı