

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT TÜMÖR FARKLILAŞMA FAKTÖRÜ ÜRETİMİ VE MEME  
KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Süreyya Mert SELİMOĞLU

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2019



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT TÜMÖR FARKLILAŞMA FAKTÖRÜ ÜRETİMİ VE MEME  
KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Süreyya Mert SELİMOĞLU**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Murat KASAP

Etik Kurul Onay No: KÜ GOKAEK 2017/10.8

KOCAELİ  
2019

**KABUL ve ONAY**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: **REKOMBİNANT TÜMÖR FARKLILAŞMA FAKTÖRÜ ÜRETİMİ VE MEME KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ TERAPÖTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

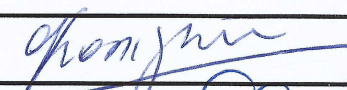
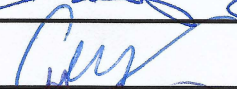
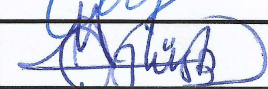
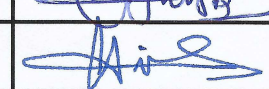
Tez Yazarı: Süreyya Mert SELİMOĞLU

Tez Savunma Tarihi: 14.06.2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Murat KASAP



Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
Prof.Dr.	Gönül KANIGÜR (Başkan)	
Prof.Dr.	M. Doğan GÜLKAÇ	
Prof.Dr.	Uzay GÖRMÜŞ DİĞRİGO	
Doç.Dr.	Mehmet ÖZTÜRK	
Doç.Dr.	Gürler AKPINAR	

**Onay**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

14/06/2019

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ  
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## ÖZET

**Amaç:** Tümör farklılaşma faktörü (TFF) *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda uygulandığında, meme kanseri tümör hücrelerini farklılaştırarak invazif niteliklerinin kaybolmasına yol açmaktadır. İlk defa Platica ve diğ. (2004)'nin sıçan hipofiz bezinde TFF'nin kısa formu olan TFF-P1 peptidini kullanarak yapmış oldukları bir çalışma ile böyle bir faktörün varlığı gösterilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada, TFF-P1'in kandaki yarılanma ömrünün oldukça düşük olduğunu gözlemleyerek farelere günde iki kez enjeksiyon yapmak zorunda kalmışlardır. Kandaki kısa yarı ömründen ötürü TFF-P1'in terapötik amaçlı kullanılması mümkün olmamıştır. Çalışmamızda kısa yarı ömründen dolayı kullanılamayan bu faktörün, renal atılıma daha dirençli ve daha iyi aktivite gösteren bütüncül formdaki TFF proteinin üretilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmamız kapsamında bütüncül TFF proteinine IgG1-Fc uzantısı eklenerek hem kandaki yarılanma ömrü daha uzun, hem de immün sistemi tetikleyebilir nitelikte bir terapötüğün üretilmesi ve *in vitro* ortamda test edilmesi gerçekleştirilmiştir.

**Yöntem:** Yapılan çalışmalarda *in silico* tasarım, modelleme ve sonrasında HEK293F süspanse hücre hattı kullanılarak bütüncül TFF üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim ve saflaştırma çalışmaları sonrasında elde edilen bütüncül rekombinant TFF proteini'nin (rTFF) doğrulanması amacı ile LC-MS/MS, SDS-PAGE ve western blotlama analizleri yapılmıştır. Hedeflenen şekilde üretildiği kanıtlanan protein, HeLa hücre hattı, MCF-7 hücre hattı ve bir hastanın invazif meme tümör dokusundan elde edilen primer hücre hattı üzerinde hücre canlılığı, proliferasyon ve önemli tümör markırlarına ilişkin *in vitro* etkinlik testlerine tabi tutulmuştur.

**Bulgular:** Yapılan testler neticesinde, elde edilen rTFF'nin hedeflenen şekilde eksprese edildiği, başta MCF-7 hücre hattı olmak üzere yeni geliştirilen primer hücre hattı üzerinde yüksek aktivite gösterdiği ve bu şekilde hücrelerin farklılaşarak malignant karakterden, benign bir karaktere farklılaşmalarında başarılı olunduğu gösterilmiştir.

**Sonuç:** Çalışmamız kapsamında özgün bir tasarım ile geliştirilen rTFF proteininin meme tümörü hücreleri üzerinde terapötik etki gösterme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, Rekombinant tümör farklılaştırma faktörü, MCF-7, Primer kültür, Tümör farklılaşması

## İNGİLİZCE ÖZET

**Objective:** Tumor differentiation factor (TDF) differentiates breast cancer cells *in vivo* and *in vitro*, leading to loss of their invasive properties. Platica et al. (2004) showed the presence of TDF in pituitary gland of rats. They used truncated form of TDF called TDF-P1 peptide and performed subcutaneous injections to mice twice a day with high doses of the peptide. Their need of performing such a high dose of injection came from the fact that the half-life of the TDF-P1 is very short in circulation. However, this type of high dosage application has no use in practical and cannot find a place in clinical therapies. Therefore, in this study, we aimed to produce TDF protein in full-length and hoped to achieve higher activity and longer half-life in circulation.

**Method:** In here, *in silico* design and modeling studies were performed and the Fc domain of IgG1 was conjugated to the full-length recombinant TDF (rTDF) to increase its half-life in circulation. The subsequent production was achieved in the HEK293F suspended cell line. LC-MS/MS, SDS-PAGE and western blotting analyzes were performed to confirm the production of rTDF. Several trials were performed to purify the recombinant protein in its soluble form. The *in vitro* efficacy of the produced Fc-TDF fusion protein was monitored by cell viability and proliferation assays using HeLa, MCF-7 and a primary breast-cancer cell line.

**Results:** In overall, we have shown that the Fc-TDF was displayed higher *in vitro* tumor suppressor activity on the primary breast cancer and the MCF-7 cell lines in comparison to TDF-P1 peptide. When Fc-TDF was applied to cell cultures of the primary breast cancer and the MCF-7 cell lines, the cells differentiated from a malignant to a more benign character.

**Conclusions:** The rTDF protein, which was developed with a unique design within the scope of our study, has proven to have the potential to exert a therapeutic effect on breast tumor cells *in-vivo*.

**Keywords:** Breast cancer, Recombinant tumor differentiation factor, MCF-7, Primary culture, Tumor differentiation

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın proje ve tez önerisi olarak sunulmasından, nihayete erdirilmesine kadar geçen bütün süreçte bana olan desteklerini hiç esirgemeyen ve her aşamada hep yanımda olan, bu zorlu süreçte bana hocadan ziyade ağabeylik yapan Kıymetli Ağabeyim, Değerli Ustam ve Hocam Prof. Dr. Sayın Murat Kasap'a teşekkürü bir borç bilir ve en içten şükranlarımı sunarım. Yine çalışmanın her aşamasında bana olan desteklerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Saygıdeğer Ağabeyim ve Değerli Hocam Doç. Dr. Sayın Gürler Akpınar'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmam süresince bana olan desteklerini sürekli hissettiğim Sevgili Ablam ve Değerli Hocam Dr. Öğr. Üyesi Sayın Aylin Kanlı'ya tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yürütülmesi sırasında bana olan yardım ve desteklerinden ötürü Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi, Proteomiks laboratuvarı asistanlarından başta Arş. Gör. Merve Gülsen Bal ve Arş. Gör. Mehmet Sarıhan olmak üzere, tüm Proteomiks Laboratuvarı personeline teşekkürlerimi sunarım.

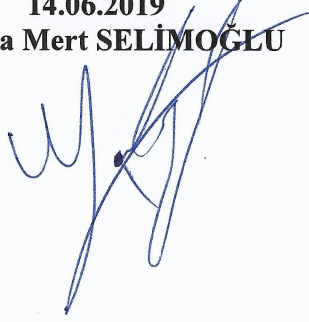
Son olarak, gece-gündüz çalışmalarım boyunca yeri geldiğinde günlerce hatta haftalarca yüzlerini doğru düzgün göremediğim ailem ve değerli kız arkadaşım Sayın Ece Düz'e var oldukları ve yanımda oldukları için en kalbi teşekkürlerimi sunarım...

## TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

14.06.2019

Süreyya Mert SELİMOĞLU





## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÇİZİMLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Ülkemiz ve Dünya’da Meme Kanseri	1
1.1.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri	2
1.1.2. Meme Kanserinin Belirtileri	3
1.1.3. İnsanda Meme Kanseri Evreleri	5
1.2. Primer Hücre Kültürü	6
1.3. Tümör Farklılaşma Faktörü (TFF)	7
1.3.1. TFF’nin Keşfi ve Moleküler Özellikleri	7
1.3.2. TFF’nin Etki Mekanizması	8
1.3.3. TFF’nin Rekombinant Olarak Üretimi	9
1.4. Terapötik Proteinler	10
1.4.1. Protein Terapötiklerinin Yarılanma Ömürleri	11
1.4.2. Füzyon Partneri Olarak IgG1-Fc	14
1.5. Terapötik Proteinlerin Üretimi	21
2. AMAÇ	23
3. YÖNTEM	26
3.1. Rekombinant TFF Proteini’nin ve İlgili Gen’in Tasarımı	26
3.1.1. Eksprese Edilecek Proteinin <i>In silico</i> Modellemesi	26
3.1.2. Eksprese Edilecek Olan Genin Tasarımı	27
3.2. Plazmidin Amplifikasyonu ve Saflaştırılması	32
3.2.1. <i>E. coli</i> Hücrelerinin Elektroporasyon ile Transformasyonu	32
3.2.2. Hücrelerin Çoğaltımı ve Plazmidin Saflaştırılması	33
3.3. Primer Hücre Kültürü ve Stabil Hücre Hattı’nın Elde Edilmesi	35
3.3.1. Eksplant Primer Hücre Kültürü	36

3.3.2. Enzimatik Primer Hücre Kültürü	37
3.3.3. Hücre Çözdürme, Pasajlama ve Dondurma	38
3.4. HeLa ve MCF-7 Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar	40
3.5. HEK293F Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar	40
3.5.1. Hücre Çözdürme, Pasajlama ve Dondurma	41
3.6. Rekombinant TFF'nin Üretimi	43
3.6.1. HEK293F Hücre Hattı'nın Transfeksiyonu	44
3.6.2. Protein Ekspresyonu	46
3.7. Rekombinant TFF'nin Saflaştırılması	46
3.7.1. Protein A Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma	46
3.7.2. Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma	48
3.8. Saflaştırma Sonrası Protein Analizleri	51
3.8.1. Saflaştırılmış Fraksiyonun 2D-Clean Up ile Temizlenmesi ve Konsantre Edilmesi	51
3.8.2. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonu Tayini	52
3.8.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi	53
3.8.4. Western Blotlama Analizi	56
3.8.5. rTFF'nin Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi ile Karakterizasyonu	58
3.9. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonuna Yönelik Analizler	60
3.9.1. Tripan Mavisi Hücre Sayım Metodu	60
3.9.2. WST-1 Hücre Proliferasyonu Testi	62
3.9.3. Mikroskopik Analizler	63
3.9.4. Neonatal Fc Reseptörü'ne Bağlanma Testi	63
4. BULGULAR	67
4.1. Proteinin tasarımı	67
4.1.1. Proteinin Monomerik Yapıda Modellenmesi	67
4.1.2. Proteinin Dimerik Yapıda Modellenmesi	68
4.2. Plazmidin Amplifikasyonu ve Saflaştırılması	70
4.2.1. <i>E. coli</i> Hücrelerinin Elektroporasyon ile Transformasyonu	70
4.2.2. Hücrelerin Çoğaltımı ve Plazmidin Saflaştırılması	71
4.3. Rekombinant TFF'nin HEK293F Hücrelerinde Üretimi	71
4.3.1. Kesikli Modda Kültür	71
4.3.2. Tekrarlı Yarı-kesikli Modda Kültür	74
4.4. Rekombinant TFF'nin Saflaştırılması	76
4.4.1. Protein A Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma	76
4.4.2. Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma	77

4.4.3. rTFF'nin Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi ile Karakterizasyonu	81
4.5. rTFF'nin Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Üzerine Etkileri	82
4.5.1. HeLa Hücre Hattı Üzerinde Etkinlik Testi	82
4.5.2. MCF-7 Hücre Hattı Üzerinde Etkinlik Testleri	83
4.5.3. Primer Hücre Hattı Üzerinde Etkinlik Testi	88
4.6. rTFF'nin Hücre İçi E-Kaderin Düzeyi Üzerine Etkisi	90
4.7. rTFF'nin Neonatal Fc Reseptörü'ne Bağlanma Testi	92
5. TARTIŞMA	94
5.1. Sınırlılıklar	95
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR DİZİNİ	98
ÖZGEÇMİŞ	103
EKLER	108

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ABD: Amerika Birleşik Devletleri
- ADCC: Antikora bağımlı hücrel sitotoksiste
- ADCP: Antikora bağı hücrel fagositoz
- BSA: Sığır serum albümini
- CDC: Komplemana bağı sitotoksiste
- cDNA: Karşılık gelen DNA zinciri
- CHO: Çin hamster ovaryumu hücre hattı
- DCIS: Duktal karsinom *in-situ*
- DHFR: Dehidrofolat redüktaz
- DMEM: Dulbecco tarafından modifiye edilmiş Eagle'ın besi ortamı
- DMSO: Dimetilsülfoksit
- DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
- E. coli: Escherichia coli*
- ECR: Elektro eşleme reaktifi
- ELISA: Enzime bağı immünozorbant testi
- FBS: Fötal sığır serumu
- Fc: Kristalize edilebilir fragman
- FcRn: Neonatal Fc reseptörü
- HEK: İnsan embriyonik böbreği hücre hattı
- HEK293F: Freestyle-insan embriyonik böbrek hücre hattı
- HeLa: Servikal kanser hücre hattı
- HRP: Yabanturbu peroksidaz (horseradish peroxidase) enzimi
- IAA: İyodo asetamid
- IgG: İmmüoglobülin-G
- ITAM: İmmün reseptör tirozin-tabanlı aktivatör motif
- ITIM: İmmün reseptör tirozin-tabanlı inhibitör motif
- İMAK: İmmobilize metal afinite kromatografisi
- LB: Luria Bertani
- LCIS: Lobüler karsinom *in-situ*

LC-MS/MS: Likit kromatografi kütle spektroskopisi  
NK: Doğal öldürücü  
ORF: Açık okuma bölgesi  
PBS: Fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi  
PEI: Polietilenimin  
PHH: Primer kültür hücre hattı  
PSM: Peptit spektrum eşleşmesi  
PTM'li: Post translasyonel modifikasyonları olan  
PTM'siz: Post translasyonel modifikasyonları olmayan  
rTFF: Rekombinant tümör farklılaşma faktörü  
SDS-PAGE: SDS Poliakrilamid jel elektroforezi  
SOB: Süper optimal besi ortamı  
TBS: Tamponlanmış tuz çözeltisi  
TBST: Tamponlanmış tuz çözeltisi + Tween 20  
TFF: Tümör farklılaşma faktörü  
TFF-P1: Tümör farklılaşma faktörü P1 proteini  
TÜBİTAK: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurulu  
VPA: Valporaik asit  
WST-1: 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)- 5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium

## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Tümör Farklılaşma Faktörü P1 Peptidinin Farklılaştırma Etkisi	7
Çizim 1.2. TFF-P1 Peptid Sekansı	8
Çizim 1.3. TFF Proteinine Dair 3-Boyutlu Modelleme Sonuçları	9
Çizim 1.4. IgG'nin FcRn Aracılığı ile Tekrar Dolaşıma Alınması	12
Çizim 1.5. Terapötik Proteinlerin Yarı-ömürlerinin Artırılması Yöntemleri	14
Çizim 1.6. IgG-Fc Bölgesi	15
Çizim 1.7. CDC, ADCP ve ADCC İmmün Yanıtları	16
Çizim 1.8. Terapötik Proteinlerin HEK Hücre Hattı Kullanılarak Üretimi	22
Çizim 3.1. IgG1-Fc Bölgesine Konjuge Haldeki rTFF Proteinini'nin Gösterimi	28
Çizim 3.2. pFUSE-hIgG1-Fc2 Vektör Haritası	29
Çizim 3.3. TFF Bütüncül Gen Sekansı	30
Çizim 3.4. Sanal Klonlama İşlemi Sonrası Vektör Haritası (A) ve Gene Dair ORF Bölgesi (B)	31
Çizim 3.5. Elektroporasyon ile Transformasyon Sonrası Ekim Yapılan Petriler	33
Çizim 3.6. Meme Tümörü Eksplantından Primer Hücre Kültürü Eldesi	37
Çizim 3.7. rTFF'nin Protein A Kolon Kromatografisi ile NGC Sistemi Kullanılarak Saflaştırılması	47
Çizim 3.8. Amikon Karıştırılmalı Hücre Aparatı	49
Çizim 3.9. rTFF'nin Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile NGC Sistemi Kullanılarak Saflaştırılması	50
Çizim 3.10. Bradford Yöntemi ile Elde Edilen Protein Standart Eğrisi	52
Çizim 3.11. Thoma Sayım Lamı ile Hücre Sayımı	62
Çizim 4.1. rTFF'ye İlişkin Normalize Edilmiş B-faktör Grafiği	67
Çizim 4.2. Monomerik rTFF Modelleme Sonuçları	68
Çizim 4.3. Dimerik rTFF Modelleme Sonuçları	69
Çizim 4.4. Transformasyon İşlemi Sonrası Petrilerde Alınan Sonuçlar	70
Çizim 4.5. Kültür Üst Sıvısında rTFF Analizi	71
Çizim 4.6. Kültür Üst Sıvısında Görülen Agregatlar ve Neden Olduğu Türbit Yapı	72
Çizim 4.7. Ekspresye Edilen rTFF Proteinine İlişkin Teorik Hidropatisite İndeksi	74
Çizim 4.8. Tekrarlı Yarı-kesikli Kültürden Toplanan Üst Sıvı ve Kültüre Geri Beslenecek Pelletlerden Örnekler	75
Çizim 4.9. Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma Sonucu Western Blotlama Analizi	76
Çizim 4.10. Protein A Kolon Kromatografisi Sonuçları	77
Çizim 4.11. rTFF'nin Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılmasına İlişkin Kromatogram	78
Çizim 4.12. Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma Sonucu SDS-PAGE Analizi	79
Çizim 4.13. Pozitif ve Negatif Ekspresyon Kültürlerine İlişkin Venn Diagramı	81
Çizim 4.14. rTFF'nin HeLa Hücre Hattı Hücreleri Üzerindeki Etkisi	82
Çizim 4.15. P1 Peptidi'nin MCF-7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	83
Çizim 4.16. rTFF'nin MCF-7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi	84
Çizim 4.17. P1 Peptidi'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	85
Çizim 4.18. rTFF'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	86
Çizim 4.19. P1 Peptidi ve rTFF'nin MCF-7 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkisi	87

Çizim 4.20. rTFF'nin MCF-7 Hücre Hattı Hücrelerinin Farklılaşmasına Olan Etkisi.	88
Çizim 4.21. rTFF'nin Primer Hücre Hattı Proliferasyonu Üzerine Etkisi	89
Çizim 4.22. rTFF'nin Primer Kültür Hücre Hattı Hücrelerinin Farklılaşmasına Olan Etkisi	90
Çizim 4.23. rTFF ile Muamele Edilen MCF-7 ve Primer Hücre Hatlarının E-kaderin, $\beta$ -aktin Düzeyleri ve E-kaderin/B-aktin İntensite Oranları	91
Çizim 4.24. Neonatal Fc Reseptörü'ne Bağlanma Testi Sonucu	93



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnsan ve Farede bulunan Fc $\gamma$ Reseptörleri	18
Çizelge 1.2. IgG1-Fc'nin Kullanımına İlişkin Klinikten Örnekler	19
Çizelge 1.3. İmmüoglobülin Sınıfları ve Özellikleri	20
Çizelge 3.1. Görüntülenmek İstenen Proteinin Büyüklüğüne Göre Kullanılan Jel Yüzdeleri	54
Çizelge 3.2. %12'lik Ayırıcı Jel Solüsyonu ve %4'lük İstifleme Jel Solüsyonu İçerikleri	55





## 1. GİRİŞ

Çağımızın önemli sağlık sorunlarından biri olan kanserin ülkemizde ve dünyada görülme sıklığı giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre; 5 yaşından sonra, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ilk üç ölüm nedeninden birisinin kanser olduğu, tüm ölümlerin %10'unun kanser nedeni ile meydana geldiği, dünyada her yıl 6,4 milyon yeni kanser vakasının ortaya çıktığı ve 4,8 milyon kişinin kanser nedeni ile öldüğü belirtilmektedir. Yıllık kanser görülme oranı gelişmiş ülkelerde 260/100.000 iken gelişmekte olan ülkelerde 102/100.000'dir. Gelişmekte olan ülkelerde de yaşam süresinin uzaması ile kanser sayısında artışların beklendiği vurgulanmaktadır (Burgut 1994). Dünyada bazı sanayileşmiş ülkelerdeki yıllık kanser görülme oranının cinsiyete bağlı olarak hızları incelendiğinde: erkeklerdeki değerin 300-500/100.000, kadınlarda ise 200-250/100.000 dolayında olduğu görülmektedir (Costanza ve diğ. 1990, Parlar ve diğ. 2005).

### 1.1. Ülkemiz ve Dünya'da Meme Kanseri

Meme kanseri, Amerika'da kadınlar arasında görülen kansere bağlı ölümler arasında ilk sırayı almaktadır, her yıl 180.000 kadına meme kanseri tanısı konulmakta ve 46.000 kadın meme kanserinden hayatını kaybetmektedir (Parlar ve diğ. 2005). Meme kanserinden ölüm oranı verileri ülkelere göre değişmektedir: İngiltere, Danimarka, Hollanda ve Amerika'da 25-30/100.000, Japonya, Meksika ve Venezuela'da 25/100.000'dir (Sağlık Bakanlığı, 2000). Ülkemiz kadınları arasında da son yıllarda meme kanseri görülme oranında artış olmuştur (Doğan 2000, Parlar ve diğ. 2005). Ülkemizde kadınlarda görülen kanserlerin yaklaşık %28'i meme kanseri olarak bildirilmektedir ve bu oran ABD'de bildirilen oranla benzerlik göstermektedir (Yiğit 1998). ABD'de kadınların hayatı boyunca meme kanserine yakalanma riski %11 iken, meme kanserinden ölüm riski %3-4 olarak belirlenmiştir (Costanza ve diğ. 1990, Parlar ve diğ. 2005). Kadınlarda sık görülen ve ölüm oranı yüksek olan meme kanserinin, çok ender olarak erkeklerde de görülebileceği bildirilmekteyse de, erkekler arasındaki yaygınlığı %1'dir. Aradaki bu fark meme kanserini kadınlara özgü bir hastalık olarak nitelendirilmesine neden olmaktadır (Parlar ve diğ. 2005).

### 1.1.1. Meme Kanserinde Risk Faktörleri

Pek çok kanserde olduğu gibi meme kanserinin etiyolojisini de tek bir etkene bağlamak mümkün değildir. Özellikle hastalığın gelişiminde etkili olan belirli risk faktörleri tanımlanmıştır (Parlar ve diğ. 2005). Bu risk faktörleri şöyle sıralanabilir:

- Kuşkusuz en önemli faktör cinsiyettir. Erkeklerde, meme kanseri kadınlara göre 146 kat daha az görülür ve görülme oranı %1'den azdır.
- Hastalığın ortaya çıkışında hasta yaşının önemli bir yeri vardır. Genellikle yaşın ilerlemesi ile birlikte meme kanseri görülme sıklığında da bir artış izlenmektedir (Bengisu 2000, Özen 1994). Meme kanserlerinin %90-95'i 40 yaşın üzerindeki kadınlarda görülür (Ünal 1997).
- Bazı hormonların, özellikle östrojenin meme kanseri üzerindeki etkisi çok tartışılmıştır. Birçok çalışmada uzun süre oral kontraseptif kullananlarda meme kanserinin arttığı bildirilmiştir. 10 yıldan fazla kullananlarda risk 4 kat daha fazladır. Menopoz sonrası 10-20 yıl östrojen tedavisi görenlerde risk 1,5-2 kat artmaktadır (Parlar ve diğ. 2005).
- Meme kanserinde aile öyküsü de önemlidir. Meme kanserli kadınların birinci dereceden kadın akrabaları (anne, kız kardeş, kız çocuk vb.) genel nüfusa göre daha büyük risk altındadır (Parlar ve diğ. 2005).
- Kalıtsal vakaların %25'ine kadarı yüksek oranda penetran olan BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53, CDH1 ve STK11 genlerinin bir mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu durum, yaşam boyu %80'e varan meme kanseri olma riskini doğurur. Vakaların %2 -%3'ü ise her biri riskteki iki kat artışla ilişkili olan orta derecede penetran CHEK2, BRIP1, ATM ve PALB2 genlerinin mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (Shiovitz ve Korde 2015).
- Annesinde menopoz öncesi, çift taraflı meme kanseri saptanan kadınlarda risk çok yüksektir. Bu kadınlarda risk 9 kat daha fazladır ve ortalama %50'sinde kanser gelişmesi beklenir (Sağlık Bakanlığı 2000).
- Doğurganlık Dönemi ve Bağlılıları:
  - a. Doğum sayısı ve ilk doğum yaşı önemli bir risk faktörüdür. Hiç doğum yapmamış kadınlar, çocuklu kadınlardan daha büyük risk altındadır. Doğum sayısı arttıkça, hastalık riski azalır. Ancak ikinci doğum 25 yaş altında yapılmışsa ek bir koruyucu etki yapmaktadır. İlk doğumunu 35 yaş üzerinde yapan kadınlarda da risk artmaktadır. Bu istatistiksel veriler kadının yaşamında farklı zamanlardaki hormonal ortam değişikliklerinin riski belirlediğini düşündürmektedir (Parlar ve diğ. 2005).

- b. Bekâr kadınlarda meme kanseri riski evli kadınların iki katıdır. Bu kural özellikle postmenopozal kadınlar için geçerlidir. Premenopozal kadınlarda belirgin bir risk farklılığı oluşmamaktadır.
- c. Erken adet görme ve menopozun gecikmesi, riskin artmasına neden olur. Menapozun geciktiği her yıl için risk %20 azalmaktayken, erken yaşta menopoza girenlerde risk 1/4 oranında artmaktadır. Bu etki hipofiz ve over fonksiyonlarının uzun süre devam etmesine bağlanmaktadır. Yani etken, uzun süre östrojen hormonuna maruz kalmaktır (Sağlık Bakanlığı 2000).
- d. Otuzbeş yaşından önce oofektomi (overlerin cerrahi yolla çıkartılması) olan kadınlarda %75 daha az meme kanseri görülmektedir. Bu etki de yine hipofiz ve over fonksiyonlarının uzun süre devam etmesi ile açıklanabilir (Arsan 1999).
- Meme kanseri tedavisi görmüş kadınlarda ikincil meme kanseri riski ilk kanser tanısından sonraki her yıl için %1 artmaktadır.
  - Fibrokistik hastalık tek başına bir risk faktörü olarak değerlendirilmemektedir. Eğer biyopsiyle hiperplazi, displazi gibi oluşumlar gösterilirse risk 1,5-3,5 kat artmaktadır (Sağlık Bakanlığı 2000).
  - Yüksek doz radyasyon her türlü kanser riskini artırır. Ancak kontrollü radyografiler, örneğin mammografi, kanser riski oluşturmaz (Bengisu 2000).
  - Birçok ülkede meme kanseri sıklığının, insan başına tüketilen yağ, şeker ve protein miktarlarına uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Meme kanseri obez insanlarda normal kilolu insanlardan daha fazla oranda görülmektedir. Şişman kadınlar tarafından üretilen aşırı östrojenin, meme epitel hücrelerinin gelişimini arttırdığı öne sürülmektedir (Criss ve Baysal 1999).
  - Son bulgular devamlı alkol kullanımıyla meme kanseri riskinin artması arasında bir ilişki olduğu yönündedir (Wood ve Hortobagyi 1998, Bengisu 2000, Parlar ve diğ. 2005).

### 1.1.2. Meme Kanserin Belirtileri

Meme kanseri gibi memedeki değişiklikler ile seyreden diğer meme hastalıkları da çoğu kez hasta tarafından fark edilebilir (Bengisu 2000).

- a. Memedeki kitle: Memedeki tüm hastalıkların ortak belirtisidir. Menapoz öncesi ve sonrası en sık karşılaşılan fizik muayene bulgusudur. Kitlelerin %65'i hasta tarafından fark edilir. Yapılan değişik çalışmalar elle hissedilebilen kitlelerin en alt sınırının 1 cm

- olduğunu göstermektedir. Tümör, vakaların %47-50'sinde üst dış, %12- 15'inde üst iç, %2-5 alt dış, %2-5 alt iç kadranda, %15-22'sinde de meme başı ve areolada yer alır (Parlar ve diğ. 2005).
- b. Memedede ağrı: Meme kanserinde sık görülen bir belirti değildir. Seyrek olarak tümör bölgesinde keskin, aralıklı ve hasta tarafından “bıçak saplanır” diye tanımlanan bir ağrıdan söz edilir. Genellikle hastalığın geç dönemlerinde görülür (Parlar ve diğ. 2005).
- c. Meme başında çekilme: Tümör zamanla büyümeye ve etrafındaki dokulara yayılmaya başladığında retraksiyon belirtileri görülür. Subareolar bölgedeki kanserlerde meme başı içeri çekilir (Akyolcu 1985, Arsan 1999).
- d. Meme başında akıntı: Kadınların %20'sinde meme ucundan akıntı gelmesi durumu yaşanır. Genelde temiz sütlü, sarımtırak veya yeşile kaçan akıntılar meme kanseri ile ilişkili değildir. Kanlı veya sulu akıntılar, genellikle tek taraflı veya tek meme dukt ile sınırlı ise anormal olarak kabul edilmekle birlikte anormal akıntıların %10 kadarı kanserdir.
- e. Koltuk altında kitle
- f. Meme derisinde ülser, ödem ve eritem: İnflamatuvar hastalıklarda ve kanserde (Paget hastalığı) görülebilir (Parlar ve diğ. 2005). Tümör hücreleri Cooper ligamentlerindeki lenf damarlarında ilerleyerek, derinin yüzeysel lenf damarlarına ulaşır. Bu damarları tıkamaları sonucu lenf dolaşımı bozularak deride ödem meydana gelir, buna lenfödem denir. Tümör hücrelerinin daha sonra deriye doğru yayılmasıyla deride eritem ve sonra da ülserler meydana gelir (Akyolcu 1985).
- g. Meme derisinde kaşıntı
- h. Portakal kabuğu görünümü (Peau d'orange): Büyüyen kitle Cooper ligamentlerini gererek deride portakal kabuğu görünümünün ortaya çıkmasına neden olur. Bu durum bazı vakalarda açıkça görüldüğü halde, bazı vakalarda tümörün bulunduğu kısım parmaklarla sıkıştırıldığı zaman geçici olarak meydana gelir. Portakal kabuğu görünümü, vakaların oldukça gecikmiş olduğuna işaret eder (Akyolcu 1985, Koçak 2000).
- i. Metastazlarla ilgili belirtiler: Meme kanserlerinde metastaz, lenfatik yolla ve kan yoluyla olur. Meme kanseri vücudun her yerine seyrek de olsa metastaz yapabilir. Örneğin; dil, mandibula, parotis, maksilla, vajen, uterus, vulva gibi organlarda da metastaz yaptığı görülmüştür. Klinikte ilk metastaz belirtileri ise genellikle koltuk altında görülür. Koltuk altında lenf nodülü bulunup bulunmaması meme kanserinin klinik evrelemesinde önem taşır (Akyolcu 1985, Parlar ve diğ. 2005).

### 1.1.3. İnsanda Meme Kanseri Evreleri

İnsanda meme kanseri genel olarak 5 evre olarak sınıflandırılmaktadır (AJCC 2015). Bunlar: Evre 0: Karsinom *in situ* olarak adlandırılır. Bu evre kendi içerisinde ikiye ayrılmaktadır. Bunlar; Lobüler karsinom *in situ* ve Duktal karsinom *in situ* şeklindedir. Lobüler karsinom *in situ* (LCIS) lobüldeki anormal hücelere karşılık gelmektedir. Bu anormal hüceler yüksek risk göstergesidir. Öte yandan Duktal karsinom *in situ* (DCIS) ise duktal kanaldaki kanser öncesi durumdur. DCIS aynı zamanda intraduktal karsinom olarak da adlandırılır. Anormal hüceler, kanalın dışına çıkıp etrafındaki meme dokusuna yayılmamıştır. Fakat bazen DCIS tedavi edilmezse yayılabilen kansere dönüşebilmektedir (AJCC 2015).

Evre 1: Yayılabilen meme kanserinin başlangıç safhası olarak ifade edilmektedir. 1. Evre, tümörün 2 cm'den daha geniş olmadığı ve kanser hücrelerinin memeden başka yere (lenf bezlerine) yayılmadığı durumdur.

Evre 2: İki şekilde tanımlanmaktadır:

- Evre 2A: Memede tümör yoktur ancak koltuk altındaki lenf bezlerinde kanser vardır. Ya da tümör 2 cm veya daha küçüktür ve koltuk altındaki lenf bezlerine yayılmıştır. Ancak tümör 2 cm'den büyük 5 cm'den küçük ise koltuk altı lenf bezlerine yayılmamıştır.
- Evre 2B: Tümör 2 cm'den büyük, 5 cm'den küçüktür ve koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır veya 5 cm'den büyüktür ancak koltuk altı lenf bezlerine yayılmamıştır.

Evre 3: Üç şekilde tanımlanmaktadır:

- Evre 3A: Bu tipte memede tümör yoktur. Ancak koltuk altı lenf bezlerinden birbirine veya çevre dokulara yapışık kanser vardır; veya tümör 5 cm veya daha küçüktür ve çevre dokulara veya birbirine yapışık koltuk altı lenf bezlerine yayılmıştır; veya tümör 5 cm'den büyüktür ve koltuk altı lenf bezlerine (birbirlerine veya çevre dokulara yapışık olabilir) yayılmıştır.
- Evre 3B: Tümör herhangi bir boyutta olabilir ve memeye komşu dokulara (deri veya göğüs duvarı, kaburgalar veya göğüs duvarındaki kaslar) yayılmıştır. Meme içerisindeki lenf nodlarına veya koltuk altındaki lenf nodlarına yayılabilir.
- Evre 3C: Kanser köprücük kemiği altındaki ve komşu boyun boyunca uzanan lenf nodlarına yayılmıştır ve koltuk altındaki ve meme içerisindeki lenf nodlarına ve memeye komşu dokulara yayılabilir. Evre 3C de kendi içerisinde operabl (ameliyat edilebilir) ve inoperabl (ameliyat edilemez) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır:
  - Operabl Evre 3C: Kolun altındaki lenf nodlarında 10 veya daha fazla sayıda lenf nodunda tutulum vardır veya memedeki tümörle aynı taraflı köprücük kemiği

altındaki lenf nodları ve komşu boyun lenf nodlarında yayılım vardır veya meme içindeki lenf nodları ve kolun altındaki lenf nodlarında yayılım vardır.

- İnoperabl Evre 3C: Kanser köprücük kemiği üstündeki lenf nodlarına yayılmıştır ve memedeki tümörle aynı taraftaki komşu boyun bölgesindeki lenf nodlarında tutulum vardır.

Evre 4: Uzak metastatik kanserdir. Kanser uzak diğer organlara sıçramıştır.

## 1.2. Primer Hücre Kültürü

Primer hücre kültürü, dokudan farklı metotlar kullanılarak doğrudan elde edilen hücrelerin büyütülmesi ile oluşturulan hücre kültürü sistemidir. Primer kültür, doku veya organdan biyopsi örneğinin (1 cm<sup>3</sup>) alınması ile başlar. Doku düzenindeki hücreler, hücreler arası ve hücre bazal zarı veya hücre matrisi bağlantılarına sahiptir. Kültürlenecek hücrelerin öncelikle bu bağlantılardan kurtulmaları gerekir (tek hücre süspansiyonu). Hücrelerin ayrılmasında, tripsin veya kollajenaz gibi çeşitli proteolitik enzimlerin kullanıldığı ve cerrahi bıçaklarla dokuyu bölme (dokunun kıyılması) gibi mekanik ayırma yöntemlerinin kullanıldığı enzimatik veya kimyasal muamele yöntemleri mevcuttur. Bu şekilde elde edilen hücre süspansiyonları seri dilüsyon ve santrifüjleme işlemleri ile saflaştırılır. Kültür kaplarına aktarılır. Hücresel bağlantılardan serbest bırakılan birçok hücre kültür kabına yapışır. Yapışmayan hücreler ve artıkları hücre ortamından çıkarıldıktan sonra primer kültür işlemi tamamlanır. Bununla birlikte başlangıçta primer kültürlerde elde edilmek istenen hücreler dışında, özellikle fibroblastların ve farklı hücre tiplerinin de kültür kabına yapıştığı gözlenebilmektedir. Daha sonra pasajlama yoluyla elde edilen ikincil kültürlerde, istenen hücre tipine özgü büyüme faktörlerinin eklenmesi ile, belirli bir hücre tipinin çoğalması ve kültürde istenmeyen hücrelerin baskılaması sağlanabilir (Ng ve Schantz 2010, Fauza ve Bani 2016).

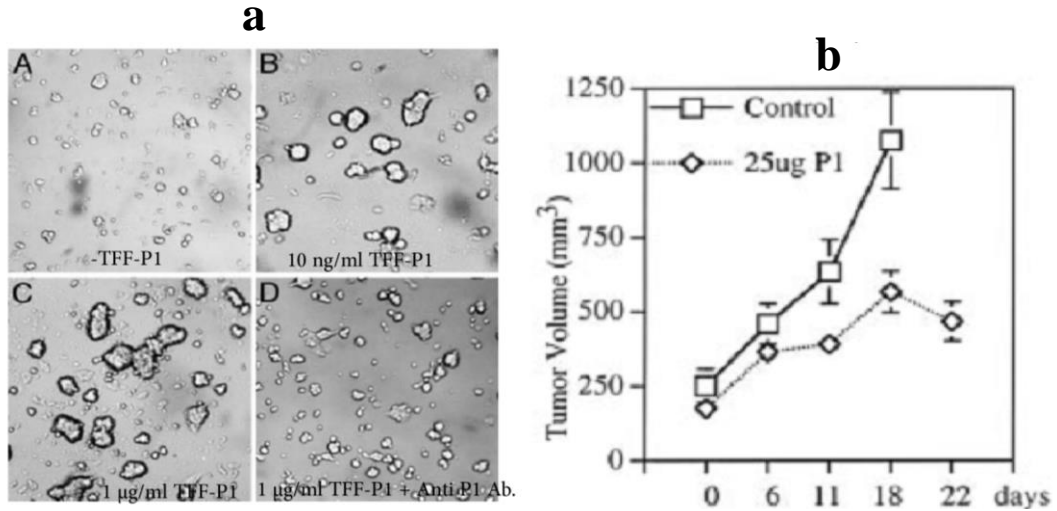
Primer kültürdeki hücreler, normal dokularda temsil ettikleri hücrelerin durumunun en yakın formları olmaları bakımından oldukça önemlidir. Ancak, bazen bu durum dezavantajları da beraberinde getirebilir. Bunlardan en önemlisi kültüre edilen bu hücrelerin sınırlı ömürleridir. Bu nedenle, bu hücreler seri geçişlerle çoğaltılmalı ve saklanmalıdır. Primer kültürlerde karşılaşılan bir diğer önemli sorun da hücreler *in vivo* koşullardan çıkarıldığında ve kültür ortamına aktarıldığında, yapısal ve fonksiyonel özelliklerini kaybedebilecek olmalarıdır. Bu bakımdan, canlılarda doku düzeyinde tamamen farklı morfolojiye sahip hücreler, kültür ortamında benzer morfolojileri gösteremeyebilmektedir (Uysal ve diğ. 2018).

### 1.3. Tümör Farklılaşma Faktörü (TFF)

#### 1.3.1. TFF'nin Keşfi ve Moleküler Özellikleri

TFF'nin varlığı ilk defa Platica ve diğ. (2004)'nin yapmış oldukları çalışma ile ortaya konmuştur. Söz konusu çalışmada, steroide duyarlı ve steroide dirençli çeşitli prostat ve meme kanseri hücre hatlarının yanı sıra, sağlıklı ve kanserli yapıdaki farklı hücre hatlarının hipofiz bezi ekstraktı ile birlikte kültürasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan kültürasyonlar neticesinde kullanılan meme ve prostat kanseri hücrelerinin farklılaşarak agregatlar ve küremsi yapılar oluşturdukları saptanmıştır (Çizim 1.1a). Bu durumu yaratan nedenin bulunmasına yönelik yapılan çalışmalarda, hipofiz bezi tarafından salgılanan daha önce tespit edilmemiş 108 aminoasitlik bir proteine ulaşılmıştır. Bu proteine, tümör hücreleri üzerinde neden olduğu farklılaştırma etkisi nedeni ile "tümör farklılaştırma faktörü" adı verilmiştir (Sokolowska ve diğ. 2012).

Literatürde TFF'ye ilişkin yapılan az sayıda çalışma olmasına rağmen elde edilen veriler TFF'nin hem prostat hem de meme kanseri hücrelerinde tümörün ortadan kaldırılması adına etkili olabileceğini göstermektedir (Platica ve diğ. 2004, Roy ve diğ. 2012, 2013a, 2013b, Samakoglu ve diğ. 2012, Sokolowska ve diğ. 2012, 2013, Woods ve diğ. 2014).



**Çizim 1.1.** Tümör Farklılaşma Faktörü P1 Peptidinin Farklılaştırma Etkisi

a: TFF-P1 peptidinin *in-vitro*'da meme tümörü üzerine etkinliği, b: TFF-P1 peptidinin *in-vivo*'da prostat tümörü üzerindeki etkinliği (Platica ve diğ. 2004).

Platica ve diğ. (2004)'nin yapmış oldukları çalışma kapsamında hipofiz bezinden elde edilen mRNA havuzu kullanılarak sentezlenen cDNA'lar ile bir cDNA kütüphanesi

oluşturulmuştur. Elde edilen cDNA kütüphanesindeki okuma çerçeveleri bakteriofaj sistemi kullanılarak *E. coli*'de sentezlenmiştir. Yapılan taramalar sonucunda pozitif olduğu saptanan fajlara sekanslama yapılmış ve daha önceden tanımlanmamış bir ORF (open reading frame - açık okuma bölgesi) varlığı tespit edilmiştir (Platica ve diğ. 2005). Devam eden çalışmalar sonucunda söz konusu ORF'den sentezlenen proteinin tümör hücrelerinde gözlenen farklılaşmaya neden olan faktör olduğu görülmüş ve bu proteine "Tümör Farklılaştırma Faktörü" ya da kısaca "TFF" adı verilmiştir. TFF, seçici olarak kanserli hücrelerin kümeler oluşturarak farklılaşmasını sağlamaktadır. Hücrelerin kötü huylu (malignant) özelliklerini kaybetmelerine ve iyi huylu bir yapıya (benign) dönüşmelerine neden olmaktadır (Çizim 1.1b) (Platica ve diğ. 2004, Sokolowska ve diğ. 2013). TFF proteininin terapötik etkiye sebep olan aktif bölgesinin tespit edilebilmesi amacı ile bütüncül protein zincirinden seçilen ardışık 20'şer aminoasitlik 4 adet polipeptit zinciri ayrı ayrı *E. coli*'de sentezlenmiştir. Bu şekilde elde edilen polipeptitler ile yapılan *in vitro* testlerde, söz konusu terapötik etkiye neden olan bölümün proteinin N-ucundan seçilen 20 aminoasitlik polipeptit zincirine ait olduğu saptanmıştır (Platica ve diğ. 2004). Saptanan 20 aminoasitlik bu kısma TFF-P1 adı verilmiştir (Çizim 1.2).

NH<sub>2</sub> Ucu-RESQGTRVGGQALSFLCKGTA-COOH Ucu

### Çizim 1.2. TFF-P1 Peptit Sekansı

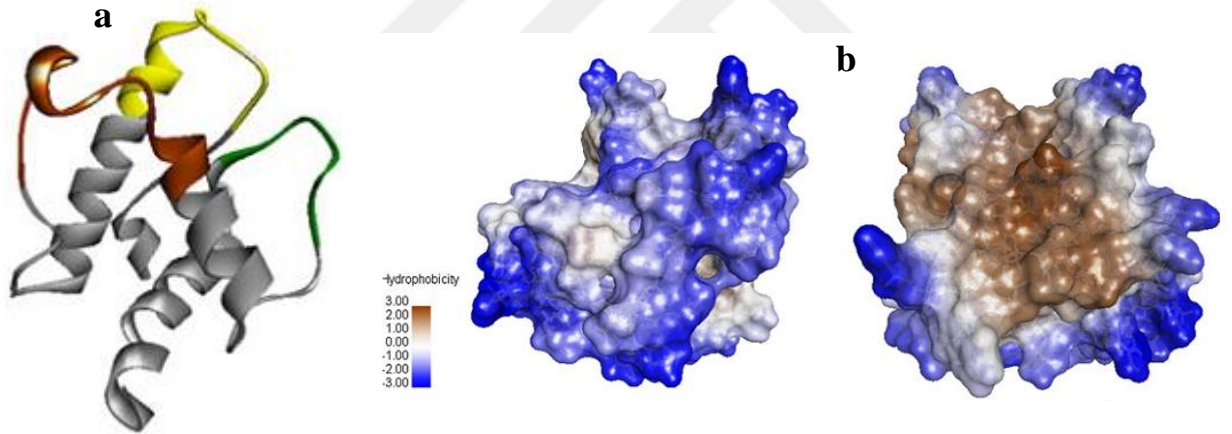
Literatürde tümör farklılaşma faktörü ile yapılan çalışmalara dair toplam 8 adet makale vardır. Bu çalışmalardan elde edilen moleküler düzeydeki bilgiler göstermektedir ki *E. coli*'de üretilen TFF'nin terapötik amaca uygun değildir. TFF'nin terapötik olarak kullanılabilmesi için bütüncül formdaki TFF'ye ihtiyaç vardır.

#### 1.3.2. TFF'nin Etki Mekanizması

Konu ile ilgili yapılan öncül ve güncel çalışmalarda, TFF'nin hücrelerin membranlarına bağlanmakta olduğu ve bu nedenle de etkisini potansiyel reseptörler üzerinden gösterdiği ve bu reseptörlerin tanımlanması gerektiği vurgulanmıştır (Sokolowska ve diğ. 2012). Söz konusu yüzey reseptörünün üç farklı membran proteininin kombinasyonundan oluşan bir tür multiprotein kompleksi olduğunu tahmin edilmektedir. Bu multiprotein kompleksinin tanımlanması amacı ile affinite kolon kromatografisi ve *in silico* modelleme tekniklerinden



faydalanılmıştır, TFF-P1'in meme ve prostat tümörü hücreleri ile inkübe edilmesinden sonra farklılaşan bu hücre hatlarından protein özütleri hazırlanmıştır (Roy ve diğ. 2013a). Hazırlanan bu özütler Anti-TFF-P1 antikoru içeren bir afinite kolonundan geçirilmiş ve kolonu bağlayan proteinler kolondan indirildikten sonra kütle spektroskopisi ile tanımlamaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre söz konusu multiprotein kompleksinin GRP78, HSP70 ve  $\alpha_2$  Makroglobülin ve/veya Cripto proteinlerinin uygun şekilde bir araya gelmesi ile oluşabileceği sonucuna varılmıştır. Bu kapsamda yapılan *in silico* modellemelerin de deneysel verileri destekler nitelikte olduğu ayrıca görülmektedir (Sokolowska ve diğ. 2012). Aynı grup tarafından takip eden bir başka çalışmada söz konusu multiprotein kompleksinin GRP78 ve HSP70 proteinlerine ek olarak HSP90 proteinini de içermekte olduğu ifade edilmektedir (Roy ve diğ. 2013a). Oluştugu hipoteze edilen üçlü kompleks ve ona bağlanmış haldeki TFF-P1'in 3-boyutlu moleküler yapısı, yine aynı çalışmada gerçekleştirilen *in silico* modelleme çalışması ile de gösterilmiştir (Çizim 1.3).



**Çizim 1.3.** TFF Proteinine Dair 3-Boyutlu Modelleme Sonuçları

a: TFF proteinine ait sekonder yapıları gösteren model. b: TFF proteininin yüzey hidrofobisitesine ait elektrostatik etkileşimlerin gösterildiği modeller (Roy ve diğ. 2013b).

### 1.3.3. TFF'nin Rekombinant Olarak Üretimi

TFF-P1 ve TFF proteinlerinin *E. coli*'de başarılı bir şekilde üretimine dair iki temel çalışma vardır. Bu çalışmalar Platica ve diğ. tarafından 2004 yılında ve Roy ve diğ. tarafından 2012 yılında yapılmıştır. Her iki çalışmada da *E. coli*'de yapılan üretim sonrasında hem bütün olarak üretilen TFF'nin, hem de TFF-P1'in çözünemeyen fazda kaldığı görülmüştür. Bu nedenle ancak üre gibi kaotropik ajanların kullanımı ile denatüre halde saflaştırılabildiği gösterilmiştir. Bu durumun temel nedeni: TFF'nin doğal formunun üretim sırasında yoğun

biçimde post-translasyonel olarak değişime uğramasıdır. Yapılan deneylerde TFF üzerindeki post-translasyonel değişimlerin oldukça yoğun olduğu ve *E. coli*'de üretilen bütüncül formun dokudan izole edilen doğal formdan 33kD daha düşük molekül ağırlığına sahip olduğu gösterilmiştir (Sokolowska ve diğ. 2012). Ancak görülen post-translasyonel değişimlerin karakteri hakkında yapılmış detaylı bir çalışma henüz yoktur. *E. coli*'de üretilen TFF ve TFF-P1 kullanılarak yapılan *in vitro* denemelerde, her iki formun da proteinin doğal formuna kıyasla çok daha düşük aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Platica ve diğ. 2004). Bu durum, *E. coli*'de üretilen formların kan dolaşımında kalış sürelerinin de düşük olması ile birlikte değerlendirildiğinde, söz konusu proteinin terapötik amaçlı kullanımı için doğal formda üretilmesini gerekli hale getirmektedir.

Bu nedenle, çalışmamız kapsamında TFF'nin doğal formuna en yakın olan formun elde edebilmesi amacı ile insan embriyonik böbrek hücre hattında (HEK293F) rekombinant TFF üretimi yapılmıştır. Bu hücre hattı, ticari şirketler tarafından da üretim amacı ile sık tercih edilen hücre hatlarından (Dumont ve diğ. 2015). HEK293F hücre hattının stabil transfeksiyona yatkın olmaması nedeni ile TFF proteinini eksprese edebilmek için bu hücre hattına geçici olarak transfeksiyon yapılmıştır.

#### **1.4. Terapötik Proteinler**

Proteinler hücrede biyokimyasal reaksiyonları katalizlemekten hücresel iskeleti oluşturmaya, reseptör ve taşıyıcı olarak görev almaya kadar uzanan çeşitli dinamik rollere sahiptir. Günümüzde insan genomunda protein kodlayan 20.000-22.000 farklı gen olduğu tahmin edilmektedir (Salzberg 2018). Genlerin alternatif birleşmeleri (splicing) ve proteinlerin post-translasyonel modifikasyonu (örneğin, fosforilasyon, asilasyon ve glikozilasyon yoluyla) fonksiyonel olarak birbirinden farklı proteinlerin sayısının çok daha yüksek olması beklenmektedir. Hastalık mekanizmaları açısından bakıldığında bu tahminler modern tıp için büyük bir zorluk teşkil etmektedir. Çünkü hastalık durumu, proteinlerin fonksiyonlarında meydana gelebilecek bozuklukların yanında ekspresyonlarındaki artış ya da azalışlardan da kaynaklanabilir. Bununla birlikte, terapötikler açısından bakıldığında bu tahminler, hastalığın hafifletilmesi için protein terapötiklerinin kullanılması açısından büyük bir fırsatı temsil etmektedir (Leader ve diğ. 2008). TFF'nin keşfi ve olası terapötik potansiyelinin test edilmesi de bu kapsamda ele alınmalıdır.

TFF'ye dair bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde söz konusu proteinin terapötik potansiyeli ve bu potansiyelini hangi mekanizma üzerinden gerçekleştirdiği üzerinde

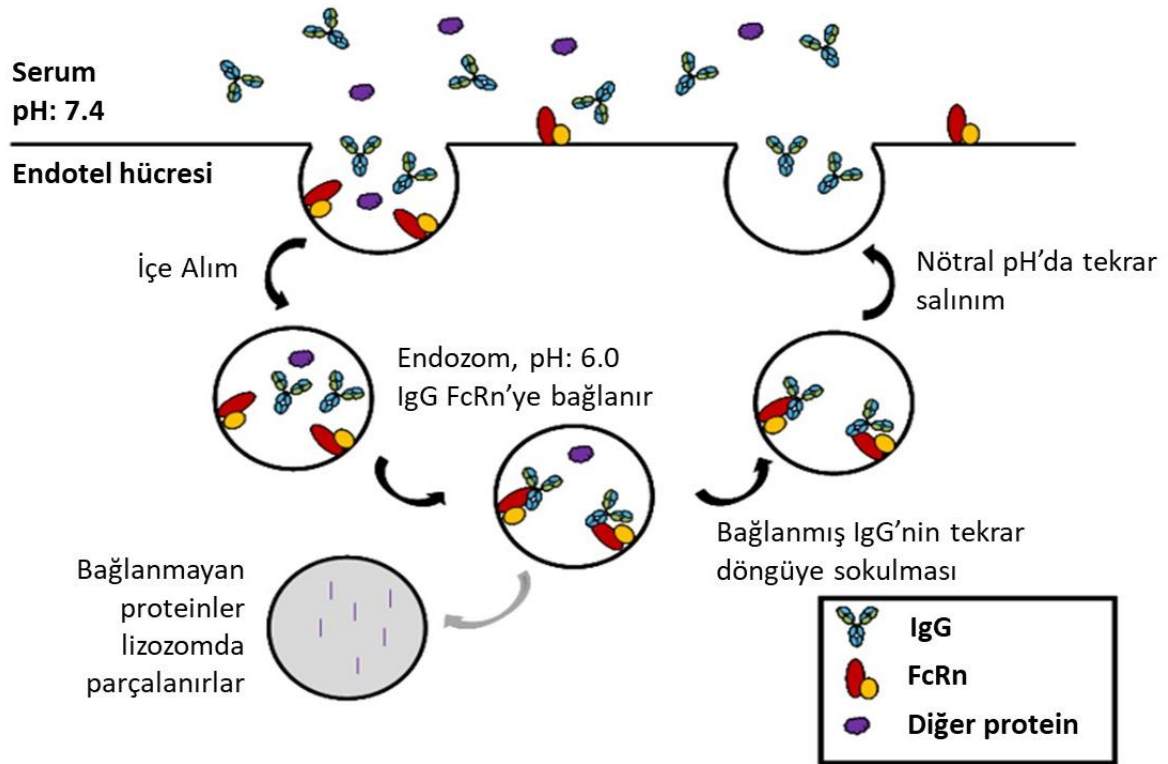
durulmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında TFF'nin bütüncül yapıda kullanılmaması, bunun yerine TFF-P1 peptidinin kullanılması nedeni ile terapötik potansiyeli yalnızca kısmen görülebilmektedir. Yapılan *in vivo* denemelerde, TFF-P1 peptidi aşılana farelere günde iki kez enjeksiyon yapılması gerekmiştir. Bu şekilde alınan sonuçlara göre tümör hacminin azaldığı tespit edilmiştir (Platica ve diğ. 2004). Klinik denemelerin amaçlandığı bir süreçte bu denli sık dozlamamanın teknik açıdan uygulanabilirliği mümkün değildir. Bu nedenle, TFF'nin gözlenen terapötik potansiyelini daha da arttıracak şekilde uzun vadede klinik açıdan uygulanabilir nitelikte bir protein tasarımına ihtiyaç duyulmaktadır.

#### **1.4.1. Protein Terapötiklerinin Yarılanma Ömürleri**

Proteinlerin dolaşımdan temizlenmesinde çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Özetle bu mekanizmalar: periferik kan yardımı ile proteoliz sonucu temizlenme, renal-hepatik temizlenme ve reseptör yardımcı endositoz ile temizlenme olarak sayılabilir (Tang ve diğ. 2004). Küçük boyuta sahip, düşük moleküler kütleye sahip moleküller renal filtrasyon ve parçalanma ile kandan hızla temizlenirler. Bu bağlamda, söz konusu kritik aralık 40-50 kDa arasındadır. Renal temizlenmeden sorumlu olan temel yapı glomerüler filtrasyon bariyeridir. Bu yapı fenestre endotel, glomerüler bazal zar ve podosit ayak süreçleri arasında bulunan yarık diyaframından oluşmaktadır. Glomerüler endotel hücreleri arasındaki fenestranın moleküllerin serbest difüzyonuna olanak sağlayabilecek kadar geniş olmasına (50-100 nm) karşın, yarık diyaframı eşit büyüklükte (sıklıkla ~4-5 nm çapında ve en azı 8-10 nm büyüklüğünde) delikler ile nihai makromoleküler bariyeri teşkil etmektedir. Bunun ötesinde, endotel hücrelerin proteoglikanları ve glomerüler filtrasyon bariyeri anyonik bir bariyer oluşturmaktadır. Bu bariyer negatif yüklü plazma makromoleküllerinin geçişini kısmi olarak sınırlandırmaktadır. Sonuç olarak, bir protein terapötüğün büyüklüğü (yani hidrodinamik çapı), fizikokimyasal nitelikleri ile birlikte yarılanma ömrünün artırılması için bir başlangıç noktası teşkil edebilmektedir.

Serumda albumin ve immünoglobülin G (IgG) gibi bazı plazma proteinleri 2-4 hafta gibi sıradışı uzunlukta yarılanma ömürlerine sahiptirler. Bu uzun yarılanma ömürleri, söz konusu proteinleri diğer plazma proteinlerinden açık bir biçimde ayırmaktadır. Bahsi geçen uzun yarılanma ömrü, neonatal Fc (FcRn, Brambell) reseptörü tarafından geri çevrim yapılması ile sağlanmaktadır. Buna göre, albumin ve IgG'ler erken endozomun asidik ortamı içerisinde makropinositoz ile pH'ya bağlı mekanizma sonucunda endotel hücreleri tarafından içeri

alınmaktadır. Bağlanma, albümin ve IgG'yi lizozomal kompartmandaki yıkımdan uzak tutmakta ve plazma membranına aktarılmasını sağlamaktadır. Buradan da nötr pH'daki (pH= 7,4) kan plazması içerisine salınımları yapılmaktadır (Çizim 1.4). Bu durum, IgG Fc bölgesine veya albümine füzyonu gerçekleştirilen proteinlerin yarılanma ömürlerinin düzenlenebilmesini veya artırılabilmesini sağlayabilmektedir (Kontermann 2009).



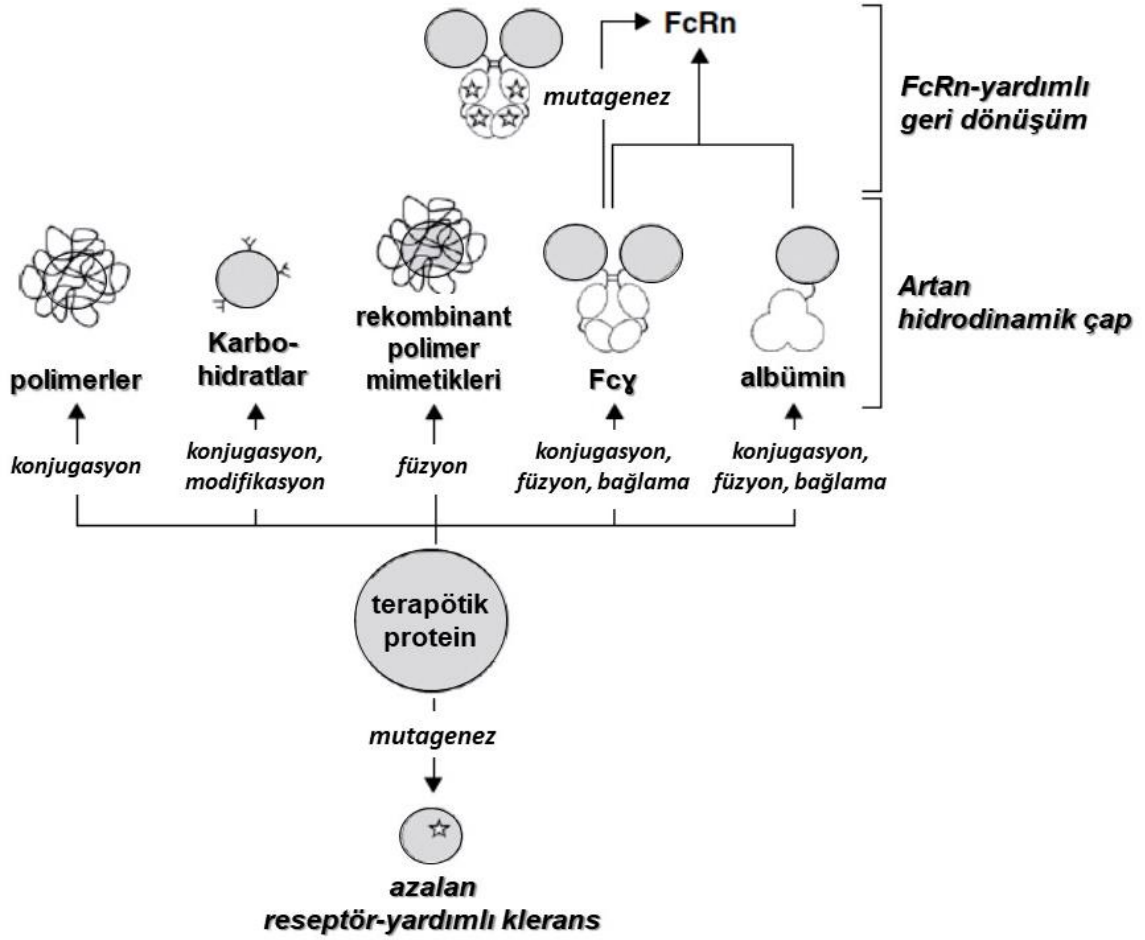
**Çizim 1.4.** IgG'nin FcRn Aracılığı ile Tekrar Dolaşıma Alınması  
Absolute antibody (2019)'den derlenmiştir.

Özet olarak, terapötik bir molekülün yarılanma ömrünün artırılmasına yönelik çalışmalar kapsamında sıklıkla ilk tercih edilen strateji, söz konusu molekülün hidrodinamik hacminin artırılması, ikincil olarak ise FcRn yardımcı döngü ile kanda kalış süresinin uzatılması şeklinde olmaktadır.

Bu kapsamda, Platica ve diğ. (2004)'nin yapmış oldukları çalışmada hem *in vitro*, hem de *in vivo* etkinliğin test edilebilmesi amacı ile TFF-P1 peptidinden faydalanılmıştır. Ancak, söz

konusu peptidin renal atılımı, yaklaşık 2 kDa ağırlığında olması nedeni ile oldukça hızlı gerçekleşmektedir. Bu nedenle, tümör hacminin küçülmesi ile sonuçlanan *in vivo* çalışmalarda SCID farelere yapılan enjeksiyonların günde iki kez yapılması gerekmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda TFF proteininin P1 peptidi yerine, bütüncül TFF proteininin kullanımı hedeflenmiştir. Bu yolla yalnızca renal temizlenmenin minimize edilmesi yönünde değil, aynı zamanda bütüncül proteinin kullanımı nedeni ile P1 peptidine kıyasla daha fazla tümör farklılaşma etkisinin elde edilecek olması amaçlanmıştır. Bu beklenti, söz konusu çalışmaya dair yapılan *in vitro* çalışmalarda bütüncül proteinin P1 peptidi ile kıyaslandığında çok daha etkin sonuçlar verdiği yönündeki ifadeye dayandırılmaktadır.

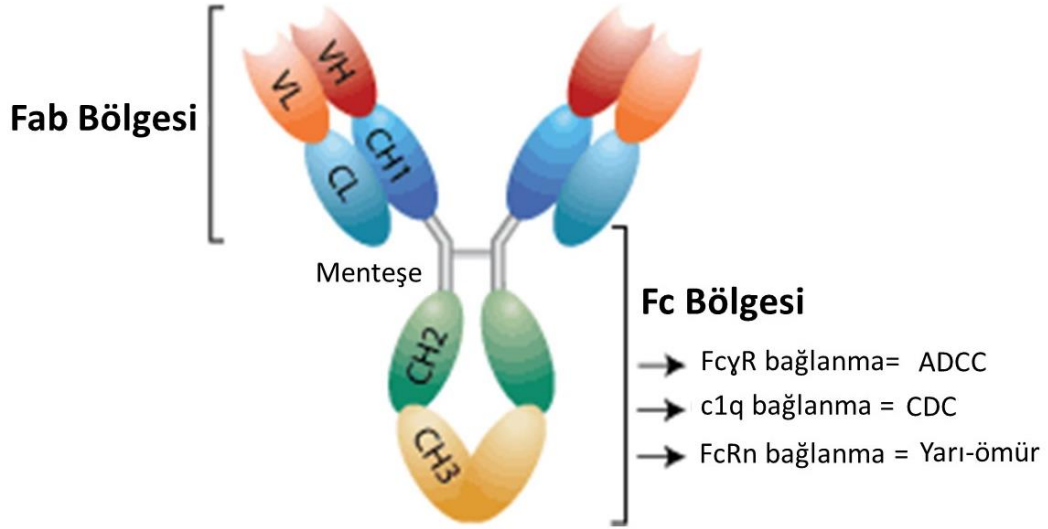
TFF proteininin terapötik amaçlı olarak kullanılabilmesi için kanda kalış süresinin maksimize edilmesi zorunludur. Bu kapsamda, bütüncül TFF proteininin kullanımı ile renal temizlenmenin minimize edilmesi mümkün olmuş olsa dahi immün sistemin kendi dinamiklerinin de söz konusu sürece dahil edilmesi, elde edilecek olan nihai etkiyi en üst seviyeye taşıyacaktır. Bu kapsamda, neonatal Fc reseptörünün de kullanılabileceği şekilde bir tasarım yapılarak proteinin kandaki dolaşımının en üst seviyeye çıkartılabilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, yapılan tasarımda eksprese edilecek olan bütüncül formdaki TFF proteininin C-ucuna immüoglobülin G1-Fc bölgesi eklenmiştir. Bu sayede elde edilen molekülün toplam büyüklüğü yaklaşık olarak bütüncül bir antikorun büyüklüğüne yakın (~150 kDa kadar) hale getirilmiştir. Böylelikle renal temizlenmenin büyük ölçüde azaltılması sağlanmıştır. Aynı zamanda molekülün tasarımında bulunan Fc bölgesi sayesinde FcRn reseptörüne bağlanarak kandaki dolaşımının süresinin büyük ölçüde artırılabilmesi hedeflenmiştir (Çizim 1.5).



**Çizim 1.5.** Terapötik Proteinlerin Yarı-ömürlerinin Artırılması Yöntemleri Kontermann (2011)'dan uyarlanmıştır.

#### 1.4.2. Füzyon Partneri Olarak IgG1-Fc

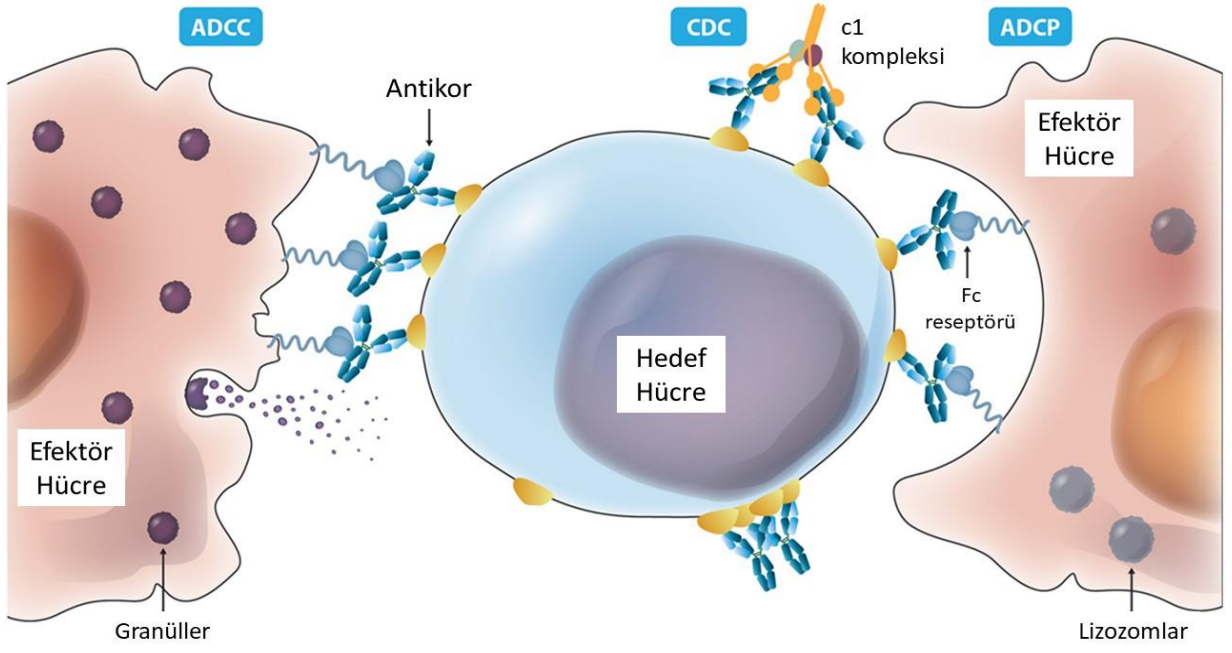
Rekombinant proteinlerin kandaki dolaşım sürelerinin arttırılması amacı ile IgG-Fc bölgesi ile konjuge halde üretimleri gerçekleştirilebilmektedir (Kontermann 2011). Antikor Fc bölgesi, sahip olduğu immün yanıtı tetikleyici özelliği nedeni ile bağışıklık sistemi efektör hücrelerini birleştirerek veya tamamlayıcı kaskadı aktive ederek bağışıklık aracılı hücre ölümünü ortaya çıkarma potansiyeline sahiptir (Çizim 1.6).



**Çizim 1.6.** IgG-Fc Bölgesi  
Invivogen (2019)'den derlenmiştir.

Antikor Fc bölgesinin aktivasyonu ile bağışıklık-aracılı hücre ölümünü gerçekleştiren sistemlerden biri kompleman sistemidir. Fc bölgesi ile gerçekleşen yüksek düzeydeki etkileşimi patojenlerin ortadan kaldırılmasına yol açmaktadır. Serum ve hücre yüzey proteinlerinden oluşan bu sistem, c1 proteininin, yüzey antijenlerine bağlanmış iki veya daha fazla Fc bölgesi ile etkileşimi yoluyla aktive edilebilmektedir (Nimmerjahn ve Ravetch 2008). İşlem, c1q'nın, antikorun Fc kısmına bağlanmasıyla başlatılır. Kompleman kaskadı aktivasyonu, ozmotik şişmeye ve hücre yırtılmasına neden olur. Hedef hücre zarı boyunca suyun ve iyonların serbest dolaşımını sağlayan birkaç membran saldırı kompleksinin oluşması ile sonuçlanır. Bu da hücrenin lizisine neden olur. Ancak kompleman düzenleyici proteinlerin membrandaki aşırı ekspresyonu nedeniyle CDC'ye (komplemana bağlı sitotoksinite) karşı direnç gelişimi bazı tümör tiplerinde belirgindir (Çizim 1.7) (Yan ve diğ. 2008, Griggs ve Zinkewich-Peotti 2009).





**Çizim 1.7.** CDC, ADCC ve ADCP İmmün Yanıtları Almagro ve diğ. (2018)'den derlenmiştir.

Fc yapıları, makrofajlar gibi fagositik hücelere ait yüzey reseptörleri ( $Fc\gamma RI$ ) ile etkileşime girebilir. Fc etkileşimini takip eden sinyal iletimi, antikora bağlı hüresel fagositoz (ADCP) adı verilen bir işlem yoluyla fagositozu ve antikorun bağlı olduğu hücrenin öldürülmesini teşvik eder. Bunun yanı sıra hücre yüzeylerinde bulunan Fc yapıları ayrıca sitolitik granüllerin serbest bırakılmasını tetikleyen immün efektör hücrelerin (doğal öldürücü (NK) hücreler ve makrofajların) Fc reseptörleri ( $Fc\gamma RIII$ ) ile etkileşime girebilir. Bu işlem de antikora-bağımlı hüresel sitotoksiste (ADCC) olarak adlandırılır (Çizim 1.7).

Antijen sunum kapasitesine sahip hücrelerin ADCP'si de adaptif bağışıklık sistemini devreye sokma potansiyeline sahiptir. Melanom hücrelerindeki  $Fc\gamma RIIB$  ekspresyonunun ADCC'ye karşı duyarlılığı azalttığı öne sürülmesine rağmen ADCC ve ADCP'ye karşı direnç mekanizmalarının nasıl geliştiği ile ilgili bilgiler sınırlıdır (Cassard ve diğ. 2008, Griggs ve Zinkewich-Peotti 2009).

İnsan  $Fc\gamma$  reseptörleri, B hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar, mast hücreleri, NK hücreleri ve nötrofiller gibi birçok immün hücre popülasyonu tarafından eksprese edilmektedir (Desjarlais ve diğ. 2007, Griggs ve Zinkewich-Peotti 2009). Çizelge 1.1'de özetlendiği gibi aynı zamanda Fc etki alanlarıyla meşgul olduklarında sinyal iletim aktivitelerine göre gruplandırılabilirler. Aktivatör Fc reseptörlerinin bağlanması, ADCC ve



fagositoz dâhil olmak üzere hücresel fonksiyonların aktivasyonu ile sonuçlanan sitoplazmik immün reseptör tirozin-tabanlı aktivatör motif (ITAM) alanının ve daha sonra sinyal iletim kaskadının fosforilasyonu ile sonuçlanır. Buna karşılık, inhibitör reseptör Fc $\gamma$ RIIb'nin birleşmesi, sitoplazmik immün reseptör tirozin-tabanlı inhibitör motif (ITIM) alanının fosforilasyonuna ve efektör tepkisinin aşağı regülasyonuna neden olur. Fc $\gamma$ RIIb'nin fizyolojik rolleri çeşitli ve karmaşıktır. İmmün aktivasyonun negatif regülatörü bağlamında, B hücresi aktivitesinin düzenlenmesinde, humoral toleransı modüle etmede ve plazma hücresi sağkalımını düzenlemede önemli bir rol oynar. Özellikle antikör terapötikleri ile ilgili olduğu için, alıcının hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerini düzenlemedeki önemini göstermek için birçok çalışma yapılmıştır (Nimmerjahn ve Ravetch 2008, Griggs ve Zinkewich-Peotti 2009). Antikorlar tarafından immün hücre birleşmesinin sonucu, aktiveleştirici ve inhibitör Fc reseptörü bağlanması dengesi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir.

Bireysel Fc reseptörlerinin IgG izotiplerine olan afinitelerinde, Fc $\gamma$  reseptörü ekspresyon profiline bağlı olarak önemli farklılıklar bulunmaktadır. IgG1 ve IgG3, temel aktif insan izotipleri olarak kabul edilir (Dijstelbloem ve diğ. 2001, Nimmerjahn ve diğ. 2005, Griggs ve Zinkewich-Peotti 2009).

**Çizelge 1.1.** İnsan ve Farede bulunan Fc $\gamma$  Reseptörleri Griggs ve Zinkewich-Peotti (2009)'den derlenmiştir.

Reseptör	CD	Aktivatör İnhibitör	IgG için Relatif Afinite	Yapısal sinyalizasyon bileşenleri	Alelik Varyantlar	Fonksiyonel mürin analoğu	Efektör-hücre ekspresyon profili <sup>a</sup>				
							m $\Phi$	DC	N	B	NK
<i>İnsan</i>											
Fc $\gamma$ RI	CD64	Aktivatör	Yüksek <sup>b</sup>	ITAM (asosiye $\gamma$ -zinciri)		Fc $\gamma$ RI	●	●	●		
Fc $\gamma$ RIIa	CD32a	Aktivatör	Düşük/Orta	ITAM (integral)	131H 131R	Fc $\gamma$ RIV	●	●	●		
Fc $\gamma$ RIIb	CD32b	İnhibitör	Düşük/Orta	ITIM (integral)	232I 232T	Fc $\gamma$ RIIb	●	●	●	●	
Fc $\gamma$ RIIc	CD32c	Aktivatör	Düşük/Orta	ITAM (integral)			●		●		●
Fc $\gamma$ RIIIa	CD16a	Aktivatör	Düşük/Orta	ITAM (asosiye $\gamma$ -zinciri)	158V 158F	Fc $\gamma$ RIII	●	●			●
Fc $\gamma$ RIIIb	CD16b	Aktivatör	Düşük/Orta	Sinyalizasyon yapmayan	NA1 NA2				●		
<i>Fare</i>											
Fc $\gamma$ RI		Aktivatör	Yüksek	ITAM (asosiye $\gamma$ -zinciri)			●	●			
Fc $\gamma$ RIIb		İnhibitör	Düşük/Orta	ITIM (integral)			●	●	●	●	
Fc $\gamma$ RIII		Aktivatör	Düşük/Orta	ITAM (asosiye $\gamma$ -zinciri)			●	●	●		●
Fc $\gamma$ RIV		Aktivatör	Düşük/Orta	ITAM (asosiye $\gamma$ -zinciri)			●	●	●		

DC= Dendritik hücre; ITAM=immün reseptör tirozin-tabanlı aktivatör motif; ITIM= immün reseptör tirozin-tabanlı inhibitör motif; m $\Phi$ =maktofaj; N=nötrofil; B=B hücresi; NK=doğal öldürücü hücre.

a: Fc-reseptörü ekspresyonu değişkendir ve belirli hücre popülasyonlarında modüle edilebilir. Örneğin: sitokin sinyalizasyonu ve aktivasyon durumu ile paylaşılan verilerin Fc aracılı immün yanıtlarda rol alan anahtar efektör hücre popülasyonları üzerindeki ekspresyonu göstermesi amaçlanmıştır.

b: Antijene bağlanmadan bağımsız şekilde insan ve mürin Fc $\gamma$ RI'nın monomerik IgG'ye yüksek afinitesi mevcuttur.


Literatürde protein terapötüğünün yarılanma ömrünü artıracak çeşitli füzyon partnerleri ve uygulamalar mevcuttur (Çizim 1.5). Ancak çalışmamız kapsamında albümin başta olmak üzere, farklı sayı ve çeşitteki füzyon proteini ve füzyon partneri alternatifleri arasından literatürdeki pek çok örnekte de olduğu gibi IgG1-Fc'nin seçilmesinin nedeni, bunun TFF'nin meme tümörü hücrelerine seçici olarak bağlanabilmesidir (Çizelge 1.2). Bu kapsamda literatürde yapılan çalışmalarda, TFF'nin sağlıklı meme dokusu hücreleri de dâhil olmak üzere meme tümörü haricindeki hücre tiplerine bağlanmadığı ve yalnızca meme tümörü hücrelerine seçici olarak bağlanabildiği ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra, TFF'nin bağlanmasından sonra söz konusu tümör hücrelerinin farklılaştıkları ve malign bir karakterden benign bir yapıya geçtikleri ifade edilmektedir (Sokolowska 2012).

**Çizelge 1.2.** IgG1-Fc'nin Kullanımına İlişkin Klinikten Örnekler Czajkowsky ve diğ. (2012)'den derlenmiştir.

<b>Ticari isim (jenerik isim)</b>	<b>Açıklama</b>	<b>İlk FDA onayındaki endikasyon</b>	<b>Aşama</b>	<b>Firma</b>
<i>Nulojix (belatacept)</i>	CTLA-4 ile birleştirilmiş insan IgG1-Fc	<i>Organ reddi</i>	FDA Onaylı (2011)	Bristol-Meyers Squibb
<i>Eylea (aflibercept)</i>	VEGFR1/VEGFR2 ile birleştirilmiş insan IgG1-Fc	<i>Yaşa bağlı makular dejenerasyon</i>	FDA Onaylı (2011)	Regeneron Pharmaceuticals
<i>Arcalyst (rilonacept)</i>	IL-1R ile birleştirilmiş insan IgG1-Fc	<i>Kriyopirin ile ilişkili periyodik sendromlar</i>	FDA Onaylı (2008)	Regeneron Pharmaceuticals
<i>NPlate (romiplostim)</i>	Thrombopoietin- bağlama peptidi ile birleştirilmiş insan IgG1-Fc	<i>Kronik immün trombositopenik purpura hastalarında Trombositopenya</i>	FDA Onaylı (2008)	Amgen/Pfizer
<i>Orencia (abatacept)</i>	Mutasyona uğratılmış CTLA-4 ile birleştirilmiş insan IgG1-Fc	<i>Romatooid artrit</i>	FDA Onaylı (2005)	Bristol-Meyers Squibb
<i>Amevive (alefacept)</i>	LFA-3 ile birleştirilmiş insan IgG1-Fc	<i>Psoriasis ve transplant reddi</i>	FDA Onaylı (2005)	Astellas Pharma
<i>Enbrel (etanercept)</i>	TNFR ile birleştirilmiş insan IgG1-Fc	<i>Romatooid artrit</i>	FDA Onaylı (1998)	Amgen/Pfizer

Bu noktada, tümör dokusunun tamamen yok edilebilmesi amacı ile vücudun immün sisteminin de aynı zamanda tetiklenebilir olması oldukça önem arz etmektedir. Böylelikle, ilk aşamada tümör dokusunun malignant bir fenotipten, benign bir fenotipe dönüşmesi hedeflenmektedir. İkinci aşamada ise vücudun immün sisteminin IgG1-Fc'yi tanınması, molekülün bağlanmasından sonra ise tümör dokusunun immün sistem tarafından temizlenmesinin sağlanması için immün yanıt gelişimi beklenmektedir. Bu iki hedefe ek olarak aynı zamanda seçilen Fc konjugatı sayesinde söz konusu molekülün kandaki kalış süresi de artırılmış olacaktır. Bu nedenle, çalışmamız kapsamında immün yanıtı en iyi şekilde tetikleyebilen ve en uzun süre ile dolaşımda kalabilen Fc tipi olan IgG1-Fc seçilmiştir (Çizelge 1.3).

**Çizelge 1.3.** Immünoglobülin Sınıfları ve Özellikleri  
Encyclopedia (2019)'dan derlenmiştir.



Sınıf	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>2</sub>	IgG <sub>3</sub>	IgG <sub>4</sub>	IgM	IgA	IgD	IgE
CDC	++	+	+++	-	+	+	-	-
ADCP	++	±	++	+	-	+	-	-
ADCC	++	-	++	-	-	-	-	-
Serum kons. (mg/ml)	13.5				1.5	3.5	Eser mikt.	0.05
Yarı-ömür (gün)	23				5	6	3	2
Salınan formu	Monomer				Pentamer	Dimer	-	Monomer
Bağlanma bölgeleri	2				10	4	2	2
M.A. (Dalton)	150000				900000	385000	180000	200000
Plazmadaki %	75-85%				5-10%	10-15%	0.001%	0.001%

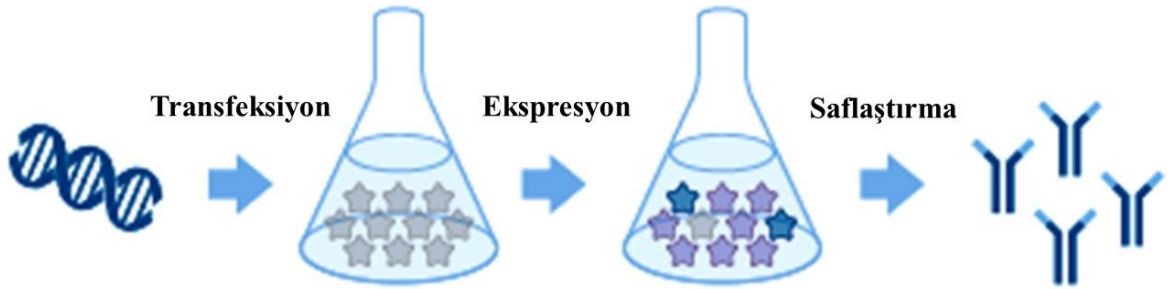
## 1.5. Terapötik Proteinlerin Üretimi

Terapötik proteinlerin, özellikle de post-translasyonel modifikasyonlar içerenlerin, ticari üretimlerinde sıklıkla CHO (çin hamster ovaryumu) ve HEK (insan embriyonik böbrek) hücre hatları kullanılmaktadır. Bunlar arasından, stabil transfeksiyon ile üretimde kullanılmak üzere CHO hücre hatları tercih edilir. Bu hücre hattının genomunda bulunan Dehidrofolat Redüktaz (DHFR) enzimine ait gen bölgeleri delesyona uğratılmıştır. Bu nedenle bunlar, üreyebilmeleri için yaşamsal öneme sahip olan pürin ve pirimidinlerin sentezini doğal yoldan gerçekleştirememektedir. Dolayısı ile ihtiyaç duydukları pürin ve pirimidin türevleri hipokzantin ve timidin olarak kültür ortamına dışarıdan eklenmeli, ya da DHFR enzimini sentezleyebileceği bir gen transfeksiyon ile hücreye aktarılmalıdır. Bu şekilde okzotrofik seleksiyon esasına dayalı olarak seçimleri ve kültürleri gerçekleştirilmektedir. Transfeksiyon işlemi sonrasında yapılan aşamalı dilüsyon işlemi ile en iyi ekspresyonu yapan hücre klonlarının elde edilmesi amaçlanmaktadır. Sonraki basamakta ise seçilen klonların kültüre edildikleri ortama Metotreksat ilave edilerek bir yandan eksprese edilmek istenen genin genoma entegrasyonu teşvik edilirken aynı zamanda entegrasyonu yapılan genin kopya sayısının da artırılmasına çalışılmaktadır. Bu kapsamda kullanılan Metotreksat esasen DHFR enzimini inhibe etme özelliğinde olup aşamalı olarak artan konsantrasyonlarda kullanılması ile hücreyi daha fazla DHFR enzimi üretmeye (böylelikle de hedef proteine ait genin daha fazla eksprese edilebilmesi için kopya sayısının artırılmasına) zorlamak amacı ile kullanılmaktadır. Bahsi geçen seçim ve adaptasyon basamaklarında en iyi üretimi gerçekleştiren stabil hücre klonu, ELISA (enzime bağlı immünozorbant testi) ve western blotlama analizleri ile kültürün ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi yoluyla tespit edilmektedir. Sonuç olarak, en iyi üretimi yapan hücre klonu dondurularak saklanmaktadır.

CHO hücre hattı ile stabil hücre klonlarının geliştirilmesi ve bu hücre klonlarının üretimde kullanılması, zaman, iş gücü ve ona bağlı yüksek maliyet dezavantajları getirmektedir. Dahası CHO hücre hatları ile yapılan üretimlerde elde edilen proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlar bağlamında insandaki post-translasyonel modifikasyonları bire-bir yansıtamadığı bilinmektedir. Bu nedenle, CHO hücre hatlarının kullanımına alternatif olarak HEK hücre hatlarının kullanımı giderek artan sıklıkta öne çıkmaktadır.

HEK hücre hattı stabil transfeksiyona uygun olmadığından dolayı bunlara geçici transfeksiyon ile gen aktarımı yapılmaktadır. Bunun yanı sıra HEK hücre hatlarının plazmit ile gen aktarımına oldukça uygun olduğu ifade edilmektedir. Bu şekilde, birden fazla plazmidin transfekte edilmesi ile birden fazla proteinin aynı kültürde eş zamanlı olarak sentezlenebilmesine olanak sağlamaktadır. HEK hücre hatları için geliştirilmiş olan serumsuz ve protein içermeyen besi ortamlarının kullanımı sayesinde besi ortamına salınan proteinler daha yüksek saflıkta elde edilebilmektedir. Bu da ekspresyon sonrası ayırma-saflaştırma işlemlerinin daha kolay hale gelmesini sağlamaktadır.

HEK hücre hattında üretim amacı ile yapılan transfeksiyonu takiben kültüre devam edilmektedir. Bu kapsamda, herhangi bir seçim işlemine tabi tutulmadan transfekte olmuş hücreler ve transfekte olmamış hücreler birlikte kültüre edilmektedir. Kültür sürecinin sonunda besiyeri saflaştırma işlemine tabi tutularak üretimi yapılan protein elde edilmektedir (Thermoscientific 2019) (Çizim 1.8).



**Çizim 1.8.** Terapötik Proteinlerin HEK Hücre Hattı Kullanılarak Üretimi  
Thermoscientific (2019)'den derlenmiştir.

Sahip olduğu bütün bu avantajlar değerlendirildiğinde, düşük titrelerdeki üretim kapasitelerine rağmen HEK hücre hatlarının kullanımı büyük avantajlar sunmaktadır. Bu nedenle çalışmamız kapsamında bu amaçla geliştirilen HEK293F hücre hattının kullanımı tercih edilmiştir.

## 2. AMAÇ

TFF proteininin meme ve prostat kanseri tümörleri üzerindeki terapötik etkisi bu güne kadar yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda sıklıkla *E. coli*'de üretilen ve TFF proteininin ilk 20 aminoasitlik kısmını içeren TFF-P1 proteininin kullanıldığı görülmektedir (Platica ve diğ. 2004, Roy ve diğ. 2012, Sokolowska ve diğ. 2012). Bunun dışında *in vivo* ortamda Platica ve diğ. (2004) tarafından yapılan çalışma kapsamında da TFF-P1 proteini kullanılmış olup, tümör hacminde küçülmeye yol açması bakımından oldukça olumlu sonuçların alındığı rapor edilmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda sentezlenen TFF-P1 proteininin kandaki kısa yarılanma ömrünün, hem molekül ağırlığının oldukça düşük oluşundan hem de post-translasyonel olarak değişime uğramamış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kontermann, 2011).

IgG antikoru, en uzun süre ile kan dolaşımında kalabilen antikor çeşididir. Bunda, IgG antikoru Fc bölgesinin neonatal Fc reseptörüne bağlanabilme özelliğinin etkili olduğu ifade edilmektedir (Selimoğlu ve diğ. 2016a). IgG alt-tipleri arasında yapılan değerlendirmeye göre ise hem en uzun süre dolaşımında kalabilen hem de immün yanıtı tetikleme potansiyeli yeterli seviyede olan IgG alt tipinin IgG1 olduğu belirtilmektedir (Vidarsson ve diğ. 2014). Bu nedenle, tedavi amacı ile kullanılan rekombinant proteinlerin hem kanda kalış süresini arttırabilmek hem de immün yanıtı da tetikleyebilir niteliğe sahip olmasını sağlayabilmek amacı ile IgG1-Fc bölgesine konjuge halde üretimleri tercih edilmektedir (Kontermann 2011).

Bu tez ile TFF proteininin, klinik öncesi (preklinik) denemelerde kullanımını mümkün kılacak şekilde moleküler biyoloji teknikleri ve proteomiks yöntemleri kullanılarak üretilmesi planlanmıştır. Bu yolla üretilen rekombinant TFF proteininin doğal formda olması, uzun süre kan dolaşımında kalabilmesi ve immün yanıtı tetikler nitelikte olması hedeflenmiştir. Proje kapsamında yapılan üretimin başarılı şekilde sonuçlanması ile proteinin *in vitro* ortamdaki terapötik etkinliğinin *in vivo* denemeler öncesinde test edilmiş olması, çalışma ile ulaşılması planlanmış nihai amaçlardandır.

Literatürde TFF-P1 kullanımı ile meme ve prostat kanserine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda önemli bir terapötik etki görülmüştür. Bu terapötik etkinin artırılabilmesi amacı ile proteinin bütüncül formu olan TFF formu, insan hücre hattında üretilmiştir. Böylelikle düşük doz ve sıklıkta enjeksiyon ile çok daha yüksek bir terapötik etkinliğe sahip olacak biçimde geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla:

- 1) Literatürde sıklıkla tercih edilen formu olan TFF-P1'in aksine, proteinin bütüncül formu olan TFF'nin HEK hücreleri kullanılarak tamamı ile doğal formda üretilmesi planlanmıştır. Böylelikle proteinin tamamı ile insandaki post-translasyonel değişimler kullanılarak üretilip hem kanda erkenden parçalanmasının önüne geçilebilmesi, hem de TFF-P1'e nazaran daha büyük olan yapısı nedeni ile hızlı şekilde renal filtrasyona uğramasının engellenebilmesi amaçlanmıştır.
- 2) TFF'nin doğal formda üretilmesinin yanı sıra C-ucuna IgG1-Fc bölgesinin de eklenmesi ile yukarıda bahsi geçen kanda kalış süresinin çok daha uzun süre artırılması hedeflenmiştir. Böylelikle çalışmanın gerçekleştirilmesi sonrasında yapılacak *in vivo* etkinlik testleri sırasında, Platica ve diğ. (2004)'nin uyguladıklarından daha düşük miktarda ve sıklıkta yapılacak olan enjeksiyonlar ile yeterli düzeyde terapötik etkinin elde edilebilmesi amaçlanmıştır.
- 3) Çalışma kapsamında rekombinant proteine yapılan IgG1-Fc eklentisi ile TFF'ye, TFF'nin terapötik etkisini çok daha fazla artırması beklenen yeni bir özellik daha kazandırılması planlanmıştır. Buna göre, bu çalışmanın önünü açacağı *in vivo* çalışmalarda tümörlü meme dokularına bağlanan rekombinant TFF'nin sahip olduğu Fc bölgesi ile aynı zamanda immün sistemi uyarması da amaçlanmıştır. Bunun sonucu olarak TFF ile farklılaştırılan ve daha benign bir karaktere kavuşturulan dokuların Fc bölgesi sayesinde immün sistem tarafından da temizlenmesi beklenmektedir.

Özetle, çalışmamız ile meme kanseri üzerinde tedavi edici etkisi olduğu düşünülen bir terapötik ajanın geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda aşağıda sıralanan kazanımların elde edilmesi hedeflenmiştir:

- Ülkemizde yerli imkânlar kullanılarak bir terapötik ajanın geliştirilecek olması ulusal bir yenilik teşkil edebilir.
- Özgün bir biyoterapötüğün geliştirilecek olması uluslararası alanda da bir yenilik kazandırabilir.

Çalışmamız ile elde edilen ve etkinliği kanıtlanan biyoterapötüğün bir yandan hedefe yönelik şekilde meme tümörlerine bağlanıp tedavi edici etki gösterirken, diğer yandan antikora-bağlı immün yanıtı tetikleyebilir nitelikte olması amaçlanmıştır. Bu yönü ile hem önemli bir kanser tipinin farklılaşmasına neden olarak terapötik etki sağlarken, hem de immün sistemi tetikleyip farklılaştırmış olduğu kanserli dokunun immün sistem tarafından temizlenmesini de sağlayabilecek nitelikte bir terapötüğün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Böylelikle



geliştirilen rekombinant proteinin, bu hastalığa karşı etkili olması ve güçlü bir terapötik potansiyele sahip olması beklenmektedir. Bu yönü ile de elde edilen proteinin uluslararası alanda bir yenilik arz etmesi beklenmektedir.

Çalışma kapsamında uluslararası ticari üretimlerde sıkça tercih edilen HEK293F hücre hattı ve bunun için uygun görülen üretim hattı geliştirme tekniklerinin kullanılması önem arz etmektedir. Dolayısıyla başta grubumuz ve üniversitemiz bünyesinde olmak üzere, ülkemizde rekombinant protein ve monoklonal antikörlerin üretimine dair teknik bilgi birikiminin oluşturulması ve geliştirilmesine öncülük etmesi beklenmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, söz konusu projenin biyoterapötik geliştirilmesi ve üretilmesi noktasında ülkemiz ilaç sanayisine önemli bir katkı sunması hedeflenmiştir.

Çalışmamız kapsamında geliştirilen proteinin, uluslararası biyoteknolojik ilaç pazarı çeşitliliğine zenginlik katacak olmasının yanı sıra, proje süresince elde edilecek olan verilerin akademik düzeyde uluslararası literatüre önemli katkılar sunması da amaçlanmaktadır.

### 3. YÖNTEM

TFF (tümör farklılaşma faktörü) proteininin yapısı ve formuna ilişkin literatürde mevcut olan veriler temel olarak Platica ve diğ. (2004)'nin yapmış oldukları çalışmaya dayanmaktadır. Platica ve diğ. (2004)'nin TFF'nin terapötik etkisinin araştırılması üzerine *in vivo* ve *in vitro*'da yapmış oldukları çalışmalarda, proteinin ilk 20 aminoasitlik kısmının *E. coli*'de sentezlenmiş halini (TFF-P1) kullanmışlardır. Ancak yapılan *in vitro* çalışmalar, TFF-P1 proteininin bütüncül proteini içerdiği bilinen ekstrakt ile kıyaslandığında çok daha düşük aktivite gösterdiğine işaret etmektedir (Platica ve diğ. 2004). Yine *in vivo* çalışmalar sırasında verilen protein dozunun yüksek oluşu ve günde iki doz uygulanma gereksinimi mevcut proteinin aktivitesinin yanı sıra, muhtemelen aglikolize ve düşük molekül ağırlığında oluşu nedeni ile kandaki yarılanma ömrünün de yetersiz olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, proteinin bütüncül yapıdaki doğal formunun HEK (insan embriyonik böbrek) hücre hattında rekombinant teknikler ile üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra, hem TFF proteininin yarılanma ömrünü daha da arttırabilmek, hem de farklılaşmasına yol açacağı kanserli dokuya karşı aynı zamanda antikora bağlı immün yanıtı da indükleyebilmesini sağlayabilmek için IgG1-Fc bölgesi ile konjuge halde üretimi yapılmıştır. Üretilen proteine, Protein A kolon kromatografisi ve Ni-NTA kolon kromatografisi metotları uygulanarak proteinin salınmış olduğu besi ortamından saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Meme kanseri tanısı koyulan hastadan alınan tümörlü dokuya primer hücre kültürü yapılarak geliştirilen hücre hattı üzerinde söz konusu proteinin çeşitli doz ve aralıklar ile uygulaması yapılmıştır. Primer hücre kültürü, hastadan alınan tümör dokusunun *in vitro* ortamda kültürünün yapılması ile geliştirilmiştir. Bu hücre hattı ile birlikte MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına yapılan protein muamelesini takiben negatif kontrollerle beraber hücre canlılığı testleri uygulanmıştır. Böylelikle farklı meme kanseri hücre hatlarında sebep olunacak terapötik etkilerin ve potansiyelin çok daha net bir biçimde ortaya konması sağlanmıştır.

#### 3.1. Rekombinant TFF Proteini'nin ve İlgili Gen'in Tasarımı

##### 3.1.1. Eksprese Edilecek Proteinin *In silico* Modellemesi

Sentezlenmesi planlanan bütüncül TFF proteinine dair I-TASSER bilgisayar programı kullanılarak yapılan çeşitli modellemeler literatürde mevcuttur (Roy ve diğ. 2013). Bütüncül proteinin yapısına dair söz konusu modellerin mevcut olmasına karşın çalışmamız

kapsamında yapılan protein kendine has özellikler taşımaktadır. Bu yeni tasarımdan ötürü, ekspresyon sonrasında istenmeyen bir 3-boyutlu yapı ile karşılaşılması ihtimali söz konusudur. Bu nedenle gen tasarımı öncesinde, elde edilmesi beklenen proteinin 3-boyutlu katlanma olasılıkları I-TASSER (Zhang 2008, Roy ve diğ. 2010, Yang ve diğ. 2015) *in silico* modelleme uygulaması kullanılarak ortaya konulmuştur. Bunun yanı sıra, normaldeki dimerik yapısından ötürü yeni tasarımda yer alacak olan Fc bölgesinin oluşması beklenen bir dimerizasyonu ne kadar sağlıklı gerçekleştirdiğinin görüntülenebilmesi amacı ile COTH (Mukherjee ve Zhang 2011) *in silico* modelleme uygulamasından faydalanılmıştır. Bu kapsamda bütüncül TFF proteinine ait aminoasit dizisi ve pFUSE-hIgG1-Fc2 (Invivogen, ABD) vektöründen elde edilen IgG1-Fc'ye ait aminoasit dizisi sisteme birlikte girilmiştir. Bu amaçla kullanılan bütüncül amino asit dizisi aşağıdaki şekildedir:

“MRESQGTRVGGQALSFLCKGTAVQDTHHTHTHTHTHTHTHTNTIQTQNMKHFLYGPFG  
SLKFTPYFWHHHICPMIILINAMMLIQLLLEGPDHQYSLECCIFLTFRQVWQRSKDTHT  
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD  
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK”

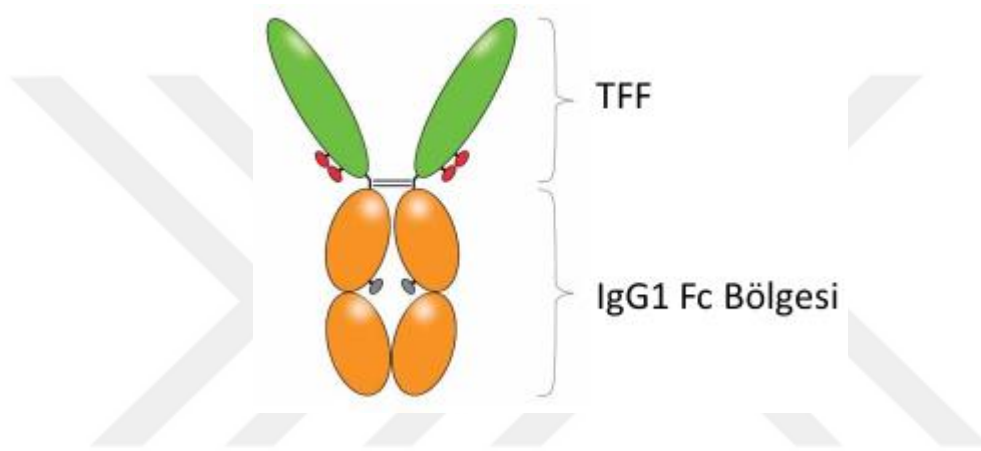
Her iki modelleme uygulamasından alınan sonuçlar arasından en yüksek güvenilirliğe sahip model esas alınarak bir sonraki basamak olan gen tasarımına geçilmesi kararı alınmıştır.

### 3.1.2. Eksprese Edilecek Olan Genin Tasarımı

I-TASSER ve COTH uygulamaları kullanılarak yapılan modelleme sonucunda elde edilmesi planlanan protein sekansına aynı şekilde sadık kalınmasına karar verilerek, ekspresyonu yapılacak olan genin tasarımına geçilmiştir. Bu kapsamda bütüncül TFF ile konjuge halde IgG1-Fc üretiminin Çizim 3.1’de belirtildiği şekilde ekspresyonunun yapılabilmesi için TFF’ye ilişkin protein zincirini kodlayan gene ait optimum genin tasarımı yapılmıştır. Söz konusu proteine ait bütüncül protein zinciri: “MRESQGTRVGGQALSFLCKGTAVQDTHHTHTHTHTHTHTNTIQTQNMKHFLYGP  
FQSLKFTPYFWHHHICPMIILINAMMLIQLLLEGPDHQYSLECCIFLTFRQVWQ”

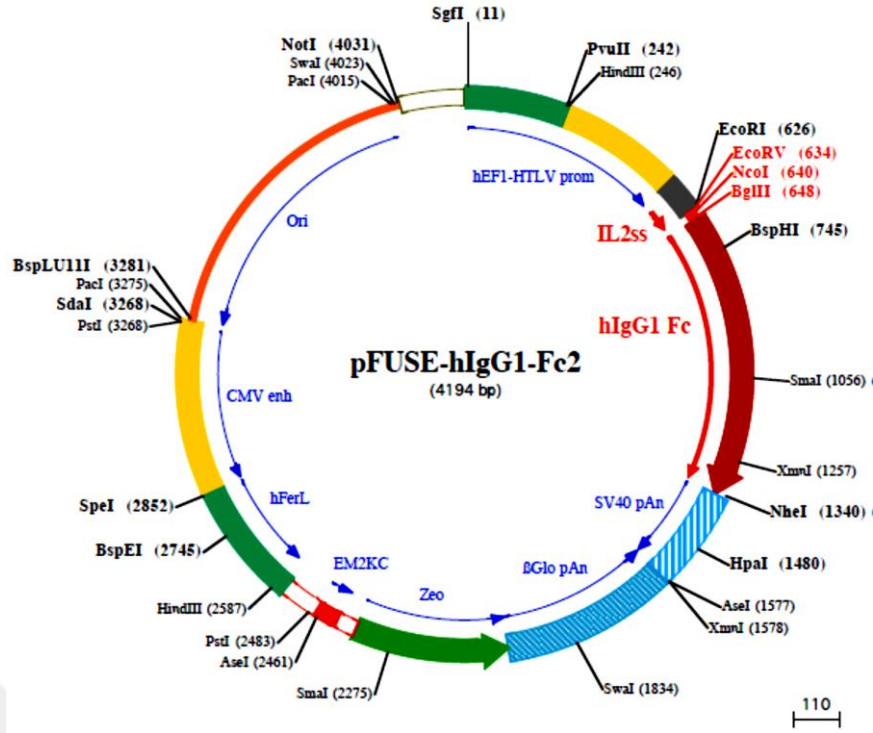
olarak bilinmektedir. Tasarlanan füzyon proteini HEK293F (Freestyle-insan embriyonik böbrek hücre hattı) hücrelerinde sentezlenecektir. Bu nedenle, insan kodon profiline en uygun şekilde proteini sentezleyebilecek nitelikteki genin tasarlanmasına çalışılmıştır. Bu işlem için Geneious (Eurofins Genomics, Almanya) yazılım programından faydalanılmıştır. Yapılan tasarım işlemi sırasında Selimoğlu ve diğ. (2016b)'de belirtilen hususlara ek olarak aşağıdakilere özen gösterilmiştir:

1. Genin transkripsiyonu sonrasında stabil sekonder veya tersiyer m-RNA yapılarını oluşturmamasına bilgisayar programı algoritması tarafından dikkat edilmektedir.



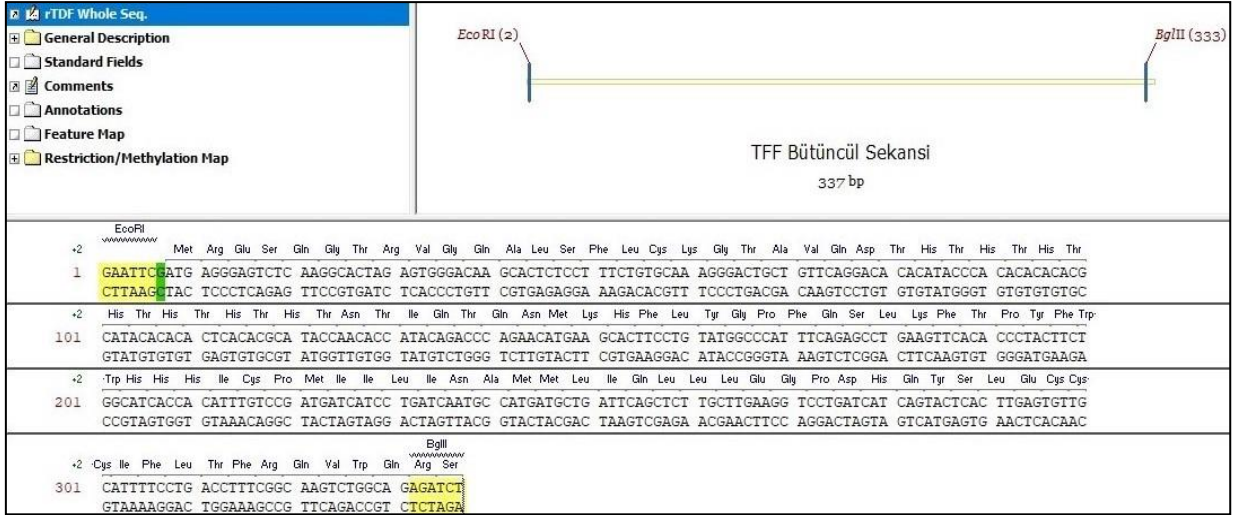
**Çizim 3.1.** IgG1-Fc Bölgesine Konjuge Haldeki rTFF Proteini'nin Gösterimi

2. Elde edilecek olan gen bölgesi, açık okuma bölgesinin (open reading frame - ORF) içerisinde kalan bölgede, interlökin-2 salınım sinyali peptidi ile IgG1-Fc sekansları arasında konumlandırılmıştır (Çizim 3.2). Dolayısı ile bu sekanslara dair kodon profilleri değiştirilmemiştir. Bu nedenle, gene dair tasarımın bu sekanslar dikkate alınarak optimum dağılım ile anti-kodon kullanımı gerçekleştirilecek şekilde özenle yapılması gerekmiştir. Bu kapsamda yazılımı geliştiren firma ile yapılan yazışmalarda tasarımda sabit tutulması gereken bölgelere dair sekanslar da iletilmiş ve kodon dağılımının buna göre optimum şekilde yapılması istenmiştir. Sonuç olarak klonlaması yapılacak olan TFF'ye dair tasarım, bütüncül transkript hedefi dikkate alınarak yapılmıştır.



**Çizim 3.2.** pFUSE-hIgG1-Fc2 Vektör Haritası

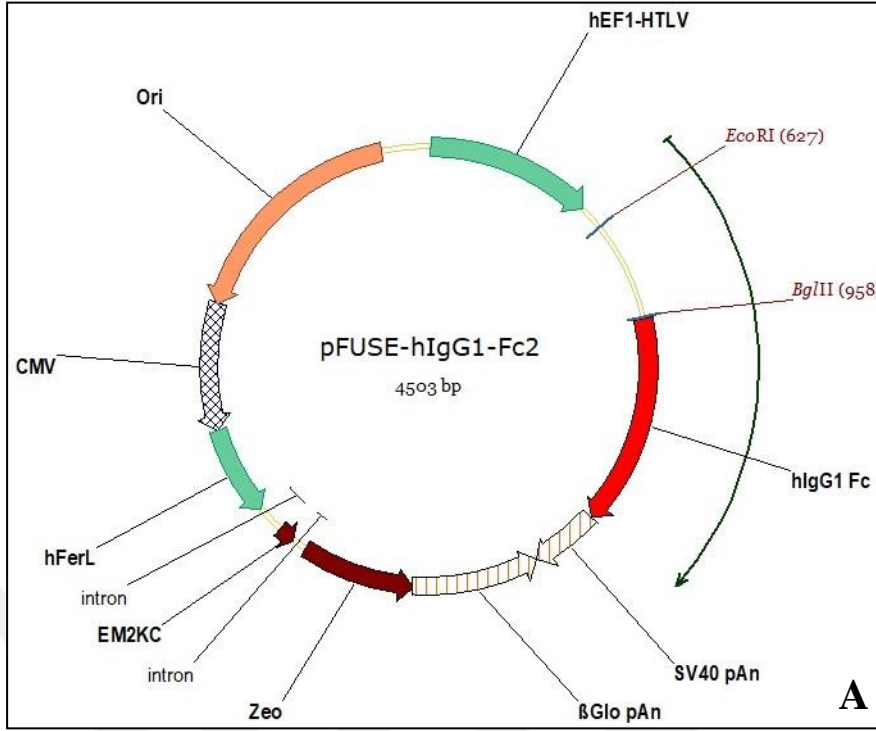
- Yapılan sentez işlemi ile elde edilecek olan rTFF proteini N-ucu üzerinden aktivite gösteren bir proteindir. Bu nedenle, gen ekspresyonu sonrası elde edilen proteinin özellikle N-ucunda fazladan aminoasit bulunmaması son derece önem taşımaktadır. Ancak mevcut vektörde belirtilen çoklu klonlama bölgesinin en dış iki ucunda EcoRV ve BglIII restriksiyon kesim bölgesi bulunmaktadır. EcoRV kullanılarak yapılacak bir klonlama işlemi ile fazladan 3 aminoasidin N-ucuna eklenmesi ile sonuçlanır. Bu nedenle N-ucundan yapılacak olan kesim için vektör omurgasından EcoRI ile kesim yapılması, bununla birlikte gen sekansına fazladan 1 adet nükleotid eklenmesine karar verilmiştir (Çizim 3.3). Bu kapsamda, Vector NTI (Invitrogen, ABD) yazılım programından faydalanılmıştır.



**Çizim 3.3. TFF Bütüncül Gen Sekansı**

4. Çizim 3.2’de belirtilen EcoRI ve BglII restriksiyon bölgeleri arasına klonlama yapılmıştır. Bu nedenle, tasarımı yapılan genin söz konusu sekansları içerisinde barındırmamasına dikkat edilmiş ve bilgisayar programı bu şekilde yönlendirilmiştir.
5. Nihai gen sekansının belirlenmesinin ardından, Vector NTI (Invitrogen, ABD) Yazılım Programı kullanılarak “sanal klonlama” yapılmıştır. Bu sayede tasarlanan gen ve gen ürününün istendiği şekilde eksprese edilebilir olduğundan emin olunmuştur (Çizim 3.4).





501	TCTGTTCTGC GCGTTACAG ATCCAAAGCTG TGACCGGGCG CTACCTGAGA TCACCGGGCGA AGGAGGGGCGA CCATGTACAG GATGCAACTC CTGTCTTGCA	Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile
	AGACAAGAGC CGGCAATGTC TAGGTTTCGAC ACTGGCCGCG GATGGACTCT AGTGGCCGCT TCCTCCCGGT GGTACATGTC CTACGTGTAG GACAGAACGT	
601	TTGCACTAAG TCTTGCACCT GTCACGAATT CGATGAGGGA GTCTCAAGGC ACTAGAGTGG GACAAGCACT CTCCTTTCTG TGCAAAGGGA CTGCTGTTC	Leu Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Met Arg Glu Ser Gln Gly Thr Arg Val Gly Gln Ala Leu Ser Phe Leu Cys Lys Gly Thr Ala Val Gln
701	GGACACACAT ACCACACAC ACACGGATAC ACACACTCAC AGCAGATACA ACACGATACA GACCCAGAAC ATGAAGCACT TCCTGTATGG CCCATTTCAG	Gln Asp Thr His Thr His Thr His Thr His Thr His Thr His Thr Asn Thr Ile Gln Thr Gln Asn Met Lys His Phe Leu Tyr Gly Pro Phe Gln
801	AGCCTGAAGT TCACACCCTA CTCTGGCAT CACCACATT GTCCGATGAT CATCTGATC AATGCCATGA TGCTGATTCA GCTCTTGCTT GAAGGTCCTG	Ser Leu Lys Phe Thr Pro Tyr Phe Trp His His His Ile Cys Pro Met Ile Ile Leu Ile Asn Ala Met Met Leu Leu Leu Glu Gly Pro Asp
901	ATCATCAGTA CTCACCTGAG TGTTCACATT TCCTGACCTT TCGGCAAGTC TGGCAGAGAT CTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA	Asp His Gln Tyr Ser Leu Glu Cys Cys Ile Phe Leu Thr Phe Arg Gln Val Trp Gln Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
1001	ACTCCTGGGG GACCCGCTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAA CCAGAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CTGAGGTCAT CATCGTGGT GGTGGACGTG	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val
1101	AGCCACGAAG ACCCTGAGT CAAGTTCAC TGTTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACA AGCCCGGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Thr Glu Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
1201	ACCGTGTGGT CAGCGTCTC ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCATCGA	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
1301	GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCTGCCCCC ATCCCGGGAG GAGATGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
1401	TGCCTGGTCA AAGCCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
1501	CCGACGGCTC CTTCCTCTC TAGAGCAAGC TCACCGTGGG CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG GGAACGCTT CTATGCTCC GTGATGCAAG AGGCTCTGCA	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
1601	CAACCCTACT ACGCAGAAGA GCCTCCCTCT GTCTCCGGGT AATGTAGTGC TAGCTGGCCA GACATGATAA GATACATTGA TGAGTTTGGG CAAT	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
	GTGGTGTATG TGGCTCTCT CCGAGAGGGA CAGAGGCCCA TTCTACTCAG ATCGACCGGT CTGTACTATT CTATGTAAC ACTCAAACCT GTT	

**Çizim 3.4.** Sanal Klonlama İşlemi Sonrası Vektör Haritası (A) ve Gene Dair ORF Bölgesi (B)

Sentezlenecek olan genin vektör üzerinde ilgili bölüme hatasız biçimde klonlanabilir olduğu, klonlama sonrasında ORF'nin hatasız şekilde okunabildiği ve istenilen proteine dönüştürülebildiğinin belirlenmesinin ardından genin siparişi ve vektöre klonlanması için Eurofins Genomics (Almanya) firmasına sipariş verilmiştir.

Tasarımı yapılan gen, pFUSE-hIgG1-Fc2 vektörüne klonlanması yaptırılmış şekilde Eurofins firmasından tedarik edilmiştir. Bu kapsamda firma tarafından liyofilize edilmiş şekilde 4,2 µg plazmid gönderilmiştir. Firma tarafından gönderilen rTDF-pFUSE plasmidinin endojensiz (endojen-free) olarak amplifiye edilmemiş olması ve uzun süreli kullanım için yeterli olmayan miktarda gönderilmiş olması nedeniyle, söz konusu plazmit *Escherichia coli* DH10B hücrelerinde amplifiye edilmiş ve endojensiz şekilde ekstraksiyonu ve saflaştırılması yapılmıştır.

### **3.2. Plazmidin Amplifikasyonu ve Saflaştırılması**

Yapılan çalışmalarda, plazmidi taşıyan *E. coli* hücrelerinin seçilmesi amacı ile 25 µg/ml konsantrasyona sahip düşük tuz konsantrasyonunda LB (Luria Bertani - Lennox formülasyonu) agar plakları dökülmüş ve kullanılmıştır. Zeosin antibiyotikinin yüksek tuz konsantrasyonlarında etkisini yitirmesi nedeni ile çalışma sırasında kullanılan katı ve sıvı bütün *E. coli* besi ortamları bu husus gözetilerek hazırlanmıştır.

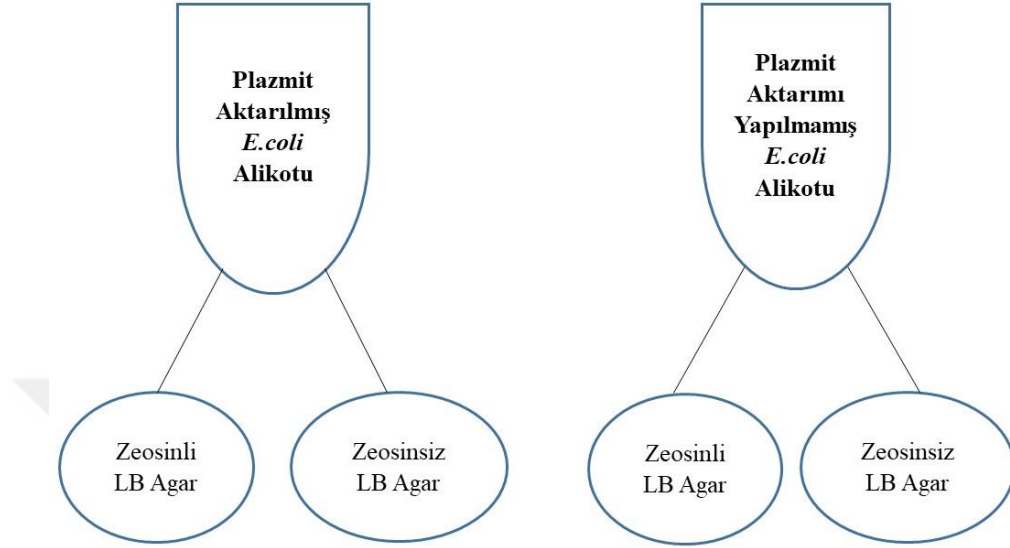
#### **3.2.1. *E. coli* Hücrelerinin Elektroporasyon ile Transformasyonu**

Firmadan liyofilize halde tedarik edilen 4,2 µg plazmid, 42 µl steril-ultra saf su içerisinde çözülerek 100 ng/µl konsantrasyonunda plazmit-su solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon içerisinden 1 µl ve 2,5 µl (100 ng ve 250 ng) alınarak elektroporasyon ile aktarımı denenmiştir. Bu kapsamda, aşağıdaki yöntem takip edilmiştir:

1. 50 µl'lik %20 gliserol içeren kompetan *E. coli* hücre stoğu ile homojenize edilen plazmit solüsyonuna Elektroporatör cihazında (Eppendorf, Almanya) 1750 volt akım uygulandı.
2. Aktarım yapılan kompetan hücreler üzerine 500 µl kadar SOB (super optimal broth) eklendikten sonra 37 °C'de çalkalamalı etüvde 30 dk. (yaklaşık 1 yarılanma zamanı) süresince inkübasyona alındı.
3. Paralel şekilde, negatif kontrol olarak kullanılacak olan plazmit eklenmeyen hücrelere de aynı şekilde elektroporasyon işlemi uygulandı ve 30 dakika süre ile inkübasyona alındı.



4. Elde edilen transforme hücrelerin seçimlerinin yapılabilmesi için zeosin'li LB Agar ortamlarına Çizim 3.5'te açıklandığı şekilde yayma ekimleri gerçekleştirildi.



Çizim 3.5. Elektroporasyon ile Transformasyon Sonrası Ekim Yapılan Petriler

### 3.2.2. Hücrelerin Çoğaltımı ve Plazmidin Saflaştırılması

Zeosin antibiyotikine karşı direnç gösterebilen suşların seçilimi sonrasında, agar besi ortamında üreme gösteren kolonilerden morfolojik olarak ortalama büyüklüğe sahip bir tanesi, 37 °C'deki çalkalamalı 2x200 ml'lik sıvı Zeosin'li LB besi ortamında 2x2 L'lik dalgakıranlı erlenler kullanılarak gece boyu üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün, santrifügasyon ile çöktürülen kültürlerden EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Almanya) ile aşağıdaki yöntem uygulanarak endotoksinsiz plazmit izolasyonu yapılmıştır.

#### Plazmidin Saflaştırılması:

Bu işlemler sırasındaki tüm adımlar için özellikle endotoksin içermeyen plastik ürünlerin (örneğin, yeni ve steril polipropilen santrifüj tüpleri) kullanılmasına özen gösterildi.

1. Gece boyu üreyen sıvı LB ortamındaki hücreler 4 °C'de 15 dakika boyunca 6000xg'de santrifüjleme ile toplandı.
2. Bakteriyel pellet, içine önceden LyseBlue reaktifi ve RNase A eklenmiş olan 10 ml Pl tamponu içerisinde süspansedildi. Bu işlem sırasında etkili parçalama için parçalama tamponlarının tamamen karışmasına izin verecek şekilde 50 ml'lik falkonlar kullanıldı.

3. Üzerine 10 ml Tampon P2 eklendi. Kapağı kapatılan tüp 4-6 kez sert bir şekilde ters yüz ederek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında (15–25 °C) 5 dakika boyunca inkübe edildi. Genomik DNA'nın kesilmesine yol açacağı için vorteksleme uygulanmadı. Parçalanma reaksiyonunun 5 dakikadan fazla devam etmesine izin verilmeden bir sonraki basamağa geçildi.

Bu 5 dk.'lık inkübasyon sırasında QIAfilter Kartuşu hazırlandı:

Bu amaçla kapak, QIAfilter Maxi Kartuşu'nun çıkış yuvasına vidalandı ve QIAfilter Kartuş uygun ve yüksekçe bir yere yerleştirildi.

4. Lizata 10 ml soğutulmuş P3 Tamponu eklendi ve kuvvetli bir şekilde 4-6 kez ters yüz edilerek iyice karıştırıldı. Çökeltinin daha sonra bozulmasını önlemek için lizat hemen QIAfilter Kartuşu'na aktarıldı.
5. Lizat, QIAfilter Kartuşu'nun variline döküldü ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu süre zarfında QIAfilter Kartuşu'nun karıştırılmamasına dikkat edildi.
6. Kapağı, QIAfilter Kartuşu çıkış yuvasından çıkartıldı. Piston nazikçe QIAfilter Maxi Kartuşuna yerleştirildi ve hücre lizati 50 ml'lik bir tüpe süzüldü. Tüm lizat QIAfilter Kartuşu'ndan geçinceye kadar aşırı kuvvet uygulanmadan kartuş filtre edildi.
7. Filtrelenen lizata 2,5 ml Tampon ER eklendi. Tüp, yaklaşık 10 kez ters yüz edilerek karıştırıldı ve 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi.
8. 10 ml Tampon QBT uygulanarak QIAGEN-tip 500 kolonun yerçekimi akışı ile boşalmasına izin verilerek şartlandırıldı. Şartlama sırasında QIAGEN-tip'in tamamen boşalması sağlandı.
9. Adım 7'de filtre edilen lizat, QIAGEN-tip'e uygulandı ve reçineye yerçekimi akışı ile girmesi sağlandı.
10. QIAGEN-tip 2x30 ml Tampon QC ile yıkandı. Tampon QC'nin yerçekimi akışı ile QIAGEN-tip boyunca hareket etmesi sağlandı.  
Özellikle bu basamak sonrasındaki tüm adımlarda, endotoksin içermeyen plastik ürünlerin (örneğin, yeni ve steril polipropilen santrifüj tüpleri) kullanılmasına ayrıca özen gösterildi.
11. 15 ml Tampon QN ile DNA kolondan indirildi (elut edildi). Elüat, 50 ml'lik endotoksinsiz ve pirojen içermeyen bir tüpte toplandı.
12. Elüt edilmiş DNA'ya 10,5 ml (0,7 hacimde) oda sıcaklığında izopropanol ilave edilerek DNA çöktürüldü. Bu amaçla, elüsyon üzerine izopropanol eklendikten hemen sonra

karıştırma yapıldı. Hemen ardından, 300 µl'lik hacimler ile mikrosantrifüj tüplerine alikotlandı ve hemen 16.000xg'de 30 dakika boyunca +4 °C'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında üst sıvı dikkatlice döküldü ve kalan kısım düşük hacimli bir pikropipet yardımı ile çökeltiye dokunulmadan dikkatli bir biçimde çekilerek atıldı.

13. DNA çökeltisinin etanol ile yıkanması amacı ile kitle birlikte verilen endotoksinsiz suya 40 ml %96-100'lük endotoksin içermeyen moleküler biyoloji kalitesinde etanol eklendi. Elde edilen oda sıcaklığındaki bu solüsyonun 5 ml'si mikrosantrifüj tüplerine eşit miktarlarda dağıtıldı. 10 dakika boyunca 16,000xg'de santrifüjlendi. Pellet bozulmadan üst sıvı dikkatli bir biçimde döküldü. Kalan kısım düşük hacimli bir mikropipet yardımı ile çökeltiye dokunulmadan yine dikkatli bir biçimde çekilerek atıldı.
14. Mikrosantrifüj tüpleri içerisindeki pelletler tüplerin kapakları 5-10 dakika süre ile laminar akışlı kabin içerisinde açık bırakılarak kurutuldu. Bu noktada, DNA'nın yeniden çözülmesini zorlaştırma ihtimalinden ötürü pelletlerin aşırı derecede kurutulmamasına özen gösterildi.
15. Pelletlere 500 µl endotoksinsiz su eklenerek bütün tüplerin içeriği birleştirildi. Bu aşamadan sonra elde edilen plazmit konsantrasyonunun belirlenmesi amacı ile 1-2 µl kadar numune 3 tekrarlı şekilde 260 nm'de mikrospektrofotometrik okutmaya tabi tutuldu (Nanodrop, ThermoScientific, ABD).

### **3.3. Primer Hücre Kültürü ve Stabil Hücre Hattı'nın Elde Edilmesi**

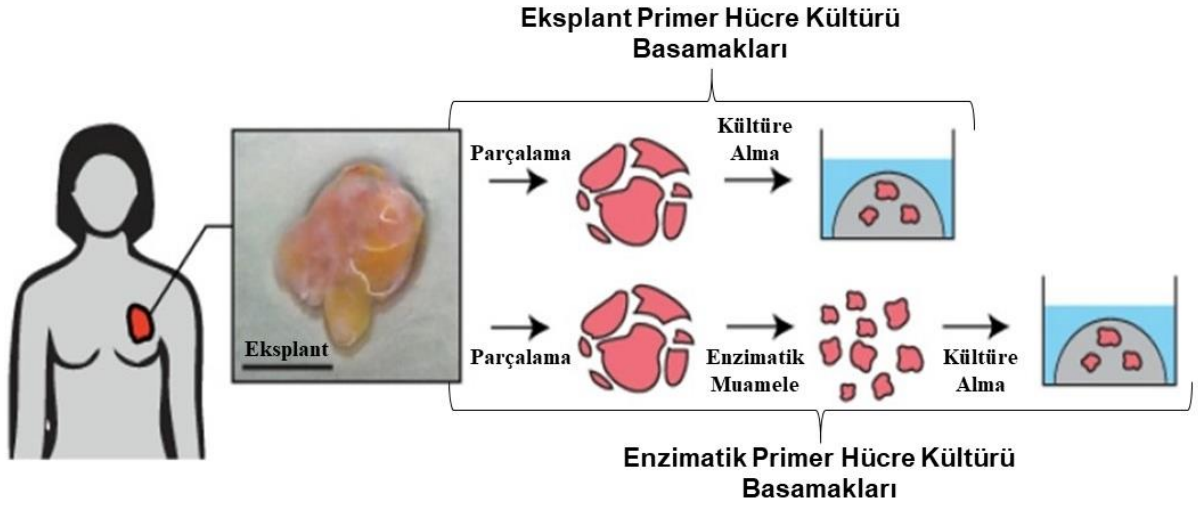
Çalışma kapsamında MCF-7 hücre hattı dışında yeni ve daha önce üzerinde çalışılmamış bir primer meme tümörü hücre hattı üzerinde rTFF ve P1 peptidinin etkinliğinin test edilmesi planlanmıştır. Bu kapsamda, meme tümörü olan bir hastadan tümör eksplantı alınarak *in vitro* ortamda hücre hattı elde edilmesine çalışılmıştır. Bu kapsamda temeli, alınan dokunun küçük parçalara ayrılması ve yıkanması prensibine dayalı olan iki farklı protokol takip edilmiştir (Çizim 3.6). Bu kapsamda uygulanan protokollardan ilki direkt kültür ve pasajlama esasına dayanmakta, ikincisi ise enzimatik muamele sonrası kültür ve pasajlamaya dayanmaktadır.

Yapılan çalışmalar sırasında, elde edilen eksplantlara uygulanan iki protokoldan hangisinden yüksek verimlilikte hücre eldesi sağlanabildi ise, o metot ile elde edilen hücre hattı ile çalışmaya devam edilmesi planlanmıştır. Ancak çalışmamız kapsamında kullanılan her iki metot ile de yüksek verimlilikte hücre eldesi sağlanabilmiştir.

### 3.3.1. Eksplant Primer Hücre Kültürü

Bu yöntemde, hastadan alınan eksplantın küçük parçalara ayrılmasından sonra yıkama yapılmakta ve elde edilen doku parçaları pasajlamaya tabi tutulmaktadır. Bu kapsamda aşağıdaki yöntem takip edilmiştir:

1. Alınan doku bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrıldı.
2. Bu doku parçaları steril 50 ml'lik falkona alındıktan sonra içerisine 10 ml taze DMEM besi ortamı koyuldu ve karıştırıldı.
3. 10 dk süre ile hiç dokunmadan doku parçalarının yavaşça tüpün dibine çökmesi beklendi.
4. Dibe çöken dokulara hiç dokunulmadan üzerindeki besin ortamı steril bir pastör pipeti ile yavaşça alınıp atıldı.
5. 2-4 arasındaki basamaklar 3 kez tekrar edildi.
6. 3 tekrarlı yıkama işlemi sonrasında altta kalan doku parçaları 1 ml yüksek glukozlu %20 FBS içeren DMEM besin ortamı içerisinde elde edilen dokunun miktarına göre 2-3 adet 3 ml'lik petri plaklarına ekildi.
7. Petri plakları gece boyu 37 °C'de inkübe edildikten sonra ertesi gün petri plaklarına 2'şer ml daha besi ortamı eklendi.
8. Petri plaklarının toplam besi ortamı hacmi 5 ml'ye çıkartıldıktan sonra söz konusu doku parçacıklarından hücre çıkışı gözlenene kadar dokulara dokunmadan besiyeri değiştirilerek kültür devam ettirildi.
9. Dokulardan hücre çıkışı gözleendiğinde, hücreler pasajlandı.



**Çizim 3.6.** Meme Tümörü Eksplantından Primer Hücre Kültürü Eldesi

### 3.3.2. Enzimatik Primer Hücre Kültürü

Uygulanan bu yöntemde, hastadan alınan doku küçük parçalara ayrıldıktan sonra kollajenaz enzimi ile enzimatik muameleye tabi tutulmaktadır. Sonrasında elde edilen hücrelerin pasajlaması yapılarak primer hücre hattının eldesine çalışılmaktadır. Bu kapsamda aşağıda belirtilen yöntem takip edilmiştir:

1. 3,6 mg Collgenase II tartılıp 3 ml %20 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM besin ortamı içerisinde çözüldü.
2. Hazırlanan bu karışım 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik steril filtre kullanılarak filtre edildi.
3. Bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrılan dokular steril bir falkon tüp içerisinde bu karşıma alınarak gece boyu çalkalamalı inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi.
4. Ertesi gün falkon tüp, 1500 rpm 10 dk ve oda sıcaklığındaki santrifüjde santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrasında elde edilen pellet %10 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM besin ortamı içerisinde çözülerek kültüre alındı.
6. Doku parçalarından hücre çıkışı gözleendiğinde, hücreler pasajlanarak kültüre devam edildi.

### 3.3.3. Hücre Çözdürme, Pasajlama ve Dondurma

#### Hücre Çözdürme:

Hücre çözdürme işlemlerinde azot tankından alınan vial, tüp içeriğinin %80'i çözülünceye kadar 37 °C'deki su banyosunda tutulmuştur. Hemen sonrasında ise önceden 37 °C'ye getirilmiş taze %20 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM besi ortamı ile homojenize edilmiştir. Bu kapsamda aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Sıvı azottan 1 adet vial çıkartıldı ve 37 °C'deki su banyosunda tüp içeriğinin %80'i çözülünceye hızla çözdürüldü.
2. Hücreler tamamen çözülmeden hemen önce vialin dışı %70 etanol ile dekontamine edildi.
3. Tüm vial içeriği 10 ml steril PBS ile 15 ml'lik steril falkon tüpüne aktarıldı.
4. 1500rpm'de oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edildi.
5. Üst sıvı atıldıktan sonra, elde edilen pellet 5 ml %20 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM besi ortamı ile homojenize edildi.
6. Elde edilen homojenatın 1 adet T25 flask'a aktarılmasından sonra flask, 37 °C'deki nemlendirilmiş %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 2-3 gün süre ile inkübasyona alındı.

#### Hücre Pasajlama:

Yapılan hücre kültürleri sırasında besi yeri olarak, %20 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM besi ortamı (Sigma, Almanya) kullanılırken, kültürasyon kabı olarak tek kullanımlık steril membran kapaklı T25, T75ve T175'lik flasklar kullanılmıştır. Pasajlamalar, 1 cm<sup>2</sup>'den 3 cm<sup>2</sup>'ye olacak şekilde; 1 konfluent flask alanından, 3 kat alana pasajlama yapılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Kültürasyonlar için 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li nemlendirilmiş atmosfere sahip etüv kullanılmıştır.

Yapılan pasajlama işlemleri sırasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Hücreler yeteri kadar PBS ile üç defa yıkandı.
2. Yüze tutunan hücrelerin kaldırılması için 1-3 ml kadar Tripsin/EDTA (%0,05) (Gibco, ABD) solüsyonu flask yüzeyine eklendi.
3. Flask 5 dk süre ile 37 °C'de inkübasyona alındı.

4. İnkübasyon süresinin sonunda flask çeperine elle vurularak hücrelerin tamamen kalkması sağlandı.
5. Flask içine 10 ml kadar steril PBS solüsyonu eklendi ve süpürme yapılarak tüm flask içeriği 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.
6. Falkon tüp 1500 rpm'de 10 dk süre ile oda sıcaklığında santrifüj edildi.
7. Üst sıvı atıldıktan sonra tüpte kalan pellet üzerine taze besi yeri eklenerek yeniden çözüldü.
8. Çözülen hücreler pasajlanmak üzere DMEM besi ortamı içeren kültür flaskına aktarıldı.

#### Hücre Dondurma:

Dondurma işlemi, flask içerisindeki hücre yoğunluğu %70-80 seviyesine ulaştığında gerçekleştirilmiştir.

Yapılan dondurma işlemlerinin hemen öncesinde aşağıdaki protokola göre dondurma ortamı hazırlanmıştır:

1. Steril, konik santrifüj tüpünde, ihtiyaç duyulan dondurma ortamı için aşağıdaki bileşenler karıştırıldı:
  - %20 FBS içeren yüksek glukozlu DMEM besi ortamı
  - %70 hücrelerin hali hazırda içerisinde büyüdükleri besi ortamı
  - %10 steril DMSO
2. Hazırlanan dondurma ortamı filtre ile sterilize edildi ve tüp kullanılana kadar buz üzerine yerleştirildi. Kullandıktan sonra varsa kalan dondurma ortamı atıldı.

Başlamadan önce, kriyovialler etiketlendi ve aşağıdaki protokol takip edilerek dondurma işlemi gerçekleştirildi:

1. Hücreler yeteri kadar PBS ile üç defa yıkandı.
2. Yüze tutunan hücrelerin kaldırılması için 1-3 ml kadar Tripsin/EDTA (%0,05) (Gibco, ABD) solüsyonu flask yüzeyine eklendi.
3. Flask 5 dk süre ile 37 °C'de inkübasyona alındı.
4. İnkübasyon süresinin sonunda flask çeperine elle vurularak hücrelerin tamamen kalkması sağlandı.

5. Flask içine 10 ml kadar steril PBS solüsyonu eklendi ve süpürme yapılarak tüm flask içeriği 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.
6. Falkon tüp 1500 rpm'de 10 dk süre ile oda sıcaklığında santrifüj edildi.
7. Üst sıvı atıldıktan sonra tüpte kalan pellet üzerine +4 °C'de bekletilen dondurma ortamı eklendikten sonra hücreler ile homojenize edildi.
8. Her kriyovial'e 1 ml hücre süspansiyonu eklendi.
9. İdeal dondurarak saklama için donma hızı dakikada 1 °C azalacak şekilde dondurma yapıldı. Bu amaçla, Mr. Frosty freezing container (Thermoscientific, ABD)'a yerleştirilen vialler gece boyunca -80 °C'li dondurucuda donmaya bırakıldı.
10. Ertesi gün, uzun süreli depolama için donmuş vialler sıvı azot tankına aktarıldı.

### **3.4. HeLa ve MCF-7 Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar**

HeLa ve MCF-7 hücre hatları da primer hücreler gibi yüzeye tutunarak (monolayer) büyüme karakterine sahiptirler. Bu nedenle bu hücre hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda primer hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmalarda kullanılan kültür flaskları kullanılmıştır. Kullanılan çözdürme, pasajlama ve dondurma protokolleri kullanılan besi ortamı dışında birebir aynıdır. Bu iki hücre hattı için %10 FBS'li DMEM besi ortamı kullanılmış ve bütün işlemler bu besin ortamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.5. HEK293F Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar**

HEK293F (freestyle-insan embriyonik böbrek hücre hattı) veya Freestyle 293F (R79007, Gibco, ABD) olarak adlandırılan hücre hattının laboratuvarımıza ulaştırılmasını müteakip sıvı azot içerisinde saklaması alınmıştır. Hücre hattının protein ekspresyonu çalışmalarında kullanılmasından önce ana hücre stoğunun oluşturulması için pasajlamalar yapılmış ve bu pasajlardan saklamalar alınmıştır. Bu amaçla, satın alınan kültür Pasaj-0 olarak kabul edilerek 50 adet  $1 \times 10^7$  hücre/ml konsantrasyonunda hücre 1'er ml'lik vialler ile sıvı azot tankında saklamaya alınmıştır. Yapılan kültür ve pasajlamalar sonucunda 6. pasaj sayısına ulaşılmıştır. Bu da toplamda maksimum 30 pasaj kadar stabil olduğu ifade edilen söz konusu hücre hattının makul pasaj/stok sayısında ana stoğa alındığını göstermektedir.



### 3.5.1. Hücre Çözdürme, Pasajlama ve Dondurma

#### Hücre Çözdürme:

Hücre çözdürme işlemlerinde azot tankından alınan vial, tüp içeriğinin %80'i çözülünceye kadar 37 °C'deki su banyosunda tutulmuştur. Hemen sonrasında ise önceden 37 °C'ye getirilmiş 29 ml taze Freestyle 293 Expression Medium (Gibco, ABD) besi ortamı ile homojenize edilmiştir. Bu kapsamda aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Sıvı azottan 1 adet vial çıkartıldı ve 37 °C'deki su banyosunda tüp içeriğinin %80'i çözülünceye kadar hızla çözüldü.
2. Hücreler tamamen çözülmeden hemen önce vialin dışı %70 etanol ile dekontamine edildi. Hücre topaklanmaları var ise nazikçe parçalandı. Tüm vial içeriği 29 ml önceden ısıtılmış FreeStyle293 Expression besi ortamı içeren 250 ml'lik polikarbonat, tek kullanımlık, steril Erlenmeyer çalkalama kabına aktarıldı.
3. Hücreler, 135 rpm'de dönen bir orbital çalkalayıcı platform üzerinde %8 CO<sub>2</sub>'li nemli bir atmosfer içeren bir inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
4. Ertesi gün, tripan mavisi hücre sayım metodu ile ölü/canlı toplam hücre sayısı belirlendi. Genel olarak, canlılığın %70'in üzerinde olması beklenmektedir (Invitrogen, 2015). Bu seviyede veya biraz daha düşük seviyede ise kültüre devam edildi. Ancak canlılık %60'ın altında ise yeni bir vial çözdürülerek çalışma tekrar edildi.

#### Hücre Pasajlama:

Yapılan hücre kültürasyonları sırasında besi ortamı olarak FreeStyle Expression Medium (Invitrogen, ABD) kullanılırken, kültürasyon kabı olarak tek kullanımlık steril membran kapaklı 250 ml ve 1 L'lik erlenler kullanılmıştır. Söz konusu erlenler ile çalışılırken çalışma hacmi olarak havalandırmanın optimum düzeyde tutulabilmesi amacı ile 135 rpm ile orbital çalkalama yapılarak %20'lik çalışma hacminin aşılmamasına özen gösterilmiştir. Kültürasyonlar, 37 °C'de %8 CO<sub>2</sub>'li nemlendirilmiş atmosfere sahip etüv içerisinde çalkalamalı platform kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sırasında kültürdeki hücre konsantrasyonunun 3x10<sup>6</sup> hücre/ml'nin üzerine çıkmamasına özen gösterilmiştir.

Teorik olarak hücrelerin yarılanma süreleri 22-28 saat olarak ifade edilmektedir. Ancak çözdürme sonrasındaki ilk pasajlarda hücrelerin yarılanma sürelerinin 28 saatin üzerine çıktığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, çözdürme sonrasında yapılan ilk pasajlama işlemi 5

gün sonra yapılabilmişken ikinci pasajlama ve üçüncü pasajlama işlemleri sırası ile 4 ve 3 gün sonra gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin çözdürme sonrasında transfeksiyon işlemine hazır hale gelebilmeleri için en az 5 ardışık pasajlama yapılması önerilmektedir (Invitrogen, 2015). Yarılanma süresinin müteakip pasajlar ile azalması, bu yaklaşımın doğruluğunu teyit etmektedir. Bu nedenle, transfeksiyon işlemi öncesinde en az 5 pasaj yapılmış ve hücrelerin toplam pasaj sayısının 30'un üzerine çıkmamış olmasına özen gösterilmiştir.

Yapılan pasajlama işlemleri sırasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Erlen içerisinde 50 ml'lik steril bir falkon içerisine homojen şekilde 30 ml kadar örnek alındı.
2. Alınan örneğe maksimum hızda 15-20 sn ile vorteks uygulandı.
3. Steril kabinde bu örnekten 50 µl kadar sayım için örnek alındı.
4. Canlı hücre sayısını belirlemek için tripan mavisi hücre sayım metodu ile alınan örneğe sayım yapıldı.
5. 1. adımda belirlenen hücre yoğunluğu kullanılarak yeni kültür konsantrasyonu  $2 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde inokülasyon için gereken bölünme oranı hesaplandı. Bu amaçla, aşağıdaki formül kullanıldı:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Başlangıç Hücre Konsantrasyonu	X	Alınacak Olan Hacim	=	Elde Edilmek İstenen Nihai Hücre Konsantrasyonu	X	Nihai Kültür Hacmi
--------------------------------	---	---------------------	---	---	---	--------------------

6. "Alınacak olan hacim" formüle göre hesaplandıktan sonra, hücreler arzu edilen nihai hacimde (Ör. rutin pasajlama için  $2 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde) taze, önceden ısıtılmış FreeStyle 293 Expression besi ortamında seyreltildi.

#### Hücre Dondurma:

Ana hücre stoğunun oluşturulması sırasında yapılan pasajlamalar ile bir yandan mevcut hücre konsantrasyonunun artırılmasına çalışılmış, bir yandan da pasajlama sonrasında elde kalan hücreler ile ana stoğun oluşturulması sağlanmıştır. Bu amaçla, kültürdeki hücre yoğunluğu  $3 \times 10^6$  hücre/ml'ye yaklaştığında bir kısım hücre pasajlamada kullanılırken kalan hücreler ise 1 ml'lik alikotlar ile  $1 \times 10^7$  hücre/ml'lik konsantrasyonda dondurulmuştur.

Yapılan dondurma işlemlerinin hemen öncesinde aşağıdaki protokola göre dondurma ortamı hazırlanmıştır:

1. Steril, konik santrifüj tüpünde, ihtiyaç duyulan dondurma ortamı için aşağıdaki bileşenler karıştırıldı:
  - %45 FreeStyle 293 Expression Medium besi ortamı
  - %45 hücrelerin hali hazırda içerisinde büyüdükleri besi ortamı
  - %10 steril DMSO
2. Hazırlanan dondurma ortamı filtre ile sterilize edildi ve tüp kullanılana kadar buz üzerine yerleştirildi. Kullandıktan sonra varsa kalan dondurma ortamı atıldı.

Başlamadan önce, kriyovialler etiketlendi ve aşağıdaki protokol takip edilerek dondurma işlemi gerçekleştirildi:

1. Hücre yoğunluğu  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  hücre/ml seviyesine ulaştığında hücreler toplandı ve steril, konik bir santrifüj tüpüne aktarıldı.
2. Canlı ve toplam hücre sayımları yapıldı ve  $1 \times 10^7$  canlı hücre/ml'lik bir nihai hücre yoğunluğu elde etmek için gereken donma ortamı hacmi "Hücre Pasajlama" adımında verilen formül ile hesaplandı.
3. Hücreler 100xg'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi ve üst sıvı dikkatlice aspire edildi.
4. Hücreler, önceden belirlenmiş miktardaki soğutulmuş donma ortamı içinde yeniden süspanse edildi.
5. Her kriyovial'e 1'er ml hücre süspansiyonu aktarıldı.
6. İdeal dondurarak saklama için donma hızı dakikada 1 °C azalacak şekilde dondurma yapıldı. Bu amaçla, Mr. Frosty freezing container (Thermoscientific, ABD)'a yerleştirilen vialler gece boyunca -80 °C'li dondurucuda donmaya bırakıldı.
7. Ertesi gün, uzun süreli depolama için donmuş vialler sıvı azot tankına aktarıldı.

### **3.6. Rekombinant TFF'nin Üretimi**

rTFF proteininin üretilmesi amacı ile *E. coli* hücrelerinde çoğaltılan ve endotoksinsiz şekilde saflaştırılması yapılan plazmit, polietilenimin (PEI) kullanılarak HEK293F hücrelerine

aktarılmıştır. Bu şekilde transfeksiyon yapılarak kesikli (batch) ve tekrarlı yarı-kesikli (repeated fed-batch) modlarda olmak üzere iki farklı kültür modunda üretim yapılmıştır.

### 3.6.1. HEK293F Hücre Hattı'nın Transfeksiyonu

HEK293F hücre hattı ile yapılan çalışmalarda, hücre çözündürme basamağından transfeksiyon basamağına gelinceye kadar en az 5 pasaj yapılmasına özen gösterilmesi tavsiye edilmektedir (Invitrogen, 2015). Bu nedenle ilk çalışma için doğrudan 7. pasaj kullanılmasına karşın diğer çalışmalarda ana stoklar kullanıldığı için transfeksiyon amacı ile en erken 11. pasaja gelinmiştir. Sonrasında aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Transfeksiyondan 24 saat önce hücre konsantrasyonu  $1 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde 50 ml'de 1 L'lik flask içerisinde ayarlandı.
2. Ertesi gün hücre konsantrasyonu tekrar sayım alındıktan sonra 50 ml'de  $2,8 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Bu amaçla, hücrelerin ikilenme zamanları da dikkate alınarak tam olarak 24 saat sonra işlem yapıldı.
3. 24 saat sonra, 100xg'de 5 dk oda sıcaklığında yapılan santrifüj sonrası 50 ml'de  $2,8 \times 10^6$  hücre/ml olacak şekilde besi ortamı tazelendi.
4. Transfekte edilmek istenen plazmidin kültüre eklenmeden önce uygun konsantrasyonda hazırlanması işlemine geçildi. Bu amaçla, daha önceden  $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'lik ultra saf su içerisinde izole edilmiş olan endojensiz plazmit stoğu kullanıldı.
  - a. Kültürdeki nihai plazmit konsantrasyonu  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  olacak şekilde, 50 ml için 150  $\mu\text{g}$  plazmit almak amacı ile  $3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  plazmit stoğundan (%10 pipetaj hata payı da dâhil edilerek) 55  $\mu\text{l}$  alındı.
  - b. 55  $\mu\text{l}$  plazmit, 275  $\mu\text{l}$  taze FreeStyle 293 Expression Medium besi ortamı ile (300  $\mu\text{l}$  + %10 pipetaj hata payı ile birlikte toplamda 330  $\mu\text{l}$  olacak şekilde) karıştırıldı.
5. Plazmidin hazırlanması işlemine paralel şekilde, plazmidin hücre içerisine taşınması amacı ile kullanılacak olan PEI'nin (polietilenimin) hazırlanması işlemi yapıldı. Bu amaçla, önceden 25 mM HEPES ve 150 mM NaCl (pH: 7,5) içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanıp steril şekilde filtre edildikten sonra alikotlar halinde  $-20^\circ\text{C}$ 'deki dondurucuda saklanan PEI stok solüsyonu kullanıldı.
  - a. Oda sıcaklığında çözdürülen stok solüsyonundan 495  $\mu\text{l}$  ( $450 \mu\text{l} + \%10$  pipetaj hata payı) alınarak 495  $\mu\text{l}$  taze besi ortamı ( $450 \mu\text{l} + \%10$  pipetaj hata payı) ile karıştırıldı (toplam: 990  $\mu\text{l}$ ).

6. Sonrasında, 4. basamakta hazırlanan 330 µl'lik karışım 50 ml taze besi ortamı ile kültürü yapılan kültüre ilave edilerek 37 °C'de %8 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 135 rpm orbital çalkalama hızı ile 5 dakika kadar inkübasyona alındı.
7. Süre bitiminde etüvden alınan kültüre, 5. basamakta hazırlanan 990 µl'lik karışım ilave edilerek homojenizasyon sonrasında kültür tekrar inkübatöre alındı. Kültüre 37 °C'de %8 CO<sub>2</sub> içeren etüv içerisinde 135 rpm'de çalkalama yapılarak devam edildi.
8. 24 saat sonra ekspresyon verimini artırmak amacı ile kültüre VPA (valpörasik asit) ilavesi yapıldı. Bu amaçla, önceden ultra saf su içerisinde 220 mM konsantrasyonda hazırlanarak steril şekilde filtre edildikten sonra alikotlar halinde -20 °C'deki dondurucuda saklanan VPA stok solüsyonu kullanıldı.
  - a. Kültürdeki nihai konsantrasyonu 10 µl/ml olacak şekilde, VPA stok solüsyonundan 1 ml alınarak 50 ml taze besi ortamı ile karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım, 50 ml'lik ilk inkübasyon hacmine ilave edilerek kültürün nihai transfeksiyon hacmi 100 ml'ye çekildi.

PEI-DNA karışımının kültüre eklendiği transfeksiyon aşamasından itibaren fermantasyona 7 gün süre ile 37 °C'deki %8 CO<sub>2</sub>'li etüvde 135 rpm orbital karıştırma ile devam edilmiştir. Söz konusu 7 günlük süre, Invitrogen (2015)'de IgG için yer alan 5-7 günlük post-transfeksiyon önerisi dikkate alınarak tercih edilmiştir.

Kültür sonlandırıldıktan sonra, oda sıcaklığında 100xg'de santrifüj yapılarak üst sıvı toplanmıştır. Toplanan üst sıvı +4 °C ve oda sıcaklığında saklanmak üzere iki eşit parçaya ayrılarak steril falkon tüplerde alüminyum folyoya sarılı halde saklamaya alınmıştır.

#### Negatif Kontrol Kültürleri:

Pozitif ekspresyon kültürü ile yapılan analiz ve testlerde negatif kontrol olarak kullanmak üzere yukarıda detayları paylaşılan pozitif ekspresyon kültürlerine paralel şekilde negatif kontrol kültürleri de çalışılmıştır. Bu amaçla pozitif ekspresyon kültürü için kullanılan hücre miktarı, kimyasallar, fermantasyon rejimi ve bütün diğer şartlar tamamı ile aynı tutulmuştur. Yalnız söz konusu negatif kültürler tek bir farklılık içermektedir. Pozitif kültür için ortama su içerisinde hazırlanmış saf plazmit ilave edilirken negatif kültüre yalnızca su ilave edilmiştir.

### 3.6.2. Protein Ekspresyonu

#### 1. Kesikli Modda Kültür:

Bu kapsamda yapılan kültür işlemi transfeksiyon sonrasında 7 gün sürdürülmüştür. Bu süre boyunca kültür ortamına herhangi bir müdahalede bulunulmamıştır. 7. günün sonunda kültür sonlandırılmıştır. Hücrelerin santrifugasyon ile separasyonu sonrasında elde edilen üst sıvı ileri analiz ve saflaştırma işlemleri için saklamaya alınmıştır.

#### 2. Tekrarlı Yarı-kesikli Modda Kültür:

Yapılan kültür işlemi, transfeksiyon sonrasında 7 gün süre ile sürdürülmüştür. Bu kapsamda, transfeksiyon işlemi sonrasında 7 gün süre ile günlük olarak kültürün yarısı santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst sıvının yarısı +4 °C’de, diğer yarısı ise oda sıcaklığında saklamaya alınmıştır. Santrifüj ile ayrımı yapılan hücre pelleti aynı miktarda taze besi ortamı ile süspanse edilerek kültür ortamına tekrar beslenmiştir. Bu şekilde devam ettirilen kültür, 7. günün sonunda bütün kültürün santrifüj edilmesi ve elde edilen üst sıvının saklanması ile sonlandırılmıştır.

### 3.7. Rekombinant TFF’nin Saflaştırılması

#### 3.7.1. Protein A Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma

rTFF’nin saflaştırılması amacı ile ticari antikor saflaştırma işlemlerinde sıklıkla tercih edilen Protein A rezini kullanılmıştır. Antikor saflaştırma işlemlerinde Protein A rezini, IgG moleküllerinin Fc domainleri ile etkileşime girerek fizyolojik pH’da antikorun rezine seçici olarak bağlanmasına yol açar. Yapılan yıkamalar ile safsızlıkların kolondan uzaklaştırılmasından sonra, elüsyon tamponu ile pH’nın düşürülmesi sonucunda kolona bağlanan antikorun kolondan indirilmesi sağlanır. Bundan bir sonraki basamak ise nötralizasyon basamağıdır. Zira, antikor vb. aktivite gösteren protein yapısındaki moleküllerin uzun süreler boyunca düşük pH’ya maruz kalmaları halinde aktivitelerini kaybetme durumları söz konusudur. Bu nedenle, antikorun kolondan indirilmesinden hemen sonra içinde bulunduğu solüsyonun pH’sı nötralize edilir.

rTFF’nin, sahip olduğu IgG1-Fc domaini sayesinde bu yolla saflaştırılması için NGC (BioRad, ABD) protein sıvı kromatografi sistemi ile 1 ml reçineye sahip HiTrap rProtein A

FF (GE Healthcare, ABD) kolonu kullanılmıştır (Çizim 3.7). Safılaştırma işleminde kullanılan solüsyonlar ve içerikleri aşağıda paylaşıldığı şekildedir:

- Bağlama Tamponu: 20 mM Sodyum Fosfat + %0,1 NaN<sub>3</sub> (pH: 7,0)
- İndirme (elüsyon) Tamponu: 0,1 M Sodyum Citrate + %0,1 NaN<sub>3</sub> (pH: 3,0)
- Nötralizasyon Tamponu: 1 M Tris-HCl + %0,1 NaN<sub>3</sub> (pH: 9,0)



**Çizim 3.7.** rTFF'nin Protein A Kolon Kromatografisi ile NGC Sistemi Kullanılarak Safılaştırılması

Safılaştırma amacı ile takip edilen protokol aşağıda verilmiştir:

1. Öncelikle 10 ml kadar ekspresyon kültürü üst sıvısı 1:3 oranında bağlama tamponu ile karıştırıldı.
2. Elde edilen solüsyon 0,45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra sisteme enjekte edildi.
3. Safılaştırma protokolü başlatılmadan hemen önce fraksiyon toplayıcı içerisinde mevcut olan tüplere 100'er µl nötralizasyon tamponu eklendi.
4. Safılaştırma işleminin başlatılması ile birlikte bağlama tamponu kullanılarak 10 kolon hacmi ile kolonun şartlanması yapıldı.
5. Örneğin kolondan geçirilmesi sağlandı.
6. 10 kolon hacmi kadar bağlama tamponu ile kolon yıkandı.
7. Kolondan indirme amacı ile bağlama tamponu ve indirme tamponu arasında önce akışın %0 ile %100'ü indirme tamponu olacak şekilde 3 kolon hacminde gradiyent profil uygulandı.
8. Ardından, 5 kolon hacmi ile izokratik profilde indirme tamponu geçirildi.

9. Bu şekilde elde edilen bütün fraksiyonlar toplanarak, SDS-PAGE ile analiz edilmek üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

### **3.7.2. Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma**

İMAK (immobilize metal afinite kromatografisi) olarak da isimlendirilen bu kromatografi tipi kullanılarak yapılan saflaştırma işlemleri ile solvent erişimi olan bölgesinde 6 veya daha fazla ardışık histidin amino asidi içeren veya bu şekilde rekombinant olarak etiketlenmiş proteinlerin saflaştırılma işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Bunun yanı sıra Fc etiketli rekombinant proteinlerin veya IgG antikorlarının da aynı şekilde Fc domainlerinde yoğun ve ardışık halde bulunan histidine amino asitleri nedeni ile bu rezinler ile etkileşime girdikleri ve bu yolla saflaştırılabildikleri bilinmektedir (Bornhorst ve Falke 2000, Jansen 2011). İşte bu nedenlerle, rTFF'nin TFF domaininin 25-38. amino asitleri arasında bulunan "HTHTHTHTHTHTH" motifi ve Fc domaini sayesinde rezine bağlanarak saflaştırılması amaçlanmıştır. Ancak proteinin kolonda çökelme ihtimali hesaba katılarak yapılması planlanan saflaştırma işleminin üre kullanılarak dentüre şartlarda gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle Amicon karıştırılmalı hücre (stirred cell) aparatı (Merck, Almanya) kullanılarak tampon değişimi yapılmıştır (Çizim 3.8).

#### *Amicon Karıştırılmalı Hücre Aparatı ile Tampon Değişimi:*

Ni-NTA kolon kromatografisi öncesinde proteinin içerisinde bulunduğu ekspresyon kültürü üst sıvısının üreli tampon ile değiştirilmesi amacı ile 3 ml'lik Amikon karıştırılmalı hücre aparatı ile 5 kDa'lık membran filtre kullanılmıştır. Azot gazı basıncı altında yapılan söz konusu işlemde, mevcut üst sıvı solüsyonunun Ni-NTA kolon kromatografisi yükleme tamponu ile değiştirilmesi sağlanmıştır.





**Çizim 3.8.** Amikon Karıştırma Hücresi

*rTFF'nin Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması:*

rTFF'nin bu yolla saflaştırılması için NGC protein likit kromatografi sistemi ile 1 ml Ni-NTA reçineye sahip HisTrap FF (GE Healthcare, ABD) kolonu kullanılmıştır (Çizim 3.9). Saflaştırma işlemi sırasında kullanılan solüsyonlar ve içerikleri aşağıda paylaşıldığı şekildedir:

- Bağlama Tamponu: 6 M Üre, 50 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 20 mM İmidazol (pH: 8,0)
- İndirme (elüsyon) Tamponu: 6 M Üre, 50 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 300 mM İmidazol (pH: 8,0)



**Çizim 3.9.** rTFF'nin Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile NGC Sistemi Kullanılarak Saflaştırılması

Saflaştırma amacı ile takip edilen protokol aşağıda verilmiştir:

1. Bir önceki basamakta Amikon karıştırılmalı hücre aparatı kullanılarak tamponu değiştirilmiş ekspresyon kültürü üst sıvısı 0,45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra sisteme enjekte edildi.
2. Saflaştırma işleminin başlatılması ile birlikte bağlama tamponu kullanılarak 10 kolon hacmi ile kolonun şartlanması yapıldı.
3. Örneğin kolondan geçirilmesi sağlandı.
4. 5 kolon hacmi kadar bağlama tamponu ile kolon yıkandı.
5. Kolondan indirme amacı ile bağlama tamponu ve indirme tamponu arasında önce akışın %0 ile %100'ü indirme tamponu olacak şekilde 3 kolon hacminde gradiyent profil uygulandı.
6. 5 kolon hacmi ile izokratik profilde indirme tamponu geçirildi.

Bu şekilde elde edilen A/5-A/6 ve A/7 fraksiyonları toplanarak SDS-PAGE ve diğer ileri analizlerin yapılması amacı ile +4 °C'ye kaldırıldı.

### 3.8. Saflaştırma Sonrası Protein Analizleri

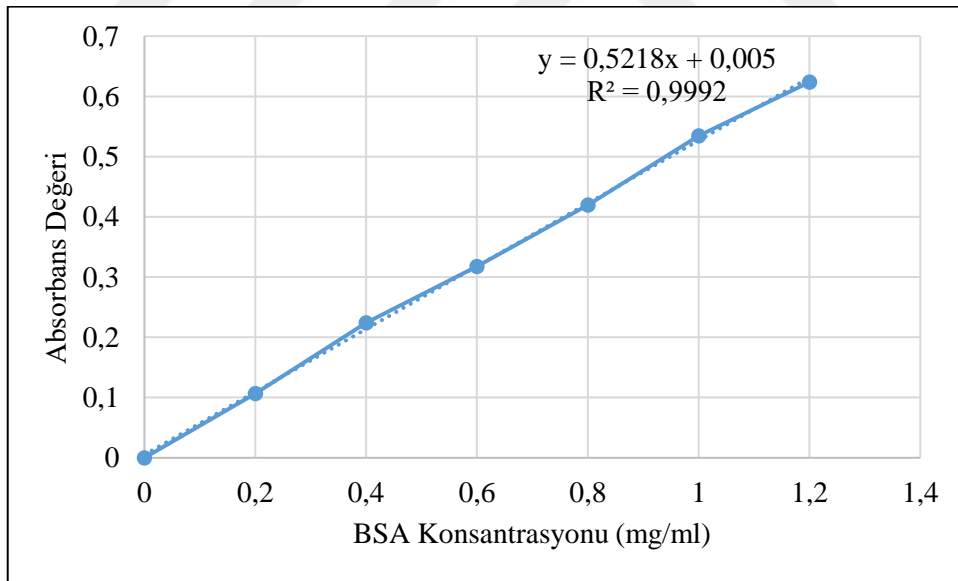
#### 3.8.1. Saflaştırılmış Fraksiyonun 2D-Clean Up ile Temizlenmesi ve Konsantre Edilmesi

Elde edilen protein fraksiyonunun Üre'den arındırılması ve yaklaşık 5 kat konsantre edilerek western blotlama çalışmasında görünürlüğünün artırılabilmesi amacı ile 2D clean up kit (BioRad, ABD) kullanılmıştır. Ticari olarak satın alınan kit içerisinde yer alan protokole göre temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm aşamalar buz üzerinde yapılmıştır. Bu kapsamda aşağıda detayları verilen yöntem takip edilmiştir:

1. Elde edilen 500 µl'lik saflaştırılmış fraksiyondan (A/6 fraksiyonu) 100 µl alınarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu.
2. Tüpe 300 µl çöktürücü ajan-I eklenip, vorteks yapılarak iyice karıştırıldı.
3. Yaklaşık 15 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra 300 µL çöktürücü ajan-II eklenip vorteks yapıldı.
4. 16.000xg'de +4 °C'de 5 dk santrifüj yapıldı.
5. Santrifüj sonrasında, üst kısım uzaklaştırılarak alttaki çökelti kısmı tekrar santrifüj edildi.
6. Mevcut pellet üzerine 40 µL yıkama solüsyonu-I konularak 16.000xg'de +4 °C'de 5 dk santrifüj edildi.
7. Üstteki sıvı kısım uzaklaştırıldı. Çökelti kısmı 25 µl proteomiks grade ultra-saf su ile yıkanarak tüpe yaklaşık 10-20 saniye süre ile vorteks yapıldı.
8. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra, önceden -20 °C'de en az 1 saat bekletilerek soğutulmuş olan yıkama solüsyonu-II'den 1ml ve yıkama additive solüsyonundan 5 µl eklendi. Tüpe 1 dk süre ile vorteks yapıldı.
9. Tüp -20 °C'de 30 dk bekletildi. Bu süre zarfında, 10 dk'da bir 30 saniye süre ile vorteks uygulandı.
10. İnkübasyon periyodunun ardından, 16.000xg'de +4 °C'de 5 dk süre ile santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı. Tüp içerisindeki pellet, tüpün kapağı açık halde oda ısısında maksimum 5 dk olacak şekilde kurumaya bırakıldı.
11. Pellet kısmı yeniden çözünür hale getirmek ve SDS-PAGE jeline yüklemek için 6x SDS-PAGE yükleme tamponu eklenerek vortekslendi.
12. Yükleme tamponunda homojen şekilde çözülen pelletin, western blotlama analizlerinde kullanılmak üzere SDS-PAGE jeline yüklemesi yapıldı.

### 3.8.2. Bradford Yöntemi ile Protein Konsantrasyonu Tayini

Protein örneklerindeki protein miktarlarının tespit edilebilmesi amacı ile kolorimetrik bir metot olan Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976). Bu yöntemde, konsantrasyonu tayin edilmek istenen protein çözeltisi asidik bir solüsyon içerisinde hazırlanmış olan Coomassie Brilliant Blue G250 boyası ile muamele edilmektedir. Boya, başta arjinin olmak üzere affinite gösterdiği diğer amino asitler ile etkileşime girerek bir renk değişimine neden olmaktadır. Meydana gelen renk değişimi 595 nm dalga boyunda bir spektrofotometrik okuyucu ile okunarak çözeltinin protein konsantrasyonuna ulaşılmaktadır. Protein çözeltilerinin absorbans değerleri, standart bir protein olan saf sığır serum albumin protein (BSA) çözeltisinin farklı derişimlerinden alınan absorbans değerleri ile karşılaştırılarak çözeltinin protein miktarları hesaplanmaktadır. Çalışmamızda baz alınan BSA protein standart eğrisi Çizim 3.10'de verilmiştir.



**Çizim 3.10.** Bradford Yöntemi ile Elde Edilen Protein Standart Eğrisi

Çalışmada, ticari olarak satın alınan BSA standardı kullanılmıştır (BioRad, ABD). BSA protein standardının üzerine 20 ml proteomiks grade ultra saf su eklenip küçük alikotlara bölünerek  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Bradford konsantrasyon ölçümü her bir örnek için üç

tekrarlı olarak yapılmıştır. Ticari olarak satın alınan Bradford protein konsantrasyon ölçüm kiti içerisinde yer alan protokol takip edilmiştir (BioRad, ABD). Firmadan satın alınan boya reaktifi, deiyonize edilmiş su kullanılarak 1:4 oranında dilüe edilmiştir. Partiküllerin uzaklaştırılması amacıyla steril filtre kağıdından geçirilmiştir. Hazırlanan boya reaktifi, cam şişe içerisinde ışığa maruz kalmayacak şekilde +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelmiş olmasına dikkat edilmiştir.

Örnek hazırlama ve ölçüm işlemleri sırasında aşağıdaki yöntem takip edilmiştir:

1. Miktarı ölçülecek her bir protein örneği 1:20 dilüsyon oranı ile 2D rehidrasyon solüsyonuyla karıştırıldı. İçerisinde protein bulunmayan kör solüsyonu ise yalnızca 2D rehidrasyon solüsyonu kullanılarak hazırlandı.
  - 2D Rehidrasyon Solüsyonu: 8 M Üre, 50 mM DTT, %2 CHAPS, %0,2 Bio-Lyte 3/10 amfolit, %0.002 Bromfenol mavisi
2. Her bir tüpe 1’er ml Bradford boyası eklendi.
3. Elde edilen karışım vorteks yapıldıktan sonra, oda ısısında ve karanlık ortamda 5 dk bekletildi.
4. Örneklerin absorbans değerleri, boyanın en iyi absorbans verdiği dalga boyu olan 595 nm’de spektrofotometre (Thermoscientific, ABD) ile okundu.
5. Alınan absorbans değerleri, öncesinde BSA kullanılarak oluşturulan standard eğri kullanılarak izdüşümüne göre ilgili konsantrasyon değerlerine dönüştürüldü.

### **3.8.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez**

Kültür üst sıvılarından ve saflaştırma işlemleri sonrasında toplanan fraksiyonlardan alınan protein örneklerini moleküler büyüklüklerine göre ayırmak amacıyla sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) yapılmıştır. SDS varlığında jel üzerinde yürütülen her bir proteinin ve proteinlerin alt ünitelerinin jelde tek bant oluşturacak şekilde ayrımı sağlanabilmektedir. Ayrım yapılacak proteinin moleküler büyüklüğüne göre kullanılması gereken jel yüzdesi ve formülasyonu değişkenlik gösterebilmektedir. Bu kapsamda görüntülenmesi istenen proteinin büyüklüğüne göre kullanımı tercih edilen jel yüzdeleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Görüntülenmek İstenen Proteinin Büyüklüğüne Göre Kullanılan Jel Yüzdeleri

<b>Protein Büyüklüğü (kDa)</b>	<b>Jel Yüzdesi</b>
~ 5-50 kDa	% 18
~ 5-60 kDa	% 16
~ 10-80 kDa	% 14
~ 20-150 kDa	% 12
~ 30-200 kDa	% 10
~ 40-250 kDa	% 8
~ 60-300 kDa	% 6
~ 10-400 kDa	% 4

*Yürütme Jeli'nin Hazırlanması:*

Jel elektroforezi öncesinde, jelin dökülmesi amacı ile aşağıdaki yöntem takip edilmiştir:

1. Jelin arasına dökülecek olduğu cam tabakalar %70'lik etanol ve saf su ile temizlenip kurutuldu.
2. %12'lik olarak hazırlanan ayırıcı jel solüsyonu (Çizelge 3.2), 1 ml'lik pipet yardımı ile cam tabakalar arasına üst kısımda yaklaşık 2 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Polimerleşme esnasında jelin üst kısmının düz olarak kalabilmesi için üst kısmına izopropanol döküldü ve jel yaklaşık 30 dk oda ısısında polimerleşmeye bırakıldı.
3. Polimerize olan jelin üst kısmındaki izopropanol uzaklaştırıldı. Üstte kalan 2 cm'lik kısma, hazırlanan %4'lük istifleme jel solüsyonu döküldü (Çizelge 3.2).
4. Ayırıcı jel üzerine istifleme jeli döküldükten sonra, jel kuyucuklarını oluşturmak amacıyla 10 adet diş içeren tarak yerleştirildi ve jel oda ısısında yaklaşık 30 dk kadar polimerizasyona bırakıldı.
5. Polimerleşme sonrasında cam plakalar arasındaki taraklar kuyucuklara zarar vermeden çıkarıldı. Cam tabakalar içerisindeki jel elektroforez tankı içerisine yerleştirildi.

*Örneklerin Jel'e Yüklenmesi ve Jel'in Yürütülmesi:*

Hazırlanan jelin polimerize olmasından sonra, çalışmalar kapsamında elde edilen protein örneklerinin jele yüklenmesi yapılmıştır. Bu kapsamda aşağıdaki yöntem takip edilmiştir:

1. Protein örnekleri jele yüklenmeden önce 6x protein yükleme tamponu ile son hacimdeki oranı 1x olacak şekilde homojenize edildi.
  - *SDS-PAGE Jel Yükleme Tamponu (6x)*: 1 ml 0,5 M Tris-HCl, 1,6 ml % 10 SDS, 2 ml Gliserol, 0,4 ml  $\beta$ -merkaptoetanol, 0,4 ml bromofenol mavisi (8 ml).
2. 95-100 °C'de 5 dk süre ile kaynatılarak denatüre edildi.
3. Bu şekilde hazırlanan protein örnekleri oda ısısına getirildikten sonra jele yüklendi. Protein örneklerinin yanı sıra moleküler büyüklükleri bilinen renksiz marker (boyama ile görüntüleme için) veya renkli marker (western blotlama için) da jele yüklendi.
4. Jel tankı 1x SDS-PAGE jel yürütme tamponu ile dolduruldu. Örneklerin yüklenmesinden sonra jel, 180 V ve 400 mA elektrik akımında 50-60 dk süre ile yürütüldü.
  - *SDS-PAGE Jel Tamponu (10x)*: 90 g Tris, 144 g Glisin, 10 g SDS ultra saf suda 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır, 1x olarak kullanılır.

**Çizelge 3.2.** %12'lik Ayırıcı Jel Solüsyonu ve %4'lük İstifleme Jel Solüsyonu İçerikleri

<b>%12'lik Ayırıcı Jel Solüsyonu</b>	
Distile H <sub>2</sub> O	3,3 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,5 ml
% 30 Akrlamit-BisAkrlamit	4 ml
% 10 SDS	100 $\mu$ l
% 10 APS	100 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
<b>% 4'lük İstifleme Jeli Solüsyonu</b>	
Distile H <sub>2</sub> O	3,0 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	1,25 ml
% 30 Akrlamit-BisAkrlamit	670 $\mu$ l
% 10 SDS	50 $\mu$ l
% 10 APS	50 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l

### SDS-PAGE Jeli'nin Boyanması

Elektroforez işlemi tamamlanan jellerdeki protein bantlarını görünür hale getirmek için jeller önce fiksasyona tabi tutulmuş sonrasında ise boyanmıştır. Bu amaçla, sırası ile aşağıdaki yöntem takip edilmiştir:

1. Yürütme sonrasında iki cam plaka birbirinden dikkatlice ayrılarak tabakalar arasındaki jel, yırtılmadan ve zarar görmeden çıkarıldı.
2. Jelin üst kısmındaki %4'lük istifleme jeli kısmı kesilerek uzaklaştırıldı.
3. Jel üzerindeki proteinlerin jele iyice tutunmalarını sağlamak amacıyla fiksasyon (sabitleme) işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, yürütülen jel, içerisinde fiksasyon tamponu bulunan geniş bir kap içerisine alındı ve gece boyu (~16 saat) çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.
  - Fiksasyon Tamponu: %40 metanol, %10 asetik asit, %50 ultra saf su
4. Fiksasyon işleminin ardından, fiksasyon tamponu uzaklaştırılarak jel ultra saf su ile yıkandı.
5. Yıkanan jel, önceden hazırlanmış Bloo Moose Boyama Solüsyonu (Kerafast, ABD) ile boyandı. Boyama sırasında jel geniş bir kap içerisine alındı ve gece boyu (~16 saat) çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.
  - Bloo Moose Boyama Solüsyonu: 40 ml Solüsyon A, 10 ml Solüsyon B ile homojenize oluncaya dek karıştırılır.
6. Boyama işleminin ardından fazla boyanın uzaklaştırılması için jeller ultra saf su ile birkaç kez yıkandı.
7. Boyama işlemi tamamlanan jellerin, VersaDoc 4000 MP (Bio-Rad, ABD) görüntüleme cihazı ile veya yüksek çözünürlüklü optik bir tarayıcı cihaz kullanılarak görüntüleri alındı.

#### **3.8.4. Western Blotlama Analizi**

Örneklerin jelde yürütülmesinden sonra, belirli proteinlerin (rTFF, E-kaderin ve aktin) yürütülen örneklerdeki varlığının tespit edilebilmesi amacı ile western blotlama analizi yapılmıştır. Bu kapsamda, öncelikle yürütülen jellerdeki protein örneklerinin membrana yarı-kuru (semi-dry) transfer metodu ile transferi gerçekleştirilmiştir.



### Yarı-kuru Jel Transferi:

Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, ABD) yarı-kuru transfer sistemi kullanılmış ve aşağıdaki yöntem takip edilmiştir:

1. 2 adet 3MM filtre kağıdı, 1 adet nitroselüloz membran ve transferi yapılacak olan jel, transfer tamponu ile ıslatıldı.
  - Transfer Tamponu: 2,70 g Tris, 1,45 g Glisin, 1,87 ml %10 SDS, 100 ml metanol eklendikten sonra ultra saf su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.
2. Sırası ile 1 adet 3MM filtre kağıdı, üzerine membran, üzerine jel ve son olarak 1 adet 3MM filtre kağıdı olmak üzere üst üste yerleştirildi.
3. Yapılan sandviç üzerine bir miktar daha transfer tamponu eklendikten sonra arada hava boşluğu kalmayacak şekilde rulo ile sandviç üzerinden geçildi.
4. Kaset içerisinde biriken fazla tamponun kalanı döküldükten sonra kasetin kapağı kapatılarak kaset, transfer cihazı haznesine yerleştirildi ve 1 jel için transfer işlemi seçildi.

### Membranın Bloklanması ve Blotlama:

Transfer işleminin tamamlanmasından sonra, membran bloklama ve blotlama işlemleri için ayrı bir kaba alınarak aşağıdaki yöntem uygulanmıştır:

1. Transfer sonrası proteinleri bağlanmış olan membran 1 saat süre ile %5'lik yağsız süt tozu içeren TBST tamponu içerisinde bloklama için çalkalamaya bırakıldı.
  - TBS Çözeltisi (10X): 24,2 g Tris, 80 g NaCl, pH: 7,6 olacak şekilde hazırlanarak hacmi ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanır.
  - TBST: Kullanım öncesinde taze olarak 1X konsantrasyonda 1 L kadar hazırlanan TBS üzerine 1 ml Tween-20 eklendikten sonra kullanılır.
2. Bloklama sonrasında membran 3 kez (2x 5 dk ve 1x 15 dk süre ile) TBST tamponu kullanılarak yıkandı.
3. Yapılan yıkama sonrasında membran, TBST içerisinde uygun dilüsyonda hazırlanan birincil antikor ile 1 saat süre boyunca oda sıcaklığında inkübasyon için çalkalamaya bırakıldı.
  - Bu kapsamda kullanılan birincil antikorlar:  
Anti-6xHis (Invitrogen, ABD)(1:1000 dilüsyonda)

Anti-E-cadherin (SantaCruz, ABD)(1:1000 dilüsyonda)

Anti-β-actin (SantaCruz, ABD)(1:5000 dilüsyonda)

4. Süre sonunda membran 3 kez (2x 5 dk ve 1x 15 dk süre ile) TBST tamponu kullanılarak yıkandı.
5. Yapılan yıkama sonrasında membran, TBST içerisinde uygun dilüsyonda hazırlanan horseradish peroksidaz (HRP) bağlı ikincil antikor ile 1 saat süre boyunca oda sıcaklığında inkübasyon için çalkalamaya bırakıldı.
  - Bu kapsamda kullanılan ikincil antikorlar:
    - Anti-human Fc-HRP (SantaCruz, ABD)(1:5000 dilüsyonda)
    - Anti-human-HRP (Bio-Rad, ABD)(1:10.000 dilüsyonda)
6. Süre sonunda membran 3 kez (2x 5 dk ve 1x 15 dk süre ile) TBST tamponu kullanılarak yıkandı.
7. Clarity western ECL (Bio-Rad, ABD) kiti kullanılarak HRP enziminin ışığa yapması sağlandı. Bu kapsamda, antikora bağlı haldeki HRP enzimi, kullanılan ECL çözeltisi içerisinde bulunan Lumigen PS-3 substratını katalizlemektedir. Bu reaksiyon sonucu açığa çıkan luminol ise ışığa yapmaktadır.
8. Membran üzerinde gerçekleşen ışığa, X-ray filmlerin (GE Healthcare, ABD) kullanımı ile saptandı.

### 3.8.5. rTFF'nin Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi ile Karakterizasyonu

Üretimi yapılan rTFF'nin Sıvı Kromatografi Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) ile tanımlanabilmesi amacı ile tekrarlı yarı beslemeli kültür üst sıvısına LC-MS/MS uygulanmıştır. Bu kapsamda örneklere FASP protein kesim kiti (Expedeon, ABD) protokolu ile kesim yapılmıştır. Protokol kapsamında kullanılan solüsyonlar kesim öncesinde taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır. Hazırlanış protokolu aşağıda belirtildiği şekildedir:

- Üre Solüsyonu: 1 ml Tris.Cl solüsyonu 1 ml üre tüpü ile karıştırıldı.
- Iyodoasetamit (IAA) Solüsyonu (10X): 100 µl üre solüsyonu 1 adet IAA tüpü ile karıştırıldı. Pipetaj ile homojenize edildi. Temiz bir tüpe aktarıldı.
- Kesim Solüsyonu: 75 µl 50 mM amonyum bikarbonat içerisinde, 4 µg Tripsin olacak şekilde hazırlandı. Son konsantrasyonu: 0,05 µg/µl'dir. Kesimi istenen proteine karşılık gelen Tripsin oranı 1:100 olarak ayarlandı.

Hazırlanan solüsyonlar ile aşağıdaki yöntem takip edilerek kesim işlemi yapılmıştır:

1. 0,4 mg protein (maksimum 30 µl) ile 200 µl üre örnek solüsyonu spin filtrede karıştırıldı.
2. 14.000xg'de 15 dk. süre ile santrifüj edildi.
3. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
4. 10X IAA'dan 10 µl ile 90 µl üre solüsyonu spin filtreye eklendi.
5. 1 dakika süre ile yüksek hızda vorteks ile karıştırıldı.
6. Oda sıcaklığı ve karanlıkta 20 dakika boyunca karıştırılmadan beklemeye alındı.
7. 14.000xg'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi.
8. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
9. 100 µl üre solüsyonu spin filtreye eklendi.
10. 14.000xg'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi.
11. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
12. 9-11. adımlar 2 sefer daha tekrar edildi.
13. 100 µl 50 mM Amonyum Bikarbonat solüsyonu eklendi.
14. 14.000xg'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi.
15. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
16. 13-15. adımlar 2 sefer daha tekrar edildi.
17. 75 µl Kesim Solüsyonu spin filtreye eklendi.
18. 1 dakika süre ile yüksek hızda vorteks ile karıştırıldı.
19. Evaporasyonun minimize edilebilmesi amacı ile tüplerin kapağı parafilm ile sarılarak 37 °C'de 4-18 saat arası inkübasyona bırakıldı.
20. Ertesi gün, spin filtreler yeni toplama tüplerine aktarıldı
21. 40 µl 50 mM Amonyum Bikarbonat solüsyonu eklendi.
22. 14.000xg'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi.
23. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı.
24. 21-23. adımlar 1 sefer daha tekrar edildi.
25. 50 µl 0,5 M NaCl solüsyonu eklendi.
26. 14.000xg'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi.
27. Toplama tüpünde elde edilen parçalanmış protein fraksiyonu (filtrat) konsantratörde kurutuldu.
28. Örnek üzerine 20 µl %0,1 Formik asit ilave edilerek analiz için yükleme yapıldı.

### 3.9. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonuna Yönelik Analizler

#### 3.9.1. Tripan Mavisi Hücre Sayım Metodu

Tripan mavisi hücre sayımı metodu, canlı hücrelerin yüksek molekül ağırlığına sahip olan tripan mavisi'ni (872,88 g/mol) (Sigma, Almanya) hücre içine almamaları esasına dayanılarak yapılmaktadır. Bu kapsamda boyayı içerisine almış olan hücreler ölü olarak sayılırken, boyayı dışlamış olan hücreler canlı olarak sayılmaktadır. Yapılan sayımlar sırasında Thoma Sayım Lamı kullanılmıştır (Çizim 3.11). Sayım sahası içerisinde tercihen 30 kadar canlı hücre kalabilecek şekilde uygun dilüsyonların yapılması ve sayımların bu şekilde gerçekleştirilmesine özen gösterilmiştir. Sayım amacı ile süspanse hücre hatları ve yüzeye tutunan (monolayer) hücre hatları için ayrı protokollar takip edilmiştir.

#### Süspanse Hücre Hatlarının Sayımı:

HEK293F hücrelerinin pasajlamaları ve dondurulma öncesi sayımlarında sıklıkla 1:5-1:6 oranlarında dilüsyonlar uygulanmıştır. Bu kapsamda aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

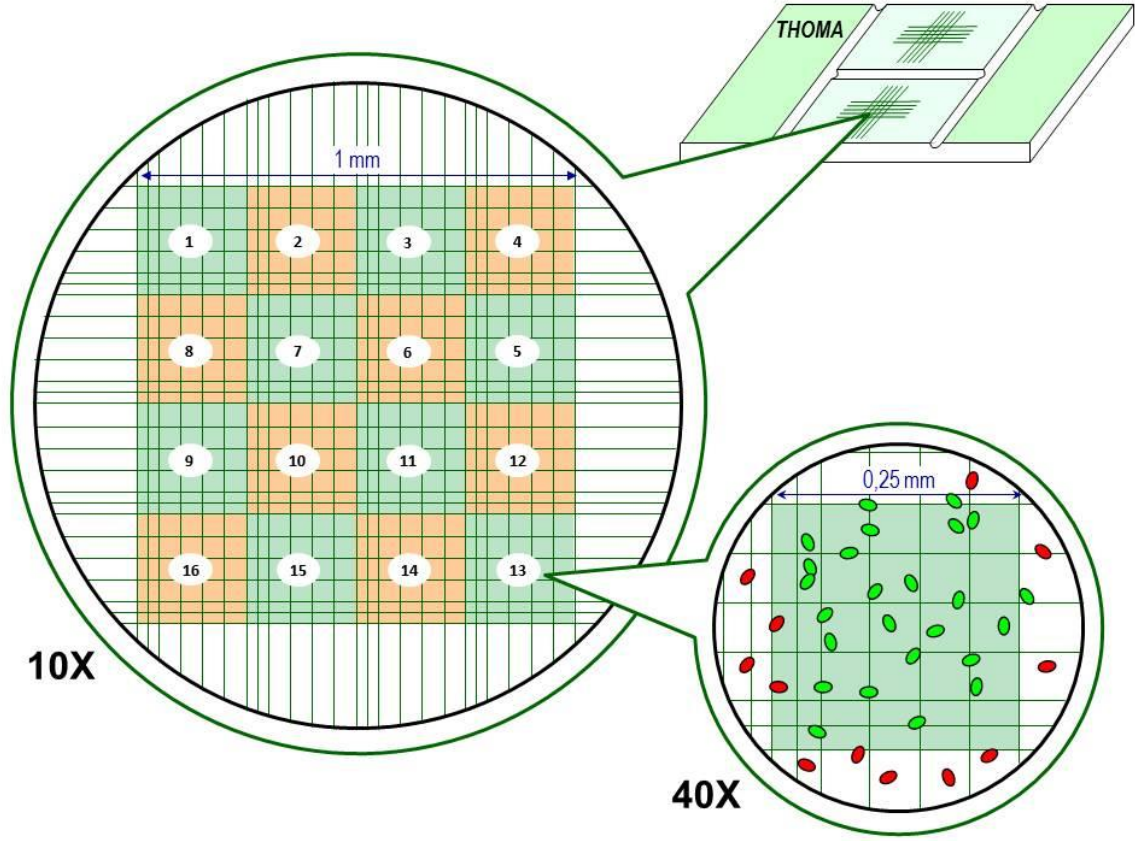
1. Kültür içerisinden 50 ml'lik steril falkona 30 ml kadar kültürasyon ortamı alındıktan sonra 10-20 sn. süre ile maksimum hızda vorteks uygulandı.
2. Sayım amacı ile bu homojenattan 50 µl kadar örnek alındı.
3. Alınan örnek, uygun dilüsyon oranında tripan mavisi ile karıştırıldıktan sonra Çizim 3.11'de gösterilen 1 adet büyük kare (16 adet küçük kare ile gösterilen) ile resmedilen alanda sayım yapıldı.
4. Sayım sırasında, boyayı dışlamış (canlı) olan hücreler ile boyayı almış (ölü) olan hücre sayıları not edildi.
5. Sayım sonucunda elde edilen hücre konsantrasyonunun hesaplanması amacı ile aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\begin{array}{l} \text{1ml'deki} \\ \text{Hücre Sayısı} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Büyük Kare} \\ \text{İçerisinde Kalan} \\ \text{Hücre Sayısı} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{Dilüsyon} \\ \text{Faktörü} \end{array} \times 10^4$$

Yüzeye Tutunan Hücre Hatlarının Sayımı:

Primer hücre hattı ve diğer monolayer hücre hatlarının sayımı amacı ile kullanılan kültür kabının yüzey alanına bağlı olarak farklı dilüsyonlar tercih edilmiştir. Bu kapsamda aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Hücrelerin üzerindeki besi yeri steril bir falkon içerisinde toplandı.
2. Yüzeye tutunmuş haldeki hücreler, 2-5 ml kadar PBS (fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi) ile yıkandı.
3. Yıkama amacı ile kullanılan PBS falkon içerisine alındı.
4. Tutunma yüzeyini kaplayacak kadar Tripsin-EDTA (Gibco, ABD) eklendi ve kültür kabı 5 dakika kadar inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon sonunda tutunma yüzeyine iyice vurularak hücrelerin kalkması sağlandı.
6. Hücrelerin toplanması amacı ile kalkan hücreler üzerine 2-5 ml kadar PBS eklendi. Pipetle iyice vurularak hücreler toplandı ve yine aynı falkon içerisine alındı.
7. 1500 rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edildi.
8. Üst sıvı atıldıktan sonra hücreler 250 µl taze besi yerinde iyice süspanse edildi.
9. Bu homojenattan sayım amacı ile 50 µl örnek alındı.
10. Bu basamaktan sonra "Süspanse Hücre Hatlarının Sayımı" için uygulanan 3, 4 ve 5 nolu basamaklar sırası ile aynı şekilde takip edildi.



Çizim 3.11. Thoma Sayım Lamı ile Hücre Sayımı

### 3.9.2. WST-1 Hücre Proliferasyonu Testi

Canlı hücrelerde bulunan süksinat-tetrazolim redüktaz ile tetrazolim tuzlarının renkli formazan bileşiklerine indirgenmesi, hücre canlılığı ile çoğalmasını ölçmek için hassas ve doğru bir yöntem sağlamaktadır. Bir tetrazolim tuzu olan WST-1 [2- (4-İyodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disülofenil) -2H- tetrazolyum], metabolik olarak aktif olan hücrelerde yüksek oranda suda çözünür formda formazan oluşmasına sebep olur. Böylece hücre canlılığı ve proliferasyonunun doğrudan kolorimetrik bir ölçüm ile tespit edilmesi sağlanır. Bu test ile rTFF veya P1 peptidi eklenmiş olan hücre hatlarının proliferasyon düzeylerinde herhangi bir farklılık olup-olmadığı tespit edilmiştir. Proliferasyon düzeyinde oluşan bir artış, farklılaşmaya ilişkin pozitif bir gösterge olarak kabul edilmektedir (Platica ve diğ. 1992).

Bu kapsamda aşağıda verilen yöntem takip edilmiştir:

1. 96 kuyucuklu bir doku kültür plağına kuyucuk başına  $1 \times 10^4$  hücre denk gelecek şekilde hücre ekimleri yapıldı ve hücrelerin kültürleri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li etüvde gerçekleştirildi.
2. Her kuyucuktaki son kültür ortamı hacmi 100  $\mu\text{l}$  olacak şekilde hücreler, P1 peptidi, rTFF proteini içeren pozitif kültür üst sıvısı veya negatif kontrol kültürü üst sıvısı ile 72 saat boyunca inkübe edildi.
3. Elektro Eşleme Reaktifi (ECR) çözüldü ve 1 adet WST-1 flakonu ile 2 ml ECR birleştirildi.
4. Kısaca vortekslendi ve kullanana kadar karanlıkta  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de bekletildi.
5. 96 kuyucuklu plağın her bir kuyusuna 10  $\mu\text{l}$  sulandırılmış WST-1 reaktifi eklendi.
6. Plak karıştırıldı ve  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika süre ile inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra multiwell plaka okuyucu cihaz (Multiskan FC, ThermoScientific, ABD) ile 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma gerçekleştirildi.

### **3.9.3. Mikroskopik Analizler**

MCF-7 ve primer hücre hatlarının mikroskopik olarak görüntülenmesi amacı ile 4x, 10x ve 40x'lik lensler ile birlikte Olympus inverted mikroskop sistemi (Olympus, Japonya) kullanılmıştır. Yapılan çekimler ilgili molekülün veya üst sıvının (rTFF pozitif kültür, negatif kültür veya P1 peptidi) 72 saat süre ile serumsuz besi yerinde hücreler ile inkübasyonu sonrasında gerçekleştirilmiştir. Yapılan çekimler sonrasında, elde edilen hücreler ileri analizler için kullanılmıştır.

### **3.9.4. Neonatal Fc Reseptörü'ne Bağlanma Testi**

Ekspresyon sonrasında elde edilen üst sıvılar ile negatif kontrol kültürü üst sıvısı farklı molekül büyüklüğüne karşı seçicilikleri olan membranlar kullanılarak diyaliz ve/veya ultrafiltrasyon ile konsantrasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Membrana yüklenen üst sıvıların retentatları kullanılarak biyotinasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak ise biyotinasyonu yapılan üst sıvılar kullanılarak sandviç ELISA (enzime bağlı immünozorbant testi) tabanlı olarak çalışan FcRn'ye (Neonatal Fc reseptörü) bağlanma testi (G-Biosciences, ABD) yapılmıştır.

### Üst Sıvının Farklı Metotlar İle Konsantre Edilmesi ve Biotinlasyonu

1. Üst sıvının biyotinlasyonu amacı ile kültürlerden toplanan üst sıvılar öncelikle karbonat tamponu'na (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH: 9,0) karşı farklı molekül büyüklüklerine seçicilikleri olan membranlar kullanılarak diyaliz ve/veya ultrafiltrasyon ile konsantrasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu şekilde 5 farklı örnek hazırlanmıştır. Bunlar:
  - A. 50 ml pozitif kültür üst sıvısı 50 kDa'lık diyaliz tüpü (SpectrumLabs, ABD) kullanılarak diyaliz edildi. Bradford analizi sonrasında 5 kDa'lık membran kullanılarak Amikon stirred-cell ile nihai protein konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde konsantre edildi.
  - B. 50 ml pozitif kültür üst sıvısı 50 kDa'lık diyaliz tüpü (SpectrumLabs, ABD) kullanılarak diyaliz edildi. Bradford analizi sonrasında 10 kDa'lık santrifugal konsantratör (Vivaspin 500, Sartorius, Almanya) ile nihai protein konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde konsantre edildi.
  - C. 10 ml pozitif kültür üst sıvısı 10 kDa'lık santrifügal filtre (Amikon-ultra, Merckmillipore, Almanya) ile nihai protein konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde konsantre edildi.
  - D. 3 ml pozitif kültür üst sıvısı 2 kDa'lık diyaliz kasedi (Thermoscientific, ABD) kullanılarak diyaliz edildi. Bradford analizi sonrasında 3 kDa'lık santrifugal konsantratör (Vivaspin 500, Sartorius, Almanya) ile nihai protein konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde konsantre edildi.
  - E. 3 ml negatif kültür üst sıvısı 50 kDa'lık diyaliz tüpü (SpectrumLabs, ABD) kullanılarak diyaliz edildi. Bradford analizi sonrasında 10 kDa'lık santrifugal konsantratör (Vivaspin 500, Sartorius, Almanya) ile nihai protein konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde konsantre edildi.
2. DMSO (Dimetilsülfoksit) içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde NHS-Biyotin (N-Hidroksisüksinimidobiyotin, H-1759, Sigma, ABD) solüsyonu hazırlandı.
3. 1 ml'ye 125 µl olacak şekilde her bir konsantre üst sıvı solüsyonuna biyotin solüsyonundan ilave yapıldı.
4. Bu şekilde hazırlanan biyotin-konsantre üst sıvı solüsyonu karışımları alüminyum folyo ile sarılı şekilde rotator üzerinde oda sıcaklığında 4 saat süre ile inkübasyona bırakıldı.



5. İnkübasyon süresi sonunda, rotatordan alınan solüsyonlar +4 °C'de PBS'ye (fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi) karşı 2 kDa'lık diyaliz kasetleri (Thermoscientific, ABD) kullanılarak diyalize tabi tutuldu.

#### FcRn'ye Bağlanma Testi

Hazırlanışı yukarıda paylaşılan 5 farklı örnekten (A,B,C,D,E) ilkinin (A'nın) bir bölümüne PBS'ye karşı diyaliz sonrasında 10 kDa'lık santrifugal konsantratör (Vivaspin 500, Sartorius, Almanya) ile konsantrasyon işlemi uygulanmıştır. Böylelikle test edilecek olan pozitif kültür örneği sayısı 4'ten-5'e çıkarılmıştır. Bunun yanı sıra, 1 adet negatif kültür örneği (E), 1 adet antijen negatif kontrolü ve 1 adet biyotinlenmiş ikincil antikor negatif kontrolü çalışılmıştır. Bu amaçla aşağıdaki protokol takip edilmiştir:

1. Birincil antikor ile kaplı 96 kuyulu plak, standart, numune ve kontrol eklenmeden önce yıkama solüsyonu ile 2 defa yıkandı.
2. Standart çözeltileri 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,313 ng/ml ve 0 ng/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde p51 proteini standardı kullanılarak hazırlandı ve 8 adet kuyuya 100'er µl olacak şekilde sıra ile eklendi.
3. Örneklerin çalışılacağı kuyulara 10 ng/ml konsantrasyonundaki p51 proteininden 100'er µl olacak şekilde eklendi.
4. Antijen negatif kontrolü kuyularına (3 adet) yalnızca standart hazırlama solüsyonundan 100 µl eklendi.
5. Plak folyo ile kapatıldı ve 37 °C'de 90 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı.
6. Folyo çıkarıldı, plak içeriği atıldı ve kullanılan kuyular yıkama tamponu ile 2 defa yıkandı.
7. Standart kuyuları ve antijen negatif kontrolü kuyularına 100'er µl biyotinlenmiş ikincil antikor'dan kuyu cidarlarına dokunulmadan eklendi.
8. Örneklerin çalışılacağı kuyulara ise toplamda 100'er µl olacak şekilde her bir örnekten 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 ve 1:16 dilüsyonlarda ekleme yapıldı.
9. Plak bir folyo ile kapatıldı ve 37 °C'de 60 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon süresi sonunda folyo çıkarıldı, plak içeriği atıldı ve kullanılan kuyular yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı.
11. Kuyulara HRP-Streptavidin konjugat solüsyonundan 100'er µl eklendi.
12. Plak bir folyo ile kapatıldı ve 37 °C'de 30 dakika süre ile inkübasyona bırakıldı.

13. İnkübasyon süresi sonunda folyo çıkarıldı, plak içeriği atıldı ve kullanılan kuyular yıkama tamponu ile 5 defa yıkandı.
14. Yıkamalar sonrasında her bir kuyuya 90 µl TMB Substrat solüsyonundan eklendi.
15. Yeterli ışığa sağlandıktan sonra her bir kuyuya 50'şer µl Stop solüsyonundan eklendi ve içerik homojenize edildi.
16. Hemen sonrasında multiwell plaka okuyucu cihaz (Multiskan FC, ThermoScientific, ABD) kullanılarak 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma gerçekleştirildi.

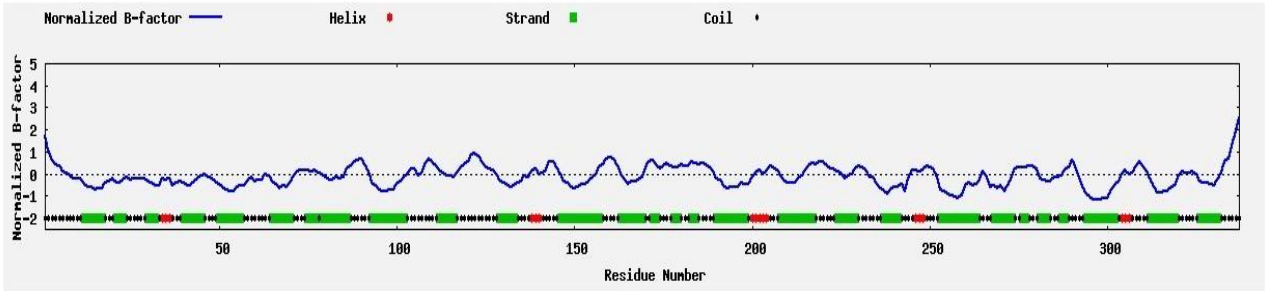


## 4. BULGULAR

### 4.1. Proteinin tasarımı

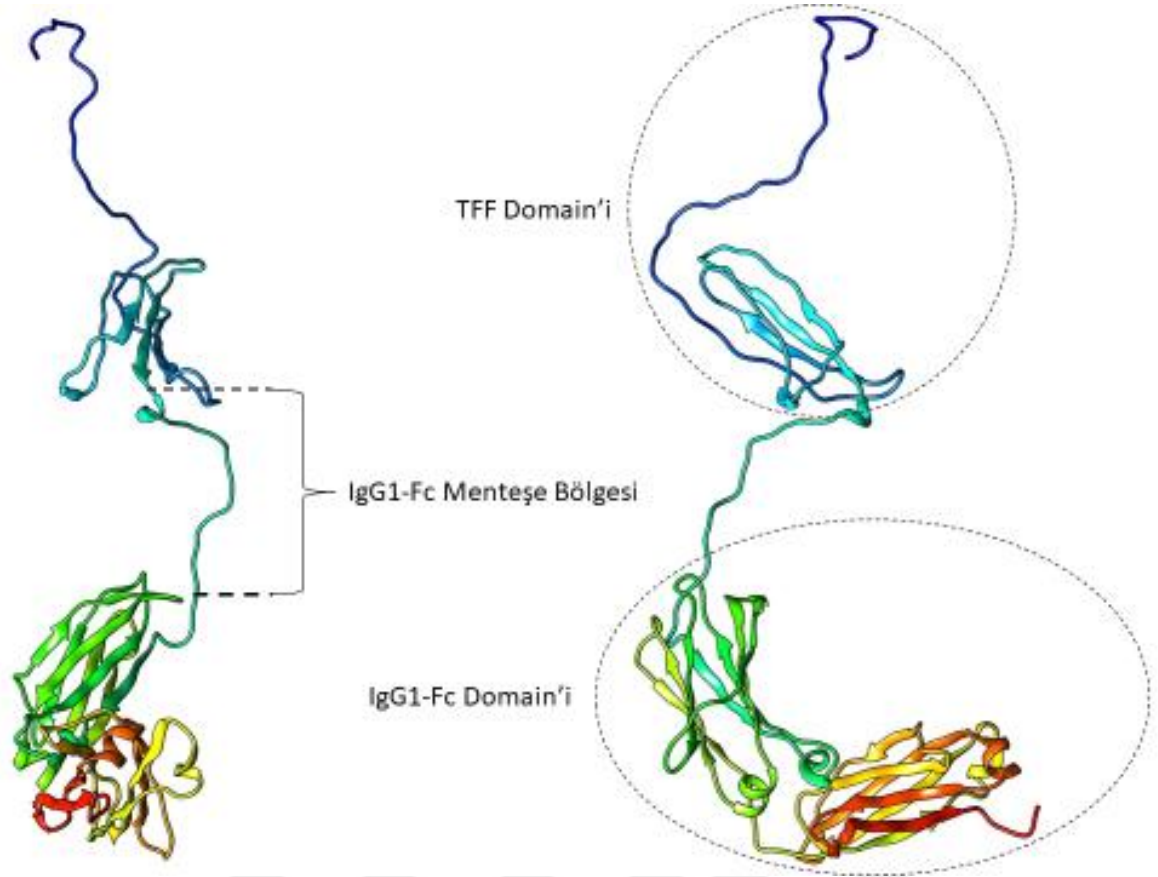
#### 4.1.1. Proteinin Monomerik Yapıda Modellenmesi

I-TASSER ile yapılan modellemede, herhangi bir kısıtlayıcı veya taslak kullanılmadan genel homoloji modellemesi yapılmıştır. Bilgisayar programı tarafından girilen zincir dahilindeki amino asitlerin mevcut yapıdaki kararlılıkları normalize B-faktör grafiği ile verilmektedir (Çizim 4.1). Buna göre, alınan negatif değerler ilgili monomerlerin genel yapıdaki kararlılıklarını temsil etmektedir (Yang ve diğ. 2016). Sonuçlara göre zincir üzerinde bütüncül TFF'nin yer aldığı 108 amino asitlik domain'in aktivite gösteren parçası olan N-terminal'inden itibaren yüksek bir yapısal kararlılığının olduğu görülmektedir. Bu durum, yapısal açıdan kritik öneme sahip söz konusu fragmanın etki göstermesi bakımından olumlu bir gösterge sunmaktadır.



Çizim 4.1. rTFF'ye İlişkin Normalize Edilmiş B-faktör Grafiği

I-TASSER tarafından yapılan modellemelerde 5 farklı sonuç alınmıştır. Bunlar içerisinde en yüksek güvenilirlik derecesine sahip olan model -1,57'lik C-skor (confidency score) ile Çizim 4.2'de gösterilmektedir. C-skoru, elde edilen modelin güvenilirliğine göre -5 ile +2 aralığı arasında bir dağılım göstermektedir. Literatürde, yapılan modellemeler sonucunda -1,5 ve üzerinde elde edilen skorların oldukça güvenilir bir model tanımladığı ifade edilmektedir (Zhang 2008, Roy ve diğ. 2010, Yang ve diğ. 2015). Buna göre çalışmamız kapsamında alınan C-skora dayanarak elde etmiş olduğumuz modelin oldukça yüksek bir güvenilirlikte olduğu görülmektedir.



#### Çizim 4.2. Monomerik rTFF Modelleme Sonuçları

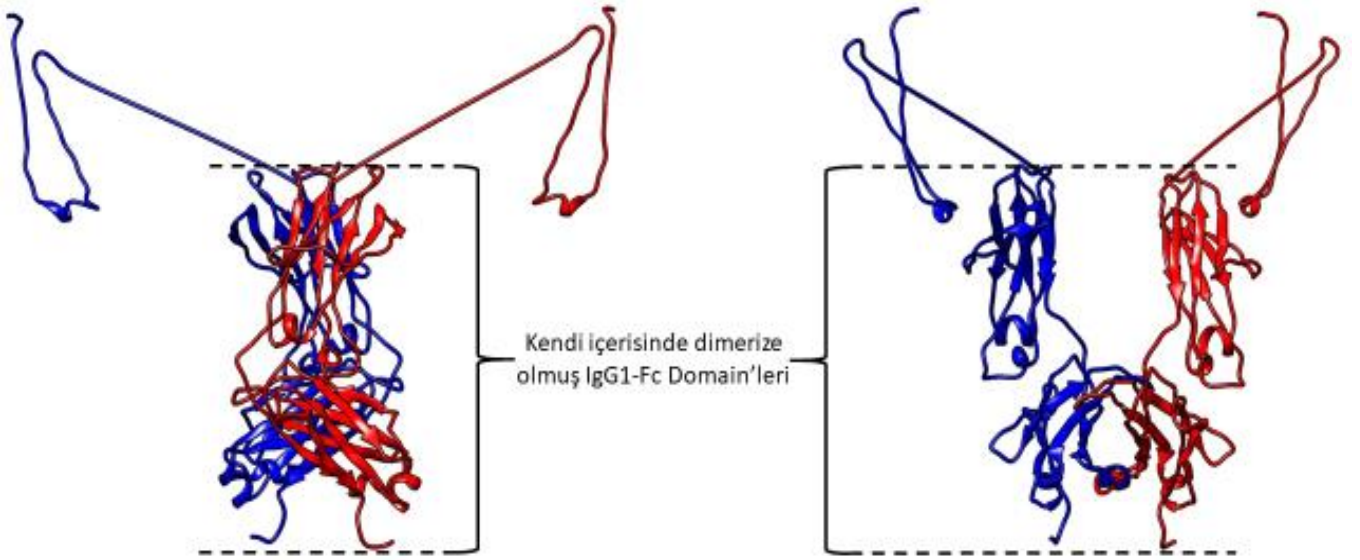
Her iki görüntü de aynı modele ait olup, farklı açılardan modelin görünürlüğünü sağlamaktadır. Yapılan görüntüleme UCSF Chimera bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır (Pettersen ve diğ. 2004).

Elde edilen modele göre, rTFF'nin aktivite gösteren bölgesi olan N-terminalinin proteinin herhangi başka bir domain'i ile istenmeyen bir 3 boyutlu etkileşime girmediği ve/veya katlanma yapmadığı görülmektedir. Bu bakımdan, söz konusu proteinin monomerik yapıda istenen özelliği sergileyebilecek niteliğini koruduğu rahatlıkla ifade edilebilir.

#### 4.1.2. Proteinin Dimerik Yapıda Modellenmesi

Bilindiği üzere, IgG1-Fc dimerik bir proteindir ve ekspresyon sonrası dimerize olmaktadır. Bu nedenle, rTFF'ye dair elde edilen monomerik modellemeye ek olarak dimerizasyon sırasında oluşabilecek olası bir istenmeyen katlanmanın öngörülebilmesi açısından dimerik modellemeye de ihtiyaç duyulmuştur. Bu bağlamda, COTH bilgisayar programı ile yapılan dimerik modellemeye ilişkin sonuç Çizim 4.3'de görülmektedir. Bu program ile yapılan modellemelere ilişkin güvenilirlik puanlaması normalize edilmiş Z-skoru ile

belirlenmektedir. Z-skoru aynı zamanda elde edilen modelin istatistiksel olarak ne kadar güvenilir olduğunun da bir göstergesi olarak kabul edilir. Buna göre, modele ait normalize edilmiş Z-skorunun 2,5'un üzerinde olması, modelin güvenilirliğinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Bu sayıdaki artışa paralel şekilde elde edilen modelin güvenilirliğinin de arttığı anlamı çıkarılabilmektedir (Mukherjee ve Zhang 2010). Bu bağlamda, program tarafından önerilen 10 adet model arasında birinci olarak sıralanan mevcut modelin normalize edilmiş Z-skoru değeri 4,224 olarak belirtilmiştir. Bu da elde edilen modelin güvenilirliğinin oldukça yüksek olduğu anlamına gelmektedir.



**Çizim 4.3.** Dimerik rTFF Modelleme Sonuçları

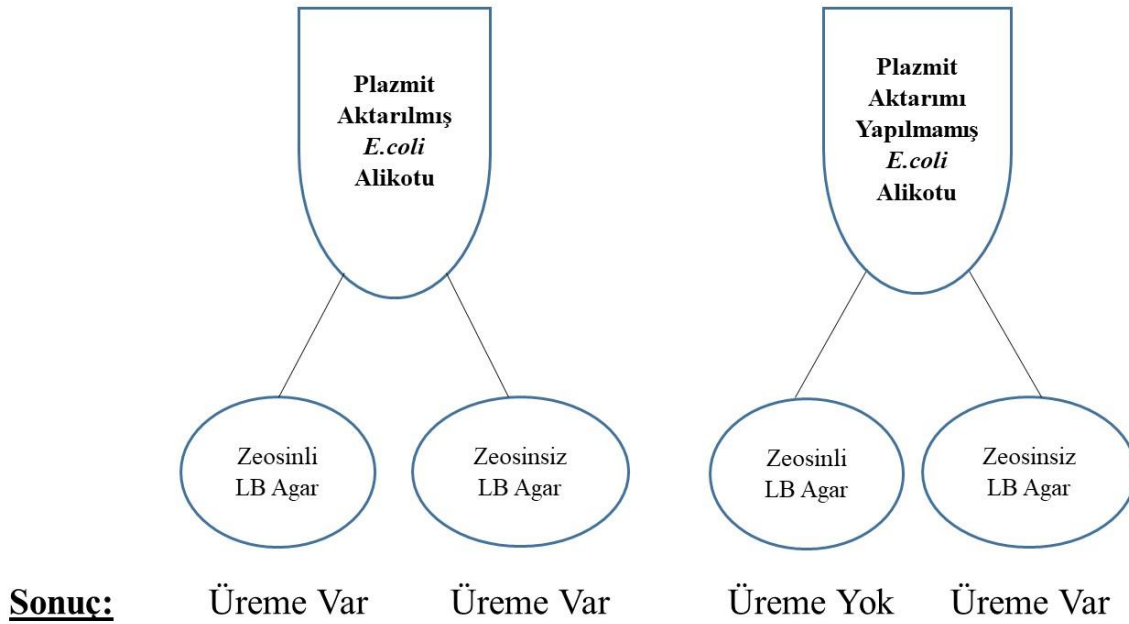
Yapılan görüntüleme UCSF Chimera bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır (Pettersen ve diğ. 2004).

Dimerik rTFF modellemesinden alınan nihai sonuca göre, tasarımı yapılan proteinin ekspresyonu sonrasında elde edilecek olan yapının dimerize olması halinde de aktivite açısından kritik öneme sahip olan N-terminalinin herhangi bir 3 boyutlu katlanmaya maruz kalmadığı görülmektedir. Bu kapsamda yapılan modelleme sonucunda yalnızca IgG1-Fc domain'lerinin beklendiği şekilde dimerize olduğu, buna karşın TFF yapısında herhangi bir dimerizasyonun gerçekleşmediği ve proteinin N-terminalinin serbest kaldığı görülmüştür.

## 4.2. Plazmidin Amplifikasyonu ve Saflaştırılması

### 4.2.1. *E. coli* Hücrelerinin Elektroporasyon ile Transformasyonu

Yapılan ön denemelerde 100 ng plazmitin *E. coli* DH10B hücrelerine elektroporasyon ile aktarımı denenmiş ancak olumlu sonuç alınamamıştır. Bu kapsamda yapılan literatür araştırması sonucunda problemin, aktarımı yapılmak istenen plazmidin boyutu ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Chan ve diğ. 2002). Aktarımı yapılmak istenen plazmidimizin boyutunun 4,5 kbp olması nedeni ile yaptığımız ilk çalışmalarda kullandığımız 100 ng'ın 2,5 katı kadar (250 ng) plazmidin elektroporasyonda kullanımına karar verilmiştir. Bu şekilde yapılan aktarım sonucunda başarılı olunmuştur. Alınan sonuçlara göre: hücrelerin sağlıklı olduğu, kullanılan Zeosin'in etkili olduğu, hücrelerin kompetansilerinin yeterli olduğu ve bu sayede aktarılan plazmidin direnç kazandırdığı sonuçlarına varılmıştır (Çizim 4.4).



**Çizim 4.4.** Transformasyon İşlemi Sonrası Petrilerde Alınan Sonuçlar

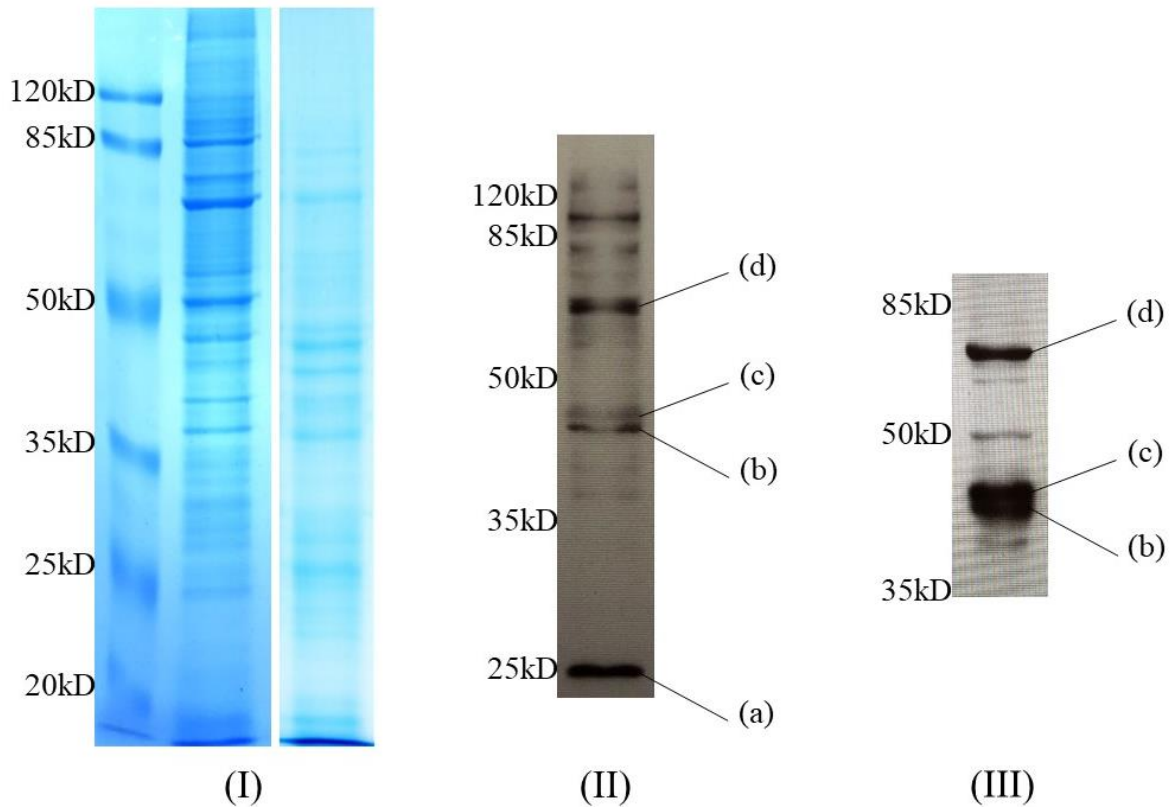
#### 4.2.2. Hücrelerin Çoğaltımı ve Plazmidin Saflaştırılması

2 adet 200 ml'lik Zeosin'li sıvı LB besi ortamı kullanılarak yapılan *E. coli* kültürasyonu sonrasında gerçekleştirilen saflaştırma işlemi sonucunda, iki erlenden hazırlanan iki adet saflaştırma ürünü birleştirilerek yaklaşık 3057 ng/μl konsantrasyonda 500 μl kadar (toplamda 1,5 mg) plazmit elde edilmiştir.

#### 4.3. Rekombinant TFF'nin HEK293F Hücrelerinde Üretimi

##### 4.3.1. Kesikli Modda Kültür

Kesikli modda yapılan kültür işleminin sonunda, kültür üst sıvısından alınan örnekler ile gerçekleştirilen SDS-PAGE ve western blotlama işlemlerinin sonucuna göre üretilmesi hedeflenen rTFF'nin bütüncül halde kültür içerisinde salındığı tespit edilmiştir.

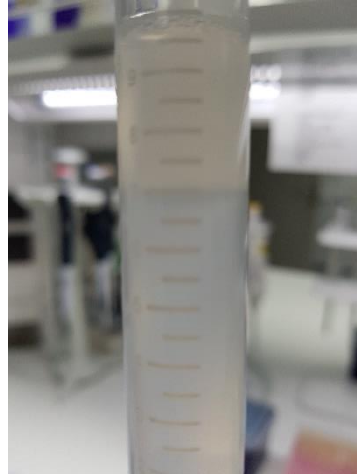


**Çizim 4.5.** Kültür Üst Sıvısında rTFF Analizi

SDS-PAGE analizi (I), Anti-His western blotlama sonucu (II), Anti-Fc western blotlama sonucu (III). I: Soldan-sağa sırası ile: markır/pozitif kültür üst sıvısı/negatif kültür üst sıvısı. Çizim üzerinde (a), (b), (c), (d) olarak işaretlenmiş olan bantlar rTFF'nin kısmi veya bütüncül şekilde eksprese olan formlarını işaret etmektedir.

Ekspresyon işleminin etkinliğine dair yapılan çalışmalarda kültür üst sıvısı herhangi bir işlemde geçirilmeden kullanılarak SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) analizi gerçekleştirilmiştir. Yürütülen bir jele Coomassie boyama işlemi yapılmıştır. Aynı örnekler kullanılarak yürütülen diğer iki adet jele ise western blotlama çalışması yapılmıştır. Western blotlama işlemlerinde 6xHisTag Antikoru (Invitrogen, ABD) ile tavşan anti-insan IgG-HRP (SantaCruz, ABD) antikoru kullanılmıştır (Çizim 4.5). Bu çalışmalarda kullanılan 6xHisTag Antikoru'nun, rTFF proteininin 25-38. amino asitleri arasında bulunan "HTHTHTHTHTHTH" motifine bağlanması beklenmiş ve bağlandığı görülmüştür. Tavşan anti-insan IgG-HRP antikorusunun ise tasarımda bütüncül yapıdaki TFF proteininin C-terminaline entegre edilmiş olan insan IgG1-Fc füzyon partnerine bağlanması beklenmiştir.

Saflaştırma işlemine geçilmeden önce gözle yapılan incelemelerde, elde edilen üst sıvı içerisinde oldukça yoğun agregatlar gözlemlenmiştir (Çizim 4.6). Ayrıca, çalışılan numunenin +4 °C'de bekletilmesi ile söz konusu agregatların oranının iyice arttığı ve zamanla artan bir hızla sedimente olmaya başladığı gözlemlenmiştir.



**Çizim 4.6.** Kültür Üst Sıvısında Görülen Agregatlar ve Neden Olduğu Türbit Yapı



### rTFF'nin Çözünürlüğünün Artırılmaya Çalışılması:

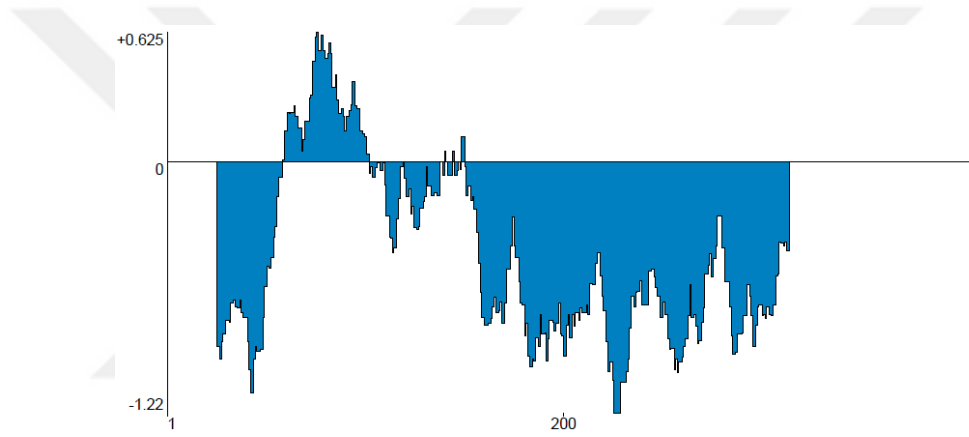
Eksprese edilen rTFF'nin mevcut kültür üst sıvısı içerisindeki çözünürlüğünün oldukça düşük olması nedeni ile çözünürlüğünün artırılabilmesi amacı ile farklı bileşenler kullanılarak çözünürlüğünün artırılmasına çalışılmıştır. Bu amaçla aşağıda belirtilen katkıları tek tek veya kombinasyonlar halinde kültür üst sıvısına ilave edilmiştir. Bu noktada amaçlanan, söz konusu ilaveler ile proteinin bütüncül yapısında herhangi bir bozunmaya sebep olmadan, müteakiben gerçekleştirilmesi planlanan tampon değişimi işlemi için proteini mümkün olabildiğince çözünür forma getirebilmektir. Ancak yapılan ilavelerden ve pH ayarlamalarından hiçbirinin yeterli ve kabul edilebilir bir sonuç vermediği gözlemlenmiştir.

- 2 mM DTT (ditiyotreitol) (Hutterer ve diğ. 2013, Crivianu-Gaita ve diğ. 2015, Wang ve diğ. 2015).
- %0,1 SDS (sodyum dodesil sülfat) (Gupta ve diğ. 2016).
- 1-2 M Üre (Shukla ve diğ. 2005, Vazquez-Rey 2011).
- %0,8 Tween 20 (Polizorbat 20)
- %0,8 Tween 80 (Polizorbat 80) (Singh ve diğ. 2017).
- %1 Sodyum lauroyl sarkozinat
- %5 Sodyum lauroyl sarkozinat
- %10 Sodyum lauroyl sarkozinat
- %1 Sodyum lauroyl sarkozinat + %2 Triton X-100 + 20 mM CHAPS (3-((3-kolamidopropil) dimetilamonyo)-1-propansülfonat)
- %1 Sodyum lauroyl sarkozinat + %3 Triton X-100 + 30 mM CHAPS
- %2 Sodyum lauroyl sarkozinat + %4 Triton X-100 + 40 mM CHAPS (Tao ve diğ. 2010).
- pH artırma
- pH düşürme (Shire 2015).

### rTFF'ye İlişkin In-silico Hidropatisite Analizi:

Vector-NTI bilgisayar programı kullanılarak eksprese edilen rTFF proteinine dair *in silico* ortamda yapılan hidropatisite analizinde, söz konusu proteinin hidrofobitesinin oldukça yüksek olduğu sonucu çıkmıştır (Çizim 4.7). Bu sonuç, elde edilen proteinin hidrofobik etkileşimler nedeni ile solüsyon içerisinde agregatlar oluşturması ve zamana bağlı şekilde

oluşan agregatların ise sedimente olmaları olgusunu açıklamaktadır. Bu nedenle, söz konusu proteinin aktivite kaybı yaşanmaksızın *in vitro* etkinlik testlerinde kullanılabilmesi amacı ile saflaştırma yapılmadan eş değer nitelikteki negatif kontrolü ile birlikte kullanımının makul olacağı sonucuna varılmıştır. Ekspresyon sırasında kültür ortamına salgılanan rTFF proteininin mümkün olduğunca çözünür formda tutulabilmesi amacı ile elde edilen ürünün kültür içerisindeki konsantrasyonunun sürekli olarak düşük tutulması planlanmıştır. Bu nedenle, kesikli modda yapılan ilk ekspresyon çalışması sonrasında gerçekleştirilen bütün kültürlerde, kültür ortamının bir bölümünün sık aralıklar ile toplanması ve yenilenmesi esasına dayanan tekrarlı yarı-kesikli modda gerçekleştirilmiştir.

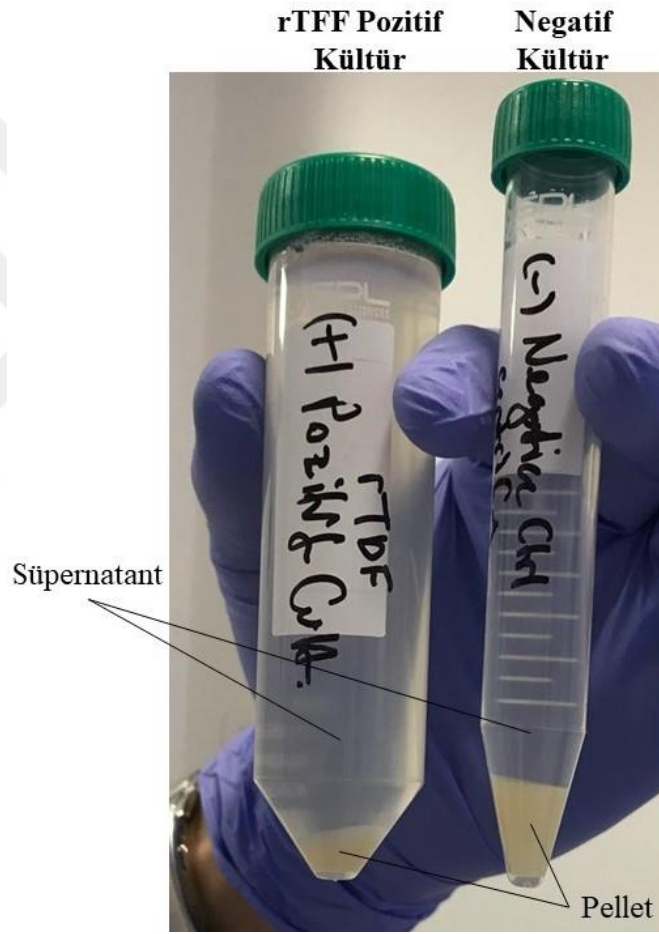


**Çizim 4.7.** Eksprese Edilen rTFF Proteinine İlişkin Teorik Hidropatisite İndeksi

#### 4.3.2. Tekrarlı Yarı-kesikli Modda Kültivasyon

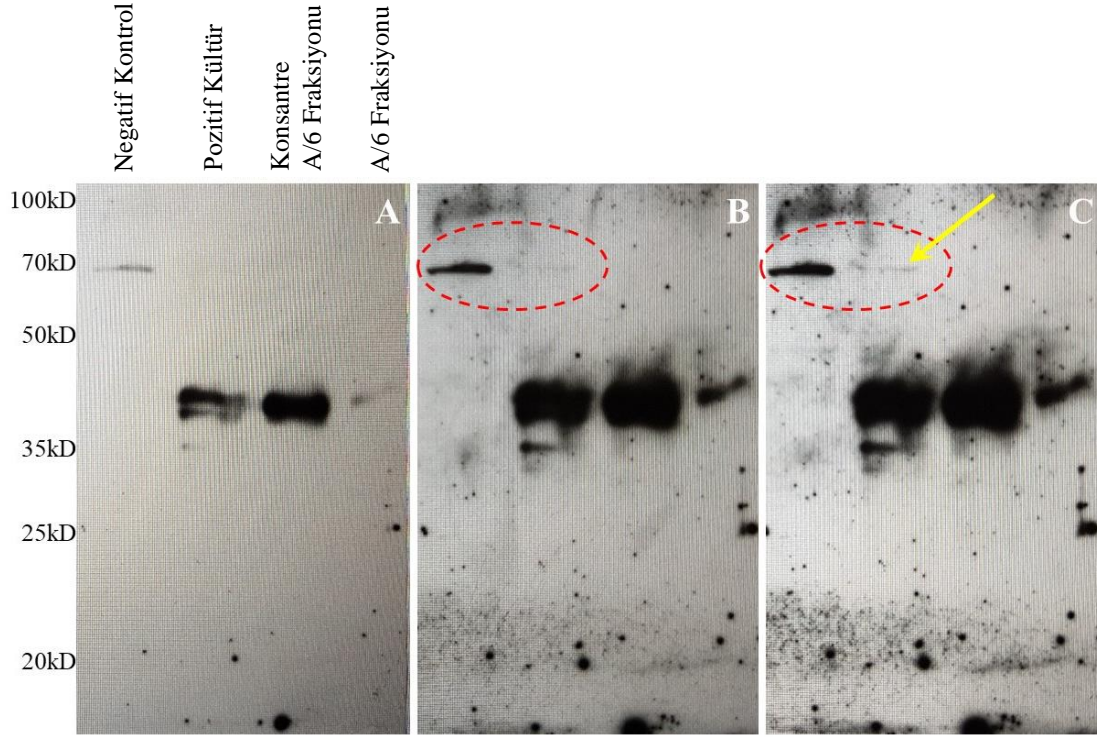
Kesikli modda yapılan kültürasyonlar ile hücreden ayrıştırılan üst sıvıda zamanla çok fazla agregat birikmesi nedeni ile proteinin beklenen aktivitesini gösterememesinden endişe edilmiştir. Bu nedenle daha dilüe bir ortam sağlanacak şekilde proteinin tekrar üretilmesine karar verilmiştir. Bu kapsamda, ürün-inhibisyonu adı verilen fenomenin gözlemlendiği fermantasyonlarda sıklıkla tercih edilen bir kültürasyon rejimi olan tekrarlı yarı-kesikli modda fermantasyon gerçekleştirilmiştir. Özellikle yüksek titrelerdeki biyokimyasal üretim proseslerinde, üretimi yapan hücrelerde toksik etkiye sebep olan biyokimyasal ürünlerin aralıksız şekilde üretilmesi amacı ile sıklıkla bu modda fermantasyon rejimi tercih edilmektedir. Çalışmamız kapsamında ise protein agregasyonunun minimize edilebilmesi amacı söz konusu fermantasyon rejimi takip edilmiş ve bu kapsamda istenilen başarılı sonuç

alınabilmiştir. Çizim 4.8’de görüldüğü üzere, pozitif kültürdeki türbidite düzeyi oldukça düşük seviyeye çekilebilmiştir. Ayrıca söz konusu kültürlerden alınan örneklerde, pozitif kültürde görülen hücre pelletinin negatif kültüre kıyasla daha az olması, proteinin eksprese edildiğinin bir işaretçisidir (pozitif kültür: ~20 mg/ml; negatif kültür: ~100 mg/ml - yaş hücre ağırlığı/kültür hacmi). Zira, protein ekspresyonu yapan kültürlerdeki hücre konsantrasyonları oldukça düşük hızlarda artış göstermektedir.



**Çizim 4.8.** Tekrarlı Yarı-kesikli Kültürden Toplanan Üst Sıvı ve Kültüre Geri Beslenecek Pelletlerden Örnekler  
Pozitif kültür (solda), negatif kültür (sağda).

Çalışma sonucunda elde edilen üst sıvılara tavşan anti-insan IgG-HRP (SantaCruz, ABD) uygulanarak yapılan western blotlama analizi sonucuna göre sentezin gerçekleştiği ve söz konusu proteinin bütüncül formunun kültür ortamına salındığı görülmektedir (Çizim 4.9).



**Çizim 4.9.** Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma Sonucu Western Blotlama Analizi

A: 1 dk'lık pozlama, B:3 dk'lık pozlama ve C:5 dk'lık pozlama sürelerine aittir. Sarı ok, negatif kontrolde görülen bandın uzun süreli pozlamalarda pozitif örneklerdeki görünürlüğüne işaret etmektedir.

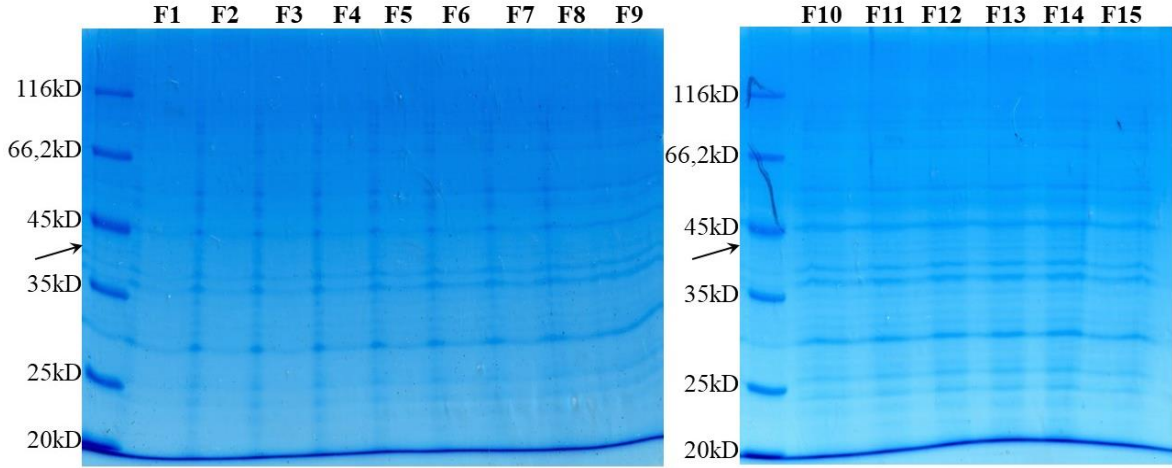
#### 4.4.Rekombinant TFF'nin Saflaştırılması

##### 4.4.1. Protein A Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma

rTFF'nin tekrarlı yarı kesikli olarak üretimi sonucunda elde edilen üst sıvılar kullanılarak Protein A kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemi denenmiştir. Bu kapsamda kolona besleme öncesinde gerçekleştirilen 0,45  $\mu\text{m}$ 'lik filtrasyon işlemi sırasında düşük oranda da olsa bir kısım agregatın varlığı ve filtrasyon ile elimine edildiği gözlenmiştir. Bu durumun, subvisible (görülebilir altı) düzeyde agregatların varlığına işaret ettiği düşünülebilir.

Saflaştırma işlemi sırasında toplanan 15 adet fraksiyon kullanılarak gerçekleştirilen SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre, indirme tamponu ile izokratik profilde yapılan indirme işlemi sırasında kolondan oldukça düşük miktarda da olsa bir miktar protein geldiği görülmektedir (Çizim 4.10). Ancak yapılacak olan ileri analiz ve testler değerlendirildiğinde söz konusu miktarın ihtiyacı karşılayabilecek düzeyin oldukça altında kaldığı açıktır. Bunun yanı sıra söz konusu fraksiyonlar kullanılarak bir hafta sonra yapılan SDS-PAGE analizinde

zayıf olarak görülen söz konusu bantların da kaybolduğu gözlenmiştir. Bu da proteinin asidik bir tampon içerisinde stabilitesini uzun süre koruyamadığını ve her ne kadar saflaştırma sonrasında nötralizasyon yapılmışsa da asidik bir tampon ile saflaştırılamayacağını göstermektedir.



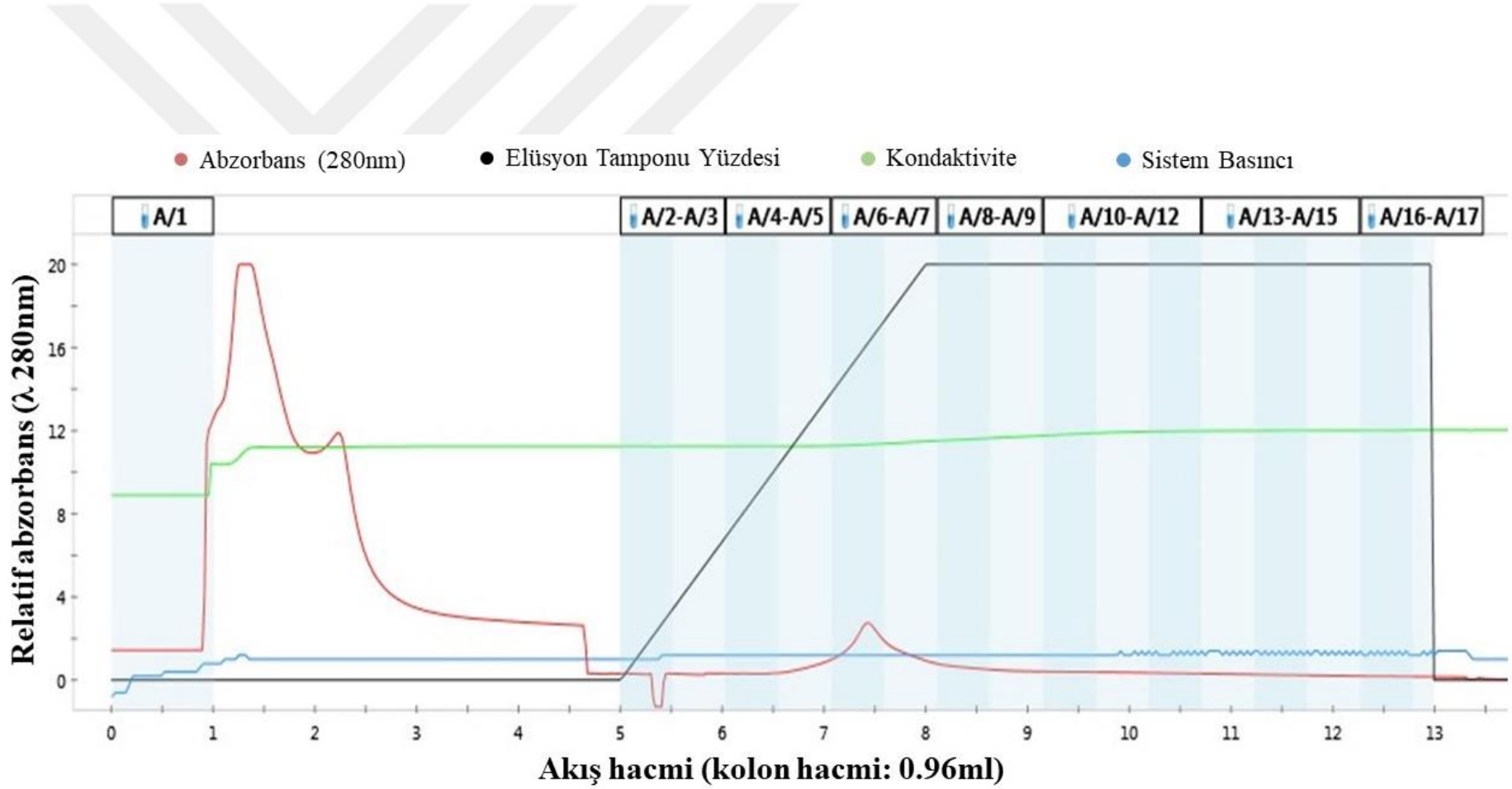
**Çizim 4.10.** Protein A Kolon Kromatografisi Sonuçları

Saflaştırma işlemi sırasında toplanan 15 adet elüsyon fraksiyonu ile gerçekleştirilen analiz sonucunu göstermektedir. rTFF'nin olası farklı formlarının gelmesinin beklendiği minimum ağırlık ok ile gösterilmiştir.

#### 4.4.2. Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma

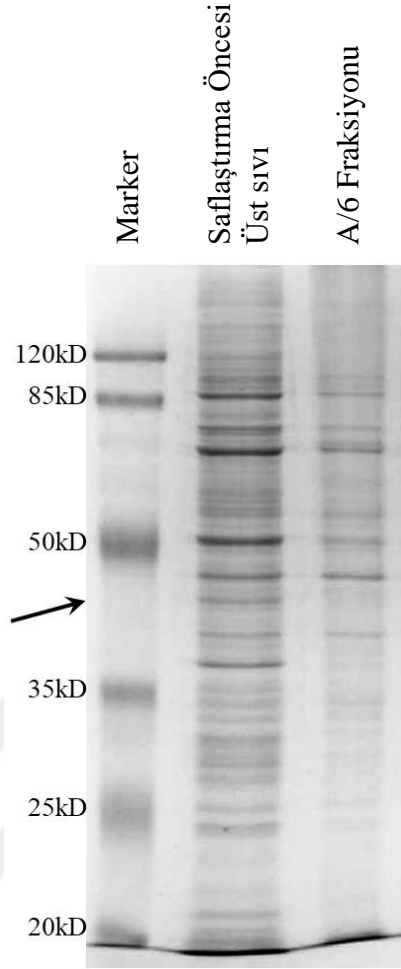
Tampon değiştirme işlemi sonunda elde edilen denatüre haldeki protein süspansiyonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonunda rTFF'nin majör olarak tek bir fraksiyonda (A/6) elde edilmesi sağlanmıştır (Çizim 4.11). Buna ek olarak rTFF'nin geldiği fraksiyonda başka proteinlerin de geldiği görülmektedir (Çizim 4.12).

Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile yapılan saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen A/6 fraksiyonu ile birlikte A/6 fraksiyonunun 2D-clean up ile konsantre edilmiş formu, saflaştırma öncesi pozitif kültür üst sıvısı ve negatif kontrol üst sıvısı kullanılarak Western blotlama analizi yapılmıştır. Yapılan analizde tavşan anti-insan IgG-HRP (SantaCruz, ABD) antikoru kullanılarak insan IgG1-Fc domainine sahip olan rTFF'nin görüntülenmesine çalışılmıştır. Sonuç olarak, yapılan saflaştırmaya dair kromatogramın da gösterdiği üzere işlem sonucunda A/6 fraksiyonunda rTFF'nin elde edilebildiği görülmektedir (Çizim 4.9).



**Çizim 4.11.** rTFF'nin Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılmasına İlişkin Kromatogram

A/1 - A/17 arasındaki bölmeler, toplanan fraksiyonları göstermektedir.



**Çizim 4.12.** Ni-NTA Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma Sonucu SDS-PAGE Analizi rTFF'nin olası farklı formlarının gelmesinin beklendiği minimum ağırlık ok ile belirtilmiştir.

Yapılan saflaştırma işlemi sonuçları değerlendirildiğinde, HEK293F kùltürü üst sıvısında antikorum bağlanabildiği yapıda epitopa sahip bir proteinin bulunması nedeni ile negatif kontrol kùltüründe 70 kD ağırlığında bir bant görùlmüřtür. Aynı bandın pozitif kùltürde de görùlüyor olması, bu bandın HEK293F kùltürüne spesifik bir bant olduğunun bir kanıtı olarak değerlendirilmektedir. Sözü konusu bu bandın, kesikli kùltür sonrasında yapılan western blotlama işlemi sonucunda Çizim 4.5/III'de görülen (d) bandı ile aynı bant olduğu sonucu da çıkmaktadır.



Çizim 4.9A'da görüldüğü üzere 35 kDa ve 50 kDa'lık ağırlıklar arasında aralarında yaklaşık 0,5 kDa fark olan iki adet bant mevcuttur. Bu iki bant, Çizim 4.9B ve C'de yapılan fazla pozlamalar nedeni ile teke düşmektedir. Her iki bant da yine Çizim 4.5/III'de görülen (b) ve (c) bantları ile örtüşmektedir. Bununla birlikte, her iki bant da her ne kadar çok fazla spesifik olmayan bant bulunsa da Çizim 4.5/II'deki anti-His antikoru ile yapılan western sonuçlarında da yerini bulmaktadır (Çizim 4.5/IIb ve 4.5/IIc). Yapılan saflaştırma işlemi sonrasında söz konusu iki bandın, teke düştüğü görülmektedir (Çizim 4.9).

Çizim 4.5/III'de 50 kDa'lık ağırlıkta görülen bandın Çizim 4.5/II'de bir karşılığının olmaması ve buna benzer bir bandın Çizim 4.9'de de karşılığının olmaması, söz konusu bandın Çizim 4.5/III'd'nin bir degradasyon ürünü olabileceği sonucunu akla getirmektedir.

Çizim 4.5/III'd'deki bant ile Çizim 4.9C'de ok ile gösterilen bandın HEK293F kültüründen gelmekte olduğu açık ve nettir. Ancak hemen hemen aynı noktada Çizim 4.5/II'd'de bir bant görülüyor olması ve Çizim 4.5/III'd'nin alt ve üstünde de buna benzer bantların görülüyor olması bu noktada rTFF'nin tam olarak post-translasyonel modifikasyonunu tamamlamış bir formunun var olduğunun işareti olarak gösterilebilir. Ancak böyle bir yapının var olması halinde bile, oldukça minör düzeyde kaldığı yapılan tekrarlı yarı kesikli kültür sonuçları ile ortaya çıkmaktadır (Çizim 4.9).

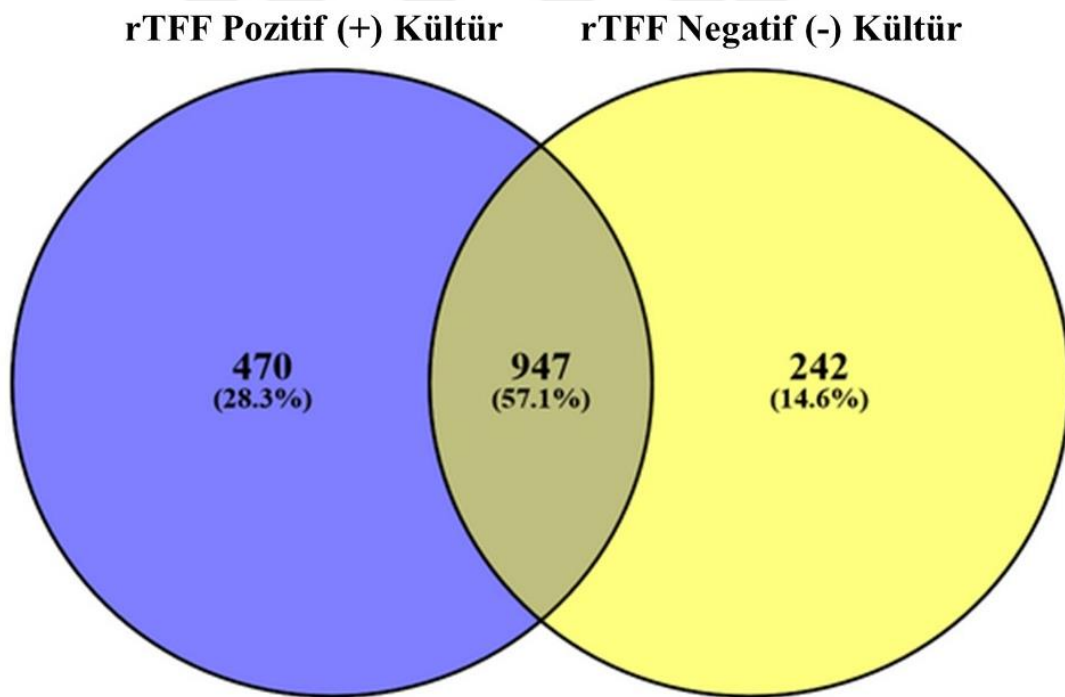
Geçici transfeksiyon ile gerçekleştirilen ekspresyon çalışmalarında hücre içerisindeki gen dozajının yüksek olmasından ötürü ekspresyon sisteminin aşırı yüklenmesi gibi bir sorunla karşı karşıya kalınabilmektedir. Bu durumun bir sonucu olarak ekspresyonu yapılan proteinin hızlı bir şekilde kültür ortamına salımı söz konusu olmaktadır. Bu durum değerlendirildiğinde, 35-50 kDa arasında görüntülenen bantların, ekspresyonunu çalıştığımız rTFF proteininin kısmi olarak post-translasyonel modifikasyona uğramış formlarına dair bantlar olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Başka bir deyişle, TFF'nin post-translasyonel modifikasyonları olmayan (PTM'siz) hali 17 kDa'dır. Post-translasyonel modifikasyonları olan (PTM'li) hali ise 45 kDa'dır. IgG-Fc'nin PTM'siz hali: 26 kDa, PTM'li hali: 32 kDa'dır. Buna göre TFF'nin PTM'siz hali + IgG-Fc'nin PTM'siz hali: 43 kDa'dır. TFF'nin PTM'siz hali + IgG-Fc'nin PTM'li hali: 49 kDa'dır. Bu durumda, hipotetik olarak Çizim 4.5/IIa, Çizim 4.5/IIIb ve Çizim 4.5/IIIc bantları sırası ile bahsi geçen formlara atfedilebilir.



Bu sonuçlara göre, TFF'nin C-terminalinde bulunan İnsan IgG1-Fc füzyon partnerine dair bantların (Çizim 4.5/IIIb ve c, Çizim 4.9) söz konusu domainin tek başına ağırlığına tekabül eden 25-32 kDa'lık aralığın çok daha üzerinde olması, ekstraselüler ortama salınım sırasına göre de rTFF'nin bütüncül şekilde ekstraselüler ortamdaki varlığını kanıtlamaktadır.

#### 4.4.3. rTFF'nin Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometrisi ile Karakterizasyonu

Yapılan analizde objektif bir kıyaslamının yapılabilmesi ve kültürden gelen safsızlıkların tam olarak saptanabilmesi amacı ile pozitif ve negatif kültür üst sınıfları kullanılmıştır. Yapılan LC-MS/MS analizi sonucunda karakterize edilen proteinlerin kültürlere göre dağılımına ilişkin Venn Diagramı Çizim 4.13'te verilmiştir.



Çizim 4.13. Pozitif ve Negatif Ekspresyon Kültürlerine İlişkin Venn Diagramı

rTFF pozitif kültüründe, negatif kültürden farklı olduğu tespit edilen proteinler içerisinde 2 adet proteine spesifik peptit bulgusu, %19,44'lük kapsama ve 19,38'lik Sequest skoru ile Tümör Farklılaşma Faktörü (Uniprot Erişim Numarası: Q6T424) bulunduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra, mevcut rekombinant proteinimizin C-terminalinde bulunan IgG1-Fc

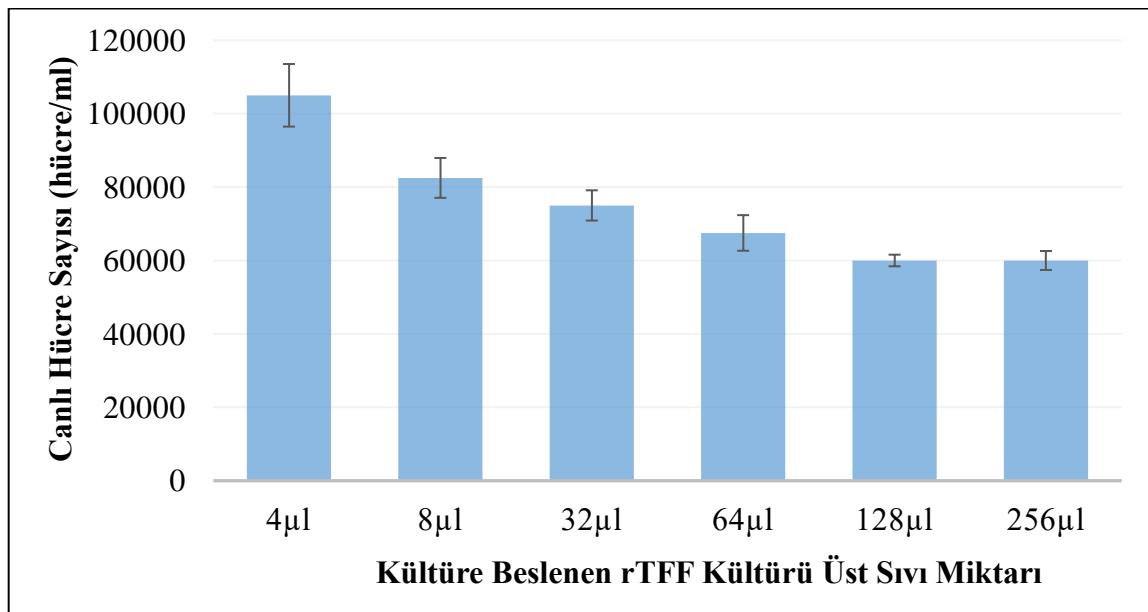
proteininde (Uniprot Erişim Numarası: A0A087WYC5) 9 adet proteine-spesifik peptit bulgusu, %33,26'lık kapsama, 43 sefer gerçekleşen peptit spektrum eşleşmesi (PSM sayısı) ve 19,38'lik Sequest skoru ile negatif kültürden farklı proteinler içerisinde var olduğu saptanmıştır.

Bu bulgular önceki çalışmalar ile birlikte ele alındığında, ekspresyonu hedeflenen proteinin tam ve bir bütün halinde kültürde var olduğunu net bir biçimde kanıtlamaktadır.

#### 4.5. rTFF'nin Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu Üzerine Etkileri

##### 4.5.1. HeLa Hücre Hattı Üzerinde Etkinlik Testi

rTFF'nin meme hücre hattı dışındaki hücre hatları üzerindeki etkinliğinin test edilebilmesi amacı ile HeLa hücre hattı üzerinde etkinlik testi yapılmıştır. Bu amaçla rTFF ile birlikte kültürü yapılan hücrelere 72 saat sonunda hücre sayımı uygulanmıştır. Yapılan test sonucuna göre kültüre beslenen rTFF miktarı arttıkça dilüsyon artışına bağlı olarak hücre sayısında azalma söz konusu olmaktadır (Çizim 4.14). Bu da rTFF'nin meme kanseri hücreleri dışında herhangi bir kültür üzerinde proliferatif bir etkisinin olmadığını göstermektedir.



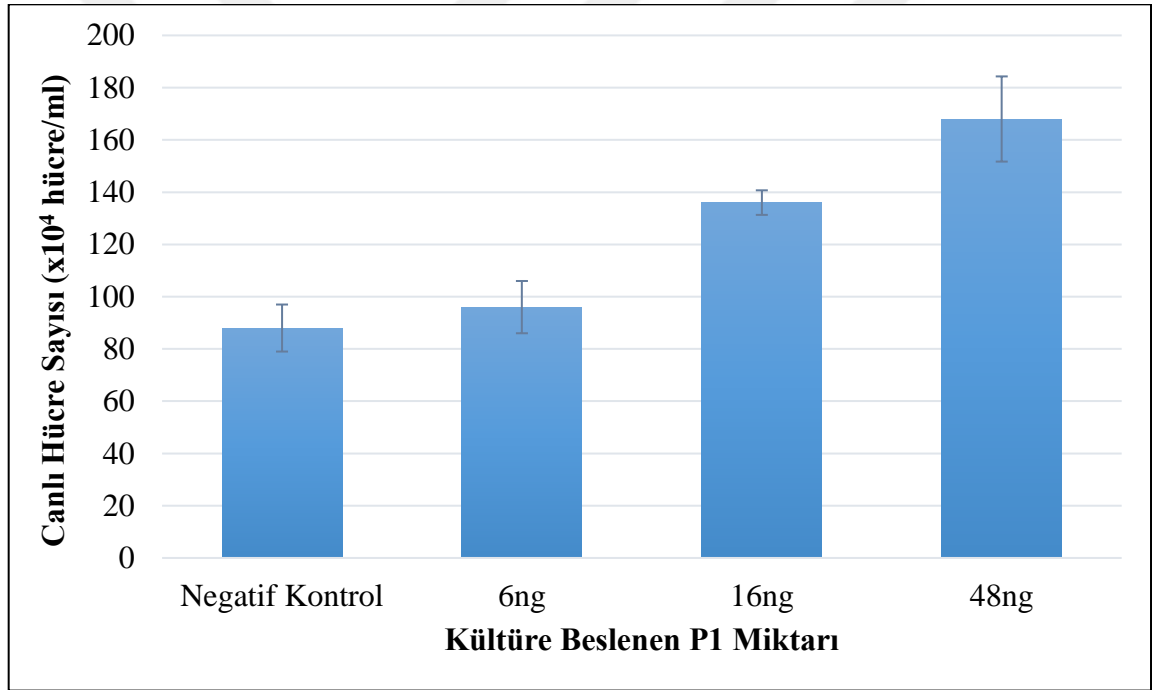
Çizim 4.14. rTFF'nin HeLa Hücre Hattı Hücreleri Üzerindeki Etkisi

#### 4.5.2. MCF-7 Hücre Hattı Üzerinde Etkinlik Testleri

rTFF'nin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkinliğinin test edilmesi amacı ile rTFF'nin yanı sıra P1 peptidi kullanılarak hücre sayımı ve proliferasyon testleri yapılmıştır.

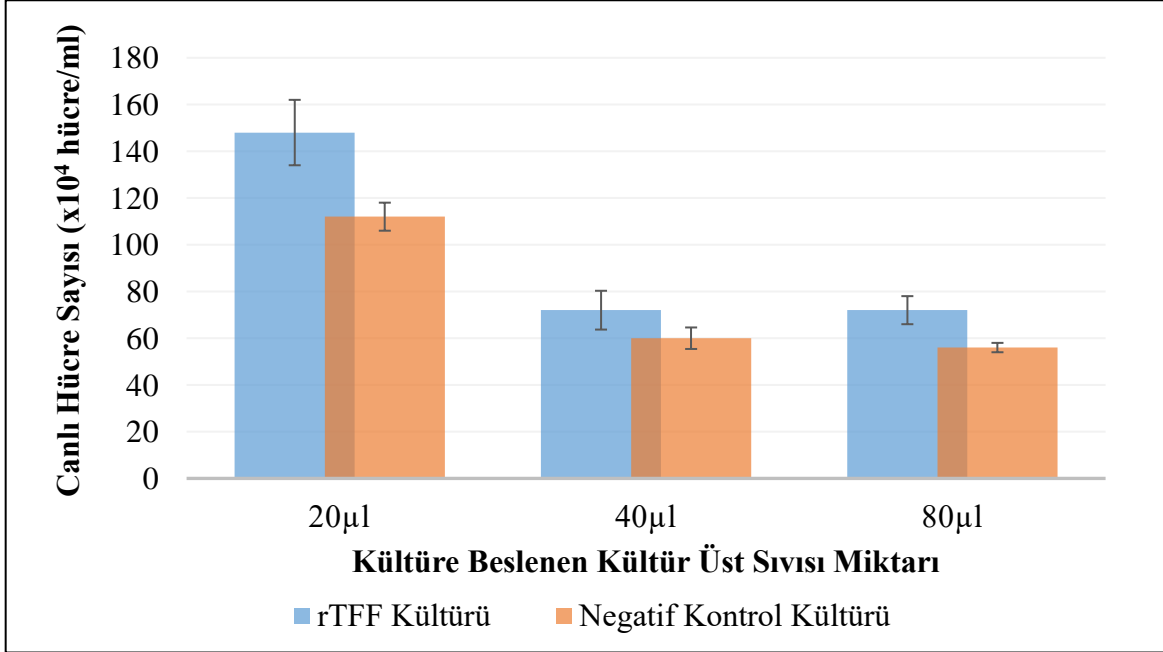
##### rTFF'nin Hücre Sayısı Üzerine Etkisi:

P1 peptidi kullanılarak yapılan hücre canlılığı testinde artan miktarlarda kullanılan P1 peptidinin MCF-7 hücre hattı üzerinde hücre canlılığını artırıcı yönde etkilediği sonucuna varılmıştır (Çizim 4.15). Bu sonuç, Platica ve diğ. (2004)'nin P1 peptidi kullanarak almış oldukları sonuçlar ile paralellik göstermektedir.



**Çizim 4.15.** P1 Peptidi'nin MCF-7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

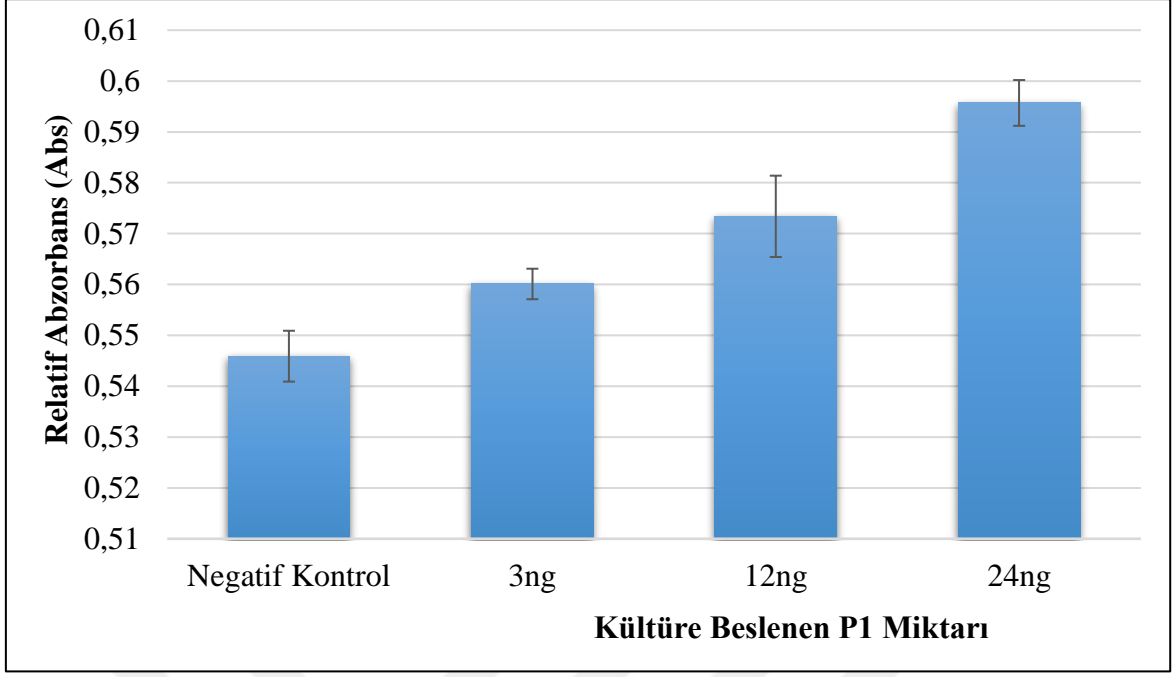
rTFF kullanılarak yapılan hücre canlılığı testinde, düşük dozlarda pozitif etki görülmesine karşın yüksek dozlarda her iki kültürde de baskılayıcı bir etki gözlenmiştir (Çizim 4.16). Ancak elde edilen nihai sonuçlara göre negatif kontrol grubuna kıyasla rTFF'li grupta bir miktar daha fazla hücre konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Bu da Platica ve diğ. (2004)'nin ilk çalışmalarında almış oldukları bulgular ile paralel şekilde TFF'nin hücre proliferasyonunu kontrol grubuna kıyasla artırdığı ifadesine paralel bir sonuç teşkil etmektedir.



**Çizim 4.16.** rTFF'nin MCF-7 Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

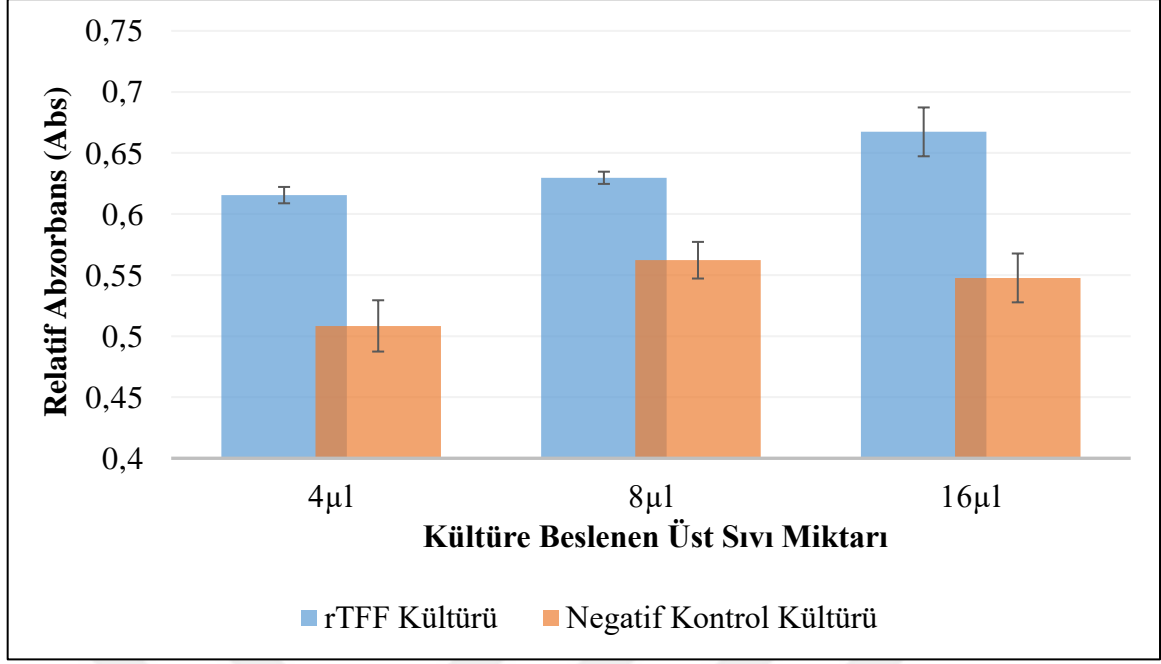
*rTFF'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi:*

rTFF'nin MCF-7 hücre proliferasyonuna etkisinin değerlendirilmesi amacı ile rTFF'nin yanı sıra P1 peptidi kullanılarak WST-1 hücre proliferasyon testleri yapılmıştır. P1 peptidi kullanılarak yapılan testlerde artan P1 konsantrasyonuna paralel şekilde hücre proliferasyonunun arttığı görülmüştür (Çizim 4.17). Bu durum, Platica ve diğ. (2004) tarafından P1 peptidi kullanılarak yapılan çalışmanın sonuçları ile örtüşmektedir.



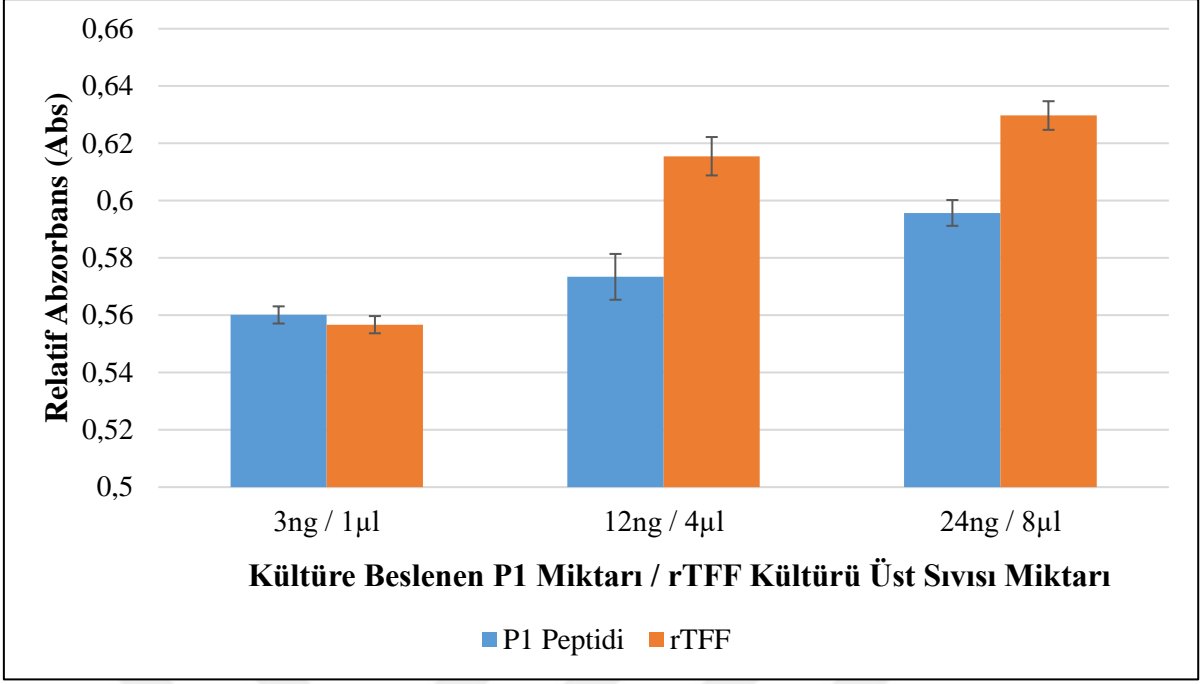
**Çizim 4.17.** P1 Peptidi'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

rTFF kullanılarak MCF-7 hücre hattı üzerinde yapılan WST-1 testlerinde, artan miktarlardaki rTFF beslemesinin Platica ve diğ. (2004)'nin TFF kullandıkları çalışmalarda almış oldukları sonuçlar ile paralel şekilde, kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunu artırdığı görülmüştür (Çizim 4.18).



**Çizim 4.18.** rTFF'nin MCF-7 Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

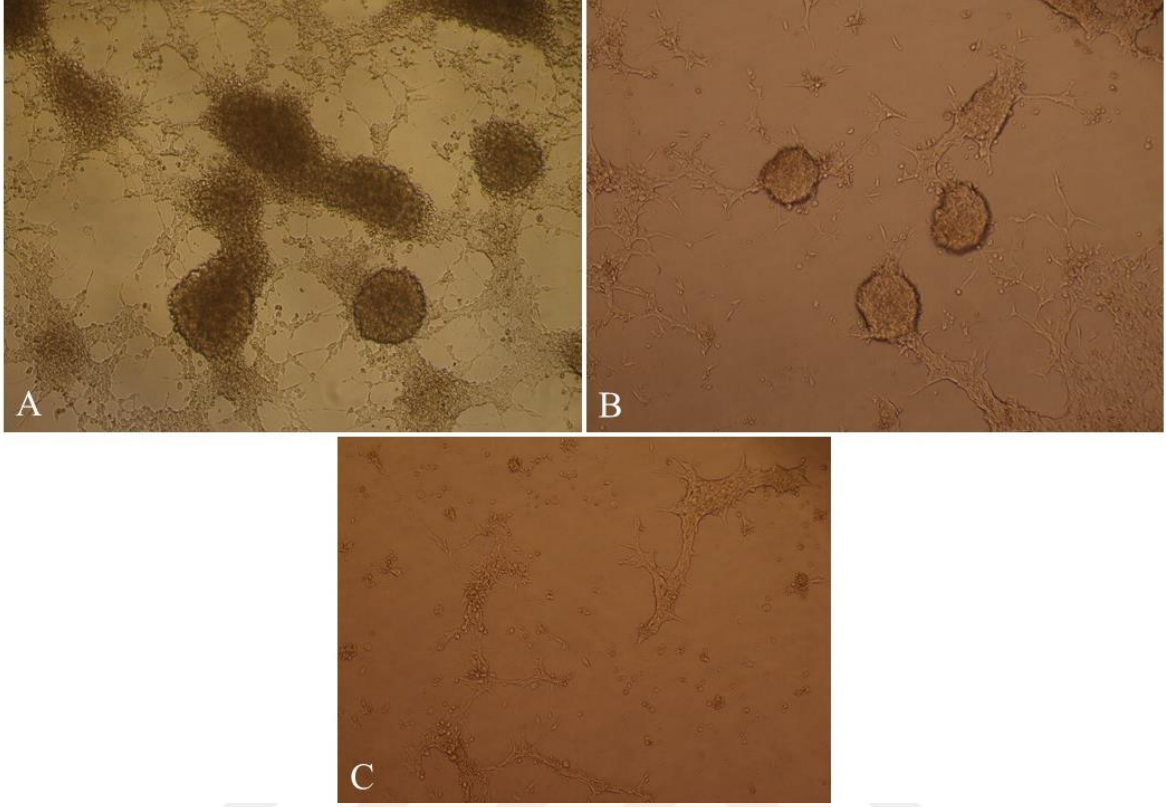
Birbirleri arasında miktarsal olarak kıyaslama yapılabilmesi metodolojik açıdan mümkün olamasa bile rTFF ve P1 peptidi arasında oransal olarak yapılacak olan bir kıyasın neticesinde rTFF'nin proliferatif niteliğinin çok daha fazla olduğu ortaya çıkmaktadır (Çizim 4.19). Özetle ifade etmek gerekirse, artan P1 ve rTFF konsantrasyonuna paralel şekilde hücre proliferasyonunun arttığı gözlenmektedir. Ancak Platica ve diğ. (2004)'de ifade edilene benzer şekilde bütüncül yapıdaki rTFF'nin eklendiği kültürde P1'e kıyasla söz konusu proliferasyon düzeyinin çok daha fazla arttığı görülmektedir. Bu sonuca, Çizim 4.19'da görülen P1'deki 4 kat ve 8 katlık artışlar ile rTFF miktarındaki 4 kat ve 8 katlık artışlar arasında yapılan kıyaslama ile net bir biçimde ulaşılmaktadır. Bu da elde edilen rTFF'nin etkinliğinin, orjinal molekül olan TFF gibi oldukça yüksek düzeyde olduğunun bir göstergesidir.



**Çizim 4.19.** P1 Peptidi ve rTFF'nin MCF-7 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkisi

*rTFF'nin Hücre Farklılaşması Üzerine Etkisi:*

Yapılan hücre kültürü çalışmaları sonrasında hücrelere sayım işlemi ve proliferasyon testi uygulanmasından hemen önce kültür ortamındaki hücrelere dair görüntüler mikroskopik olarak incelenmiş ve bu görüntüler fotoğraflanmıştır. Elde edilen görüntülere göre negatif kontrol kültürü üst sıvısı eklenmiş olan kültürde herhangi belirgin bir değişiklik gözlenmezken, rTFF pozitif kültür üst sıvısı eklenmiş ve P1 eklenmiş kültürlerdeki hücrelerde literatürde belirtilen üç boyutlu hücre kümelenmelerine rastlanmıştır (Çizim 4.20). Bunun yanı sıra, kültürde kullanılan fenol kırmızısının renk değiştirmesine bakılarak pozitif kültürdeki asidifikasyonun, negatif kültüre kıyasla çok daha fazla olduğu çıplak gözle yapılan incelemeler ile tespit edilmiştir. Negatif kültüre kıyasla rTFF eklenen kültürde mevcut olan belirgin sararma, Çizim 4.20'deki mikroskopik görüntülerde de belirgin şekilde fark edilmektedir. Bu durum kültürdeki yüksek metabolik aktiviteye işaret etmektedir ve rTFF kullanımına bağlı sonuçlardaki proliferatif etkiye dair bulgular ile paralellik göstermektedir.

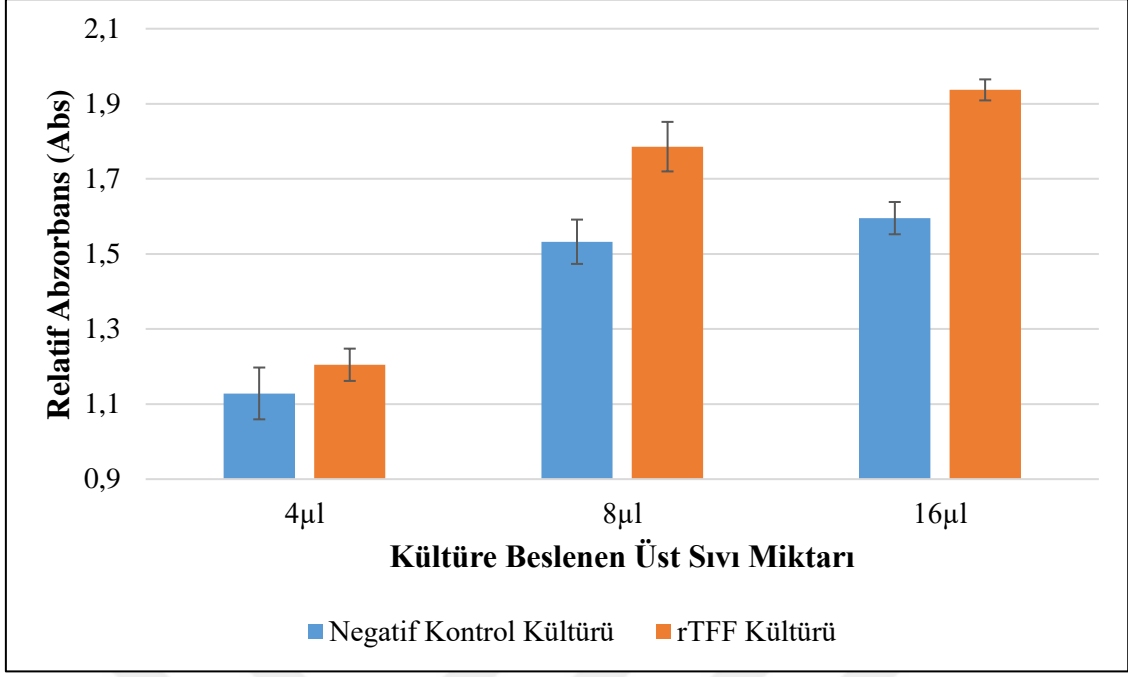


**Çizim 4.20.** rTFF'nin MCF-7 Hücre Hattı Hücrelerinin Farklılaşmasına Olan Etkisi. A: rTFF eklenen kültür, B: P1 eklenen kültür, C: negatif kontrol kültürü. 10x objektif kullanılarak çekilmiştir (Olympus, Japonya).

#### 4.5.3. Primer Hücre Hattı Üzerinde Etkinlik Testi

Geliştirilen primer hücre hattı üzerinde rTFF kullanılarak yapılan WST-1 testlerinde, artan miktarlardaki rTFF beslemesinin MCF-7 hücre hattı ile paralel şekilde kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunu artırdığı görülmüştür (Çizim 4.21).

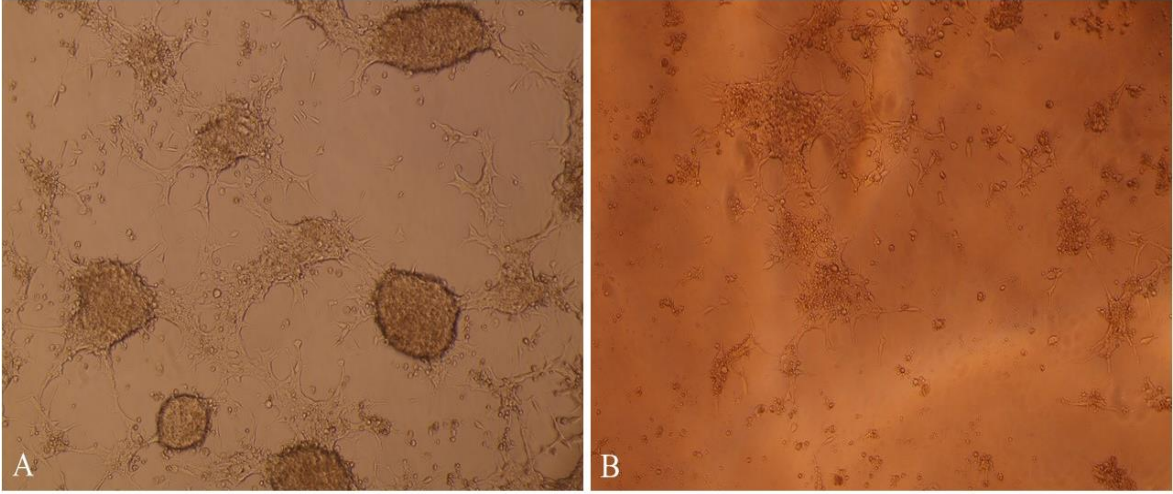




**Çizim 4.21.** rTFF'nin Primer Hücre Hattı Proliferasyonu Üzerine Etkisi

*rTFF'nin Hücre Farklaşması Üzerine Etkisi:*

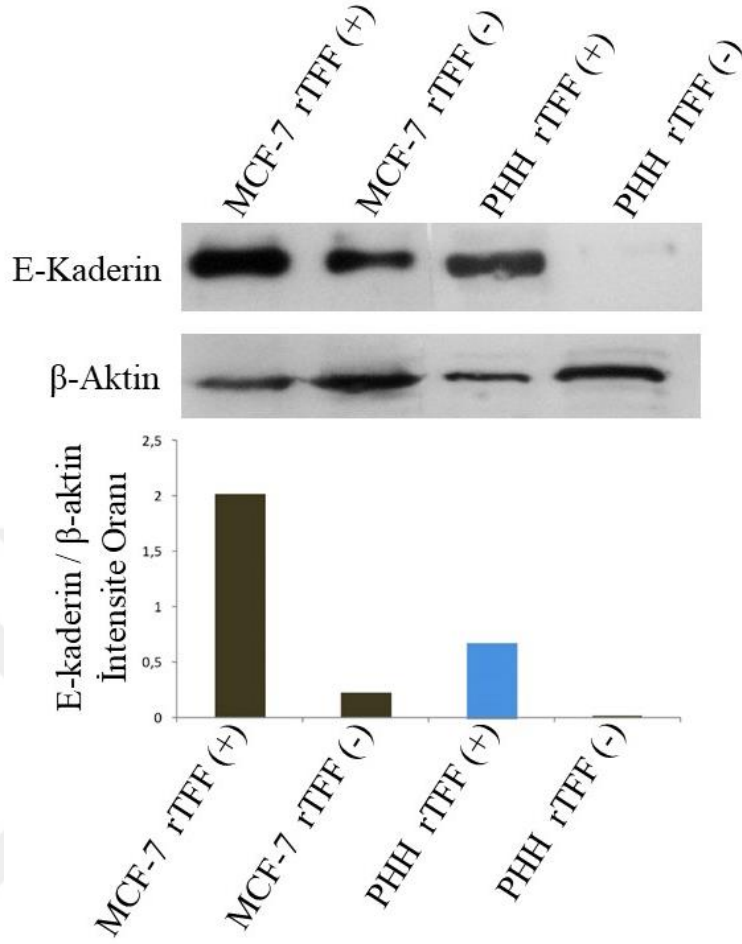
MCF-7 hücreleri üzerinde yapılan işleme benzer şekilde hücelere proliferasyon testi uygulanmasından hemen önce kültür ortamındaki hücelere dair görüntüler mikroskopik olarak incelenmiş ve bu görüntüler fotoğraflanmıştır. Elde edilen görüntülere göre negatif kontrol kültürü üst sıvısı eklenmiş olan kültürde herhangi belirgin bir değişiklik görülmezken, rTFF pozitif kültür üst sıvısı eklenmiş olan kültürde üç boyutlu hücre kümelenmelerine rastlanmıştır (Çizim 4.22). MCF-7 hücre hattı kullanılarak yapılan testlerde olduğu gibi pozitif kültürdeki asidifikasyonun, negatif kültüre kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, rTFF kullanımına bağlı sonuçlardaki proliferatif etkiye dair bulgular ile paralellik göstermektedir.



**Çizim 4.22.** rTFF'nin Primer Kültür Hücre Hattı Hücrelerinin Farklılaşmasına Olan Etkisi  
A: rTFF eklenen kültür, B: negatif kontrol kültürü. 10x objektif kullanılarak çekilmiştir (Olympus, Japonya).

#### **4.6. rTFF'nin Hücre İçi E-Kaderin Düzeyi Üzerine Etkisi**

MCF-7 ve primer hücre hattı üzerinde rTFF pozitif kültür ve negatif kültür üst sıvısı kullanılarak inkübasyonlar yapılmıştır. Bu inkübasyonlar sonucunda elde edilen hücreler toplanarak ekstraktları western blotlama işlemine tabi tutulmuştur. Bu şekilde elde edilen ekstraktlar üzerinde anti-kaderin antikoru kullanılarak yapılan immünblotlama analizi sonucu Çizim 4.23'te görülmektedir. Buna göre, rTFF pozitif kültür üst sıvısı ile hem MCF-7 ve hem de primer hücre hattı üzerinde yapılan muamelenin E-Kaderin ekspresyonunu artırdığı görülmektedir.



**Çizim 4.23.** rTFF ile Muamele Edilen MCF-7 ve Primer Hücre Hatlarının E-kaderin,  $\beta$ -aktin Düzeyleri ve E-kaderin/ $\beta$ -aktin İntensite Oranları

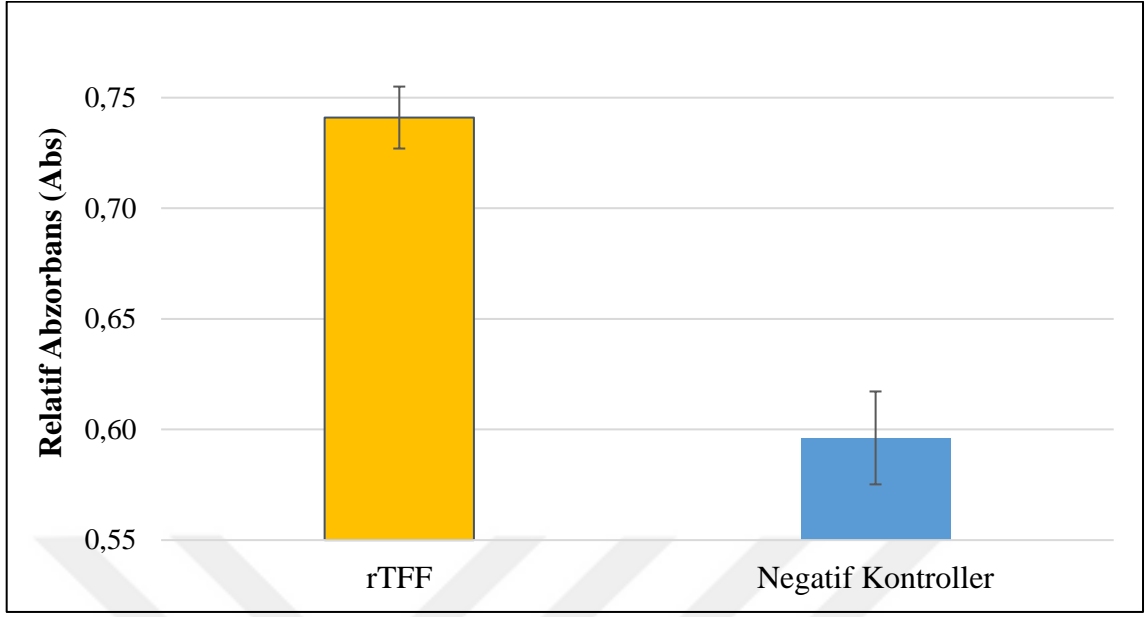
Söz konusu sonuçların daha net şekilde değerlendirilebilmesi amacı ile sıklıkla başvurulan bir metot olduğu üzere  $\beta$ -aktin standardına karşı da western blotlama çalışması yapılmıştır (Hanukoğlu ve diğ. 1983, Lohr ve diğ. 2012). Bu amaçla öncesinde E-kaderin için kullanılan membran strip edilerek Anti- $\beta$ -aktin antikoru kullanılarak yapılan yüklemelerin doğruluklarının test edilmesine çalışılmıştır. Alınan sonuca göre yapılan yüklemenin büyük oranda eşit yapıldığı görülmektedir (Çizim 4.23). Aynı zamanda E-kaderin antikoru kullanılarak elde edilen sonuçlar ile paralel şekilde her iki hücre hattında da rTFF ile muamele edilen kültürlerdeki E-kaderin ekspresyonu seviyesinin yüksek olduğu gözlenmektedir.

E-kaderin western blotlama analizi sonucunda elde edilen bant intensitelerinin,  $\beta$ -aktin için elde edilen intensitelere oranlanması ile iki kültür arasında kıyas yapıldığında, MCF-7 hücre hattının rTFF muamelesine yaklaşık olarak 2 kat'a yakın oranda daha iyi yanıt verdiği görülmektedir. Buna karşın yine olumlu olmakla birlikte primer hücre hattının rTFF muamelesine MCF-7 hücre hattına kıyasla daha az düzeyde yanıt verdiği görülmektedir (Çizim 4.23).

Elde edilen bu sonuçlar, yapılan rTFF muamelesi ile her iki kültürde de farklılaşmanın gerçekleştiğini göstermektedir. Negatif kontrol kültürlerine kıyasla pozitif kültürlerdeki artan E-kaderin düzeyleri, kültürlerdeki hücrelerin malign bir karakterden, daha benign bir karaktere doğru farklılaştıklarını kanıtlamaktadır (Platica ve diğ. 2004).

#### **4.7. rTFF'nin Neonatal Fc Reseptörü'ne Bağlanma Testi**

Yapılan bu testte 5 farklı şekilde hazırlanan pozitif kültür üst sıvısı örneği ile birlikte örneklerin kontrolü amacı ile negatif kültür üst sıvısı kullanılmıştır. Bunlar dışında, örneklerle eş zamanlı olarak testin pozitif kontrolü için farklı dilüsyonlarda hazırlanmış pozitif kontrol standartları, antijenin negatif kontrolü için antijen negatif kontrolü ve ikincil antikorun negatif kontrolü için ise biyotinlenmiş ikincil antikor negatif kontrolü çalışılmıştır. Alınan sonuçlara göre, elde edilen rTFF'nin farklı şekillerde hazırlanan tüm örneklerinde bağlanma görülmüştür. Buna karşın, kullanılan negatif kontrollerin tamamında düşük ışımaya gözlenmiş ve bu şekilde elde edilen sonuçlar Çizim 4.24'te paylaşılmıştır.



**Çizim 4.24.** Neonatal Fc Reseptörü'ne Bağlanma Testi Sonucu

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamız neticesinde, rTFF proteininin aktivite gösterebilen formunun başarılı şekilde üretilbildiği görülmektedir. Dahası, yapılan detaylı analizler sonucunda rTFF proteininin çalışmanın başlangıcında tasarımı yapıldığı şekli ile IgG1-Fc domaini'nin N-ucuna bağlı şekilde üretilbildiği belirlenmiştir. Tasarımı yapılarak, üretimi gerçekleştirilen bu protein aktif yapıdadır. Beklendiği üzere yalnızca meme tümörü hücreleri üzerine etkiyerek, onları farklılaştırmada başarılı olduğu alınan sonuçlar ile kanıtlanmıştır. Buna göre, rTFF ile muamele edilen meme tümörü hücrelerinin malign bir karakterden, benign bir karaktere doğru farklılaştıkları görülmüştür. Ancak, meme tümörü dışında bir servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücre hattı üzerinde beklediği şekilde hiçbir etki göstermemiştir (Platica ve diğ. 2004, Sokolowska ve diğ. 2013).

Elde edilen proteinin +4 °C'deki kültür üst sıvısı içerisindeki stabilitesinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, proteinin PTM (post-translasyonel modifikasyon) düzeyinin düşük olması, kültür sıvısında ölü hücrelerden açığa çıkan proteolitik enzimlerin bulunması ve kültür üst sıvısının genel olarak protein stabilizasyonuna uygun olmayışı gibi nedenlerden kaynaklandığı düşünülebilir. Elde edilen olumlu sonuçların herhangi bir stabilizör varlığı olmaksızın saklanan proteinin 3-6 aylık saklama süresi sonundaki kullanımı ile elde edildiği göz önüne alındığında, mevcut stabilitenin bu aşama için yeterli olduğu ancak *in vivo* çalışmalara geçildiğinde stabilizasyona dair ön çalışmalar yapıldıktan sonra kullanım için çok daha kusursuz hale getirilebileceği görülmektedir.

Alınan sonuçlara göre rTFF'nin elde edilen majör fraksiyonunun TFF domaininde, *in vivo* ortamdan elde edilen bütüncül TFF proteinlerinde sıklıkla var olduğu rapor edilen PTM'lerin bulunmadığı gözlenmiştir (Platica ve diğ. 2004, Sokolowska ve diğ. 2013). Bununla birlikte, bu tür modifikasyonlara sahip olduğu tahmin edilen formun çalışmamız dahilinde minör düzeyde de olsa eksprese edilmiş olduğu düşünülmektedir (Çizim 4.5/IIIc-d arasındaki bantlar). Bu durumun, geçici transfeksiyon yolu ile hücre içine fazla miktarda plazmit alınmasının dolaylı bir sonucu olması muhtemeldir. Geçici transfeksiyonda hücre içine birden fazla plazmit girme durumu söz konusudur. Bu da, hücre içerisindeki gen dozajının yüksek olmasına neden olur. Yüksek gen dozajı nedeni ile ekspresyon sistemi aşırı yüklendiğinden post-translasyonel modifikasyonlar tam olarak tamamlanamadan üretilen proteinin hücre dışına salınımı gerçekleştirilebilmektedir. Her ne kadar PTM düzeyi beklenenin altında olsa da, bu şekilde elde edilmiş olan proteinin bütüncül yapısı ile tam

olarak aktivite gösterebildiği açıktır. Düşük PTM düzeyine karşın tamamen fonksiyonel bir protein elde edilebiliyor oluşu, klinik çalışmalar ve sonrasında yüksek verimlilikte üretim yapılabileceği anlamını da taşımaktadır. Ayrıca bu durum, yüksek molekül ağırlığı ve IgG1-Fc domain'i nedeni ile düşük renal temizlenme ve immün yanıtı tetikleyebilen bir niteliğe sahip olmasının önünde herhangi bir engel teşkil etmemektedir.

Etkinlik testlerinde kullanılan hücre hatlarından primer hücre hattında görülen aktivitenin, MCF-7 hücre hattına kıyasla daha düşük olduğu gözlenmiştir (Çizim 4.23). Bu durumun kuvvetle muhtemel sebebinin primer hücre hattının, MCF-7 hücre hattına kıyasla çok daha invazif bir karakterde olması olduğu tahmin edilmektedir. Buna karşın, rTFF'nin her iki hücre hattında da negatif kontrol kültürüne kıyasla farklılaşma yönünde etki gösterdiği açık şekilde görülmüştür.

### 5.1. Sınırlılıklar

Çalışma kapsamında rTFF'nin başarılı şekilde üretimi gerçekleştirilmiş olup, söz konusu proteine dair çeşitli etkinlik testleri *in silico* ve *in vitro* ortamlarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. rTFF'nin tasarımında mevcut olan IgG1-Fc domaini'nin molekülün yarılanma ömrünü artırması ve immün yanıtı tetiklemesi açılarından etkinliğinin tam olarak test edilebilmesi için *in vivo* testlerin yapılması elzemdir. Dahası, her ne kadar etkinliği ve özgüllüğü çalışmamız kapsamında test edilmiş olsa da, *in vivo* ortamda geliştirilen meme tümörü üzerindeki etkinliğinin ve özgüllüğünün de yine bu yolla test edilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda yapılabilecek bir çalışmanın gerektirdiği maddi yükün karşılanabilmesi amacı ile tarafımızca "Rekombinant tümör farklılaşma faktörü üretimi ve prostat ve meme kanseri hücreleri üzerindeki terapötik etkilerinin araştırılması" proje adı ile TÜBİTAK'a (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurulu) başvuruda bulunulmuştur. Yapılan proje başvurusunda söz konusu molekülün *in silico* tasarımı, üretimi ve daha kapsamlı şekilde hem meme, hem de prostat tümörleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* etkinlik testlerinin yapılması önerilmiştir. Bu bağlamda, 1003-Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı'nın, "Moleküler Tıp" başlığı altında bulunan 1003-SAB-TTIP-2016-1 Kod Numarası ile açılan çağrıya başvurulmuştur. 23.03.2016 tarihinde yapılan başvuruya ait başvuru numarası: 316889'dur. Birinci Aşama başvurusunun onaylanması nedeni ile 16.06.2016 tarihinde 328580 başvuru numarası ile ikinci aşama başvurusu yapılmıştır. Ancak açıklanan nihai sonuçlara göre, söz konusu proje TÜBİTAK tarafından

desteklenmeye uygun görülmemiştir. Bu nedenle, söz konusu araştırmanın kapsamı daraltılarak projenin tasarım, üretim ve *in vitro* etkinlik testlerinin meme tümörü hücre hatları üzerinde gerçekleştirilebilmesi amacı ile üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na başvuruda bulunulmuş ve projemiz desteklenmeye uygun görülmüştür.





## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Mevcut sonuçlar ışığında, söz konusu proteinin meme tümörü üzerindeki etkinliği kanıtlanmış durumdadır. Bu nedenle, geliştirilen proteinin klinik açıdan değerinin daha net biçimde değerlendirilebilmesi amacı ile klinik öncesi fazlardan, *in vivo* etkinlik testlerine tabi tutulması büyük önem arz etmektedir. Mevcut çalışmanın, ileride yapılması planlanan *in vivo* çalışmaların önemini vurgulaması ve bu kapsamda yapılacak olan proje başvurularına ışık tutması bakımından büyük önem taşıdığı tarafımızca yapılan değerlendirmeler arasındadır.

Bu kapsamda yapılacak olan ileri çalışmalarda HEK hücre hattı ile yapılabilecek ekspresyona alternatif olarak, tarafımızca TÜBİTAK'a iletilen proje başvurumuzda da önerdiğimiz üzere CHO hücre hattının da kullanımı denenebilir. Böylelikle HEK hücre hattının kullanımı ile üretim prosesine ve ürüne dair optimizasyon çalışmaları yapılabileceği gibi, CHO hücre hattının stabil transfeksiyonu ile de optimum verimlilik ve karakterdeki proteinin eldesine çalışılabilecektir. Proteinin *in vivo* testlerde kullanılmasından önce saflaştırma prosesinin optimize edilmesi, stabilizasyona dair uygun içerik ve koşulların saptanması, *in vivo* çalışmalardan maksimum verim elde edilmesini mümkün kılacaktır.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

Absolute antibody. Erişim: 19 Mayıs 2019, <https://absoluteantibody.com/antibody-resources/antibody-overview/other-antibody-interactions/>

AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual. Chicago, IL, USA, 2015.

Akyolcu N ve Kanan N. Kadınlarda kendi kendine meme muayenesinin yaşam süresine olumlu etkisi. *Hemşirelik Bülteni* 2(8):72-4, 1987.

Akyolcu N. Kadınlarda meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi hakkındaki sağlık bilgisi düzeylerinin ölçülmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1985.

Almagro JC, Daniels-Wells TR, Perez-Tapia SM ve Penichet ML. Progress and Challenges in the Design and Clinical Development of Antibodies for Cancer Therapy. *Frontiers in Immunology*, 2018; 8: 1751, (doi: 10.3389/fimmu.2017.01751).

Arsan M. Meme hastalıkları. *Actual Medicine*, 1999; 7(8):67-73.

Ashkenas J, Muschler J ve Bissell MJ. The extracellular matrix in epithelial biology: shared molecules and common themes in distant phyla. *Dev Biol*. 1996; 180(2):433-44.

Baxter N. Preventive health care 2001 update: should women be routinely taught breast self-examination to screen for breast cancer? *Journal of Canadian Medical Association*, 2001; 164(13):1837-46.

Bengisu N. Meme kanserinde bilmemiz gerekenler. *Actual Medicine*, 2000; 8(12): 67-72.

Bilir N. Türkiye’de ve Dünya’da Kanser Sorunu. Birinci Kanser Sempozyumu, Panel ve Bildiriler Kitapçığı, s.1-9, Sağlık Bakanlığı Kanser Savaş Daire Başkanlığı, Ankara, 1991.

Bland K (Ed) The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases, Elsevier, 2004.

Bornhorst JA ve Falke JJ. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol*. 2000; 326:245-54.

Bölükbaş N, Çevik R. Mastektomili Hastalarda Depresyon ve Umutsuzluk Düzeylerinin İncelenmesi. VII. Ulusal Hemşirelik Kongresi Bildirileri, s.116-121, Erzurum, 1999.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976; 72(1-2):248-54.

Burgut R, Tuncer İ ve Bozdemir N. Türkiye’de 16 Merkezin Kanser Verilerinin Değerlendirilmesi: Türkiyede Kanser Sıklığı, Türkiye Bilimsel Ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Adana, 1994.

Cassard L, Cohen-Solal JFG, Fournier EM ve diğ. Selective expression of inhibitory Fcγ receptor by metastatic melanoma impairs tumor susceptibility to IgG-dependent cellular response. *Int J Cancer*, 2008; 123:2832-9.

Chan V, Lisa FD, Flintoff KA ve diğ. The Effect of Increasing Plasmid Size on Transformation Efficiency in *Escherichia coli*. *JEMI*, 2002; 2:207-23.

Cheney CM, Stephens DM, Mo X ve diğ. Ocaratuzumab, an Fc-engineered antibody demonstrates enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia. *mAbs*, 2014; 6(3):749-55.

Costanza ME, Li FP, Greence HL ve diğ. Cancer Prevention And Detection: Strategies for Practice in Cancer Manual. American Cancer Society, Boston, 1990.

Criss WE, Baysal A. Kanserden Korunmak İçin Beslenme Rehberi. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 1999.

- Crivianu-Gaita V, Romaschin A, Thompson M. High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from F(ab)2 units. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2015; 2:23–8.
- Czajkowsky DM, Hu J, Shao Z ve Pleass RJ. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Mol. Med.* 2012; 4:1015–28.
- Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA ve Chu SY. Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug Discov Today*, 2007; 12:898–910.
- Dijstelbloem HM, van de Winkel JGJ ve Kallenberg CGM. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* 2001; 22(9):510–6.
- Doğan M. Meme kanserinde farklı tedavi tekniklerinin psikososyal etkileri: mastektomiye karşı meme koruyucu tedavi. *Türk Psikoloji Bülteni* 16-17:84-86, 2000.
- Dumont J, Euwart D, Mei B ve diğ. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol.* 2015; 1-13.
- Encyclopedia. Erişim: 19 Mayıs 2019, <https://glycopedia.eu/e-chapters/Overview-of-Immune-Responses-A-Primer-72/Humoral-adaptive-immune-responses>
- Fagotto F, Gumbiner BM. Cell contact-dependent signaling. *Dev Biol.* 1996; 180(2):445-54.
- Fauza DO, Bani M (Ed) *Fetal Stem Cells in Regenerative Medicine: Principles and Translational Strategies*. Springer Verlag, New York, 2016.
- Griggs J ve Zinkewich-Peotti K. Immune-mediated antibody effects in cancer. *British Journal of Cancer*, 2009; 101(11): 1807–12.
- Gupta J, Hoque M, Zaman M ve diğ. A detergent-based procedure for the preparation of IgG-like bispecific antibodies in high yield. *Sci. Rep.* 2016; (6):39198, (doi:10.1038/srep39198).
- Güler Ü. Meme Kanseri. *Ege Üniversitesi H.Y.O. Dergisi*, 1990; 6(3):75-83.
- Hanukoğlu I, Tanese N ve Fuchs E. Complementary DNA sequence of a human cytoplasmic actin. Interspecies divergence of 3' non-coding regions. *J. Mol. Biol.* 1983; 163(4):673-8.
- Herter S, Herting F, Mundigl O ve diğ. Preclinical Activity of the Type II CD20 Antibody GA101 (Obinutuzumab) Compared with Rituximab and Ofatumumab In Vitro and in Xenograft Models. *Mol Cancer Ther.* 2013; 12(10):2031-42.
- Hutterer KM, Hong RW, Lull J ve diğ. Monoclonal antibody disulfide reduction during manufacturing. *mAbs*, 2013; 5(4):608-13.
- Invitrogen. FreeStyle 293-F Cells User Guide. Cat No: R790-07, Doc. Part No: 25-0457, Publication No: MAN0000255, Revision A.0, 2015.
- Invivogen. Erişim: 19 Mayıs 2019, <https://www.invivogen.com/review-antibody-generation>
- Jansen J-C. (Ed) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*. Volume 151 of *Methods of Biochemical Analysis*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2011.
- Kaymakçı Ş. Meme Hastalıkları Hemşireliği. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, 2001.
- Koçak S. Meme kanserinde klinik tanı ve evrelendirme. *Klinik Bilimler & Doktor, Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi*, 2000; 6(4):468-71.
- Kontermann RE. Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies. *BioDrugs*, 2009; 23:93-109.

- Kontermann RE. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011; 22:868–76.
- Koornstra JJ, de Jong S, Hollema H ve diğ. Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003; 45(1):37–53.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227(5259):680–5.
- Lanneau D, de Thonel A, Maurel S ve diğ. Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP90, HSP70 and HSP27. *Prion*, 2007; 1(1):53–60.
- Liu J, Wang L, Zhao F ve diğ. Pre-Clinical Development of a Humanized Anti-CD47 Antibody with Anti-Cancer Therapeutic Potential. *Plos One*, 2015; 1-23.
- Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS ve diğ. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 2012; 109(10):3879-84.
- Lorente GM, Friess T, Kolm I ve diğ. Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy of RG7116: a novel humanized, glycoengineered anti-HER3 antibody. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015; 75:837–50.
- Mukherjee S, Zhang Y. Protein-protein complex structure prediction by multimeric threading and template recombination. *Structure*, 2011; 19:955-66.
- Ng KW, Schantz JT (Ed) A Manual for Primary Human Cell Culture. World Scientific, Singapore, 2010.
- Nimmerjahn F ve Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:34–47. <http://www.glycopedia.eu/e-chapters/Overview-of-Immune-Responses-A-Primer-72/References-438> (Ulaşım: 19 Mayıs, 2019).
- Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K ve Ravetch JV. FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*, 2005; 23:41–51.
- Özen Ş. Meme Kanseri. *Ege Üniversitesi HYO Dergisi*, 1994; 10(3):95-112.
- Öztürk M, Ergin US, Kişioğlu AN ve diğ. Effect of education on knowledge and attitude of breast self examination among 25+ years old women. *Eastern Journal of Medicine*, 2000; 5(1):13-7.
- Özyılkan Ö. Meme ve over kanserlerinde heredite. *Sağlıkta Randevu*, 2000; 6(32):2-16.
- Özyılkan Ö. Meme kanserli hasta takibinde seruloplazmin, CA 15-3 ve doku polipeptid spesifik antijeninin rolü. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı, Ankara, 1994.
- Parlar S, Kaydul N ve Ovayolu N. Meme Kanseri ve Kendi Kendine Meme Muayenesinin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 2005; (8)1:72-83.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC ve diğ. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 2004; 25(13):1605-12.
- Platica M, Chen HZ, Ciurea D ve diğ. Pituitary Extract Causes Aggregation and Differentiation of Rat Mammary Tumor MTWS/PI Cells. *Endocrinology*, 1992; 131(6):2573-80.
- Platica M, Ivan E, Holland JF ve diğ. A pituitary gene encodes a protein that produces differentiation of breast and prostate cancer cells. *PNAS*, 2004; 101(6):1560-5.
- Platica M, Platica O ve Holland JF. Pituitary differentiation factor and methods of use thereof. European Patent Office. EP 1 538 199 A1, 2005.

- Pusztai L, Lewis CE, Lorenzen J ve diğ. Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. *J Pathol.* 1993; 169(2):191–201.
- Reiding KR, Blank D, Kuijper DM ve diğ. High-throughput profiling of protein N-glycosylation by MALDI-TOF-MS employing linkage-specific sialic acid esterification. *Anal. Chem.* 2014; 86:5784–93.
- Roy A, Küçükural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 2010; 5:725-38.
- Roy U, Sokolowska I, Woods AG ve diğ. Structural Investigation of tumor differentiation factor. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2012; 59(6): 445-50.
- Roy U, Sokolowska I, Woods AG ve diğ. Tumor Differentiation Factor (TDF) and its Receptor (TDF-R): Is TDF-R an Inducible Complex with Multiple Docking Sites? *Mod Chem appl.* 2013; 1(3):1-4.
- Roy U, Woods AG, Sokolowska I ve diğ. Structural Evaluation and Analyses of Tumor Differentiation Factor. *Protein J.* 2013; 32:512–8.
- Sağlık Bakanlığı. Ulusal Aile Planlaması Hizmet Rehberi. Aile Planlaması ve Üreme Sağlığı, Damla Matbaacılık. Cilt 1, Ankara, 2000.
- Salzberg SL. Open questions: How many genes do we have? *BMC Biology*, 2018; 16(94):1-3.
- Samakoğlu S, Deevi DS, Li H ve diğ. Preclinical Rationale for Combining an EGFR Antibody with Cisplatin/Gemcitabine for the Treatment of NSCLC. *Cancer Genomics & Proteomics*, 2012; 9:77-92.
- Selimoğlu SM, Kasap M, Akpınar G ve diğ. Monoklonal antikor teknolojisi'nin Dünü, Bugünü ve Geleceği". *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2016a; 2(1):6-14.
- Selimoglu SM, Kasap M, Akpınar G ve diğ. Overcoming difficulties on synthesis of cardiac troponin-I. *Prep Biochem Biotechnol.* 2016b; 47(1): 94-99.
- Sevil Ü, Ünsal Ş. Meme kanserinde risk faktörleri ve erken tanı. *Hemşirelik Forumu*, 2002; 5(6):32-39.
- Shiovitz S ve Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Annals of Oncology*, 2015; 26:1291-9.
- Shire SJ (Ed) Woodhead Publishing Series in Biomedicine: Number 77 Monoclonal Antibodies Meeting the Challenges in Manufacturing, Formulation, Delivery and Stability of Final Drug Product. Woodhead Publishing, Sawston, Cambridge, 2015.
- Shukla AA, Hinckley PJ, Gupta P ve diğ. Strategies To Address Aggregation During Protein A Chromatography. *BioProcess International*, 2005; May:36-44.
- Singh SM, Bandi S, Jones DNM ve Mallela KMG. Effect of Polysorbate 20 and Polysorbate 80 on the Higher-Order Structure of a Monoclonal Antibody and Its Fab and Fc Fragments Probed Using 2D Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017; 106:3486-98.
- Sokolowska I, Woods AG, Gawinowicz MA ve diğ. Identification of Potential Tumor Differentiation Factor (TDF) receptor from Steroid-responsive and Steroid-resistant Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2012; 287(3):1719–33.
- Sokolowska I, Woods AG, Gawinowicz MA ve diğ. Characterization of tumor differentiation factor (TDF) and its receptor (TDF-R). *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70:2835–48.
- Starke K (Ed) Handbook of Experimental Pharmacology. Freiburg i. Br. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008.
- Şencan O, Akbulut H. Kanserde tarama ve erken tanı. *Aktüel Tıp Dergisi*, 1998; 3(10):515-18.

- Tang L, Persky AM, Hochhaus G ve Meibohm B. Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. *J Pharmaceut Sci.* 2004; 93:2184-204.
- Tao H, Liu W, Simmons BN ve diğ. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100 and CHAPS. *BioTechniques*, 2010; 48(1):61-4.
- Thermoscientific, Mammalian cell-based expression systems compared. Erişim: 19 Mayıs 2019, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-expression-handbook/pex-handbook-mammalian-cell-based-protein-expression.html>
- Thermoscientific. Protein expression handbook; recombinant protein expression and purification technologies. s.12, 2015.
- Turgut M. Evre IV meme kanserinde CEF ve CNF kemoterapilerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, 1993.
- Uysal O, Sevimli T, Sevimli M ve diğ. Cell and Tissue Culture: The Base of Biotechnology. Barh D, Azevedo V (Ed). *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*. Academic Press, 2018.
- Ünal A. Meme Kanseri. Klinik Cerrahi Onkoloji. 1. Baskı, Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, 1997.
- Vazquez-Rey M ve Lang DA. Aggregates in Monoclonal Antibody Manufacturing Processes. *Biotechnol. Bioeng.* 2011; 108:1494–508.
- Vidarsson G, Dekkers G ve Rispen T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology: Immunotherapies and Vaccines*, 2014; 5(2014):1-17.
- Wang T, Liu YD, Cai B ve diğ. Investigation of antibody disulfide reduction and re-oxidation and impact to biological activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015; 102:519–28.
- Wood AJ, Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 1998; 339:974-84.
- Woods AG, Sokolowska I, Deinhardt K ve diğ. Identification of tumor differentiation factor (TDF) in select CNS neurons. *Brain Struct Funct.* 2014; 219:1333–42.
- Yan J, Allendorf DJ, Li B, Yan R, Hansen R ve Donev R. The role of membrane complement regulatory proteins in cancer immunotherapy. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 632: 159–74.
- Yang J, Wang Y, Zhang Y. ResQ: An approach to unified estimation of B-factor and residue-specific error in protein structure prediction. *Journal of Molecular Biology*, 2016; 428:693-701.
- Yang J, Yan R, Roy A ve diğ. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 2015; 12:7-8.
- Yiğit R. Meme kanserinde bilmemiz gerekenler. *Aktual Medicine*, 1998; 8(12):67-72.
- Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatic*, 2008; 9:40.

## ÖZGEÇMİŞ

### 1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Süreyya Mert Selimoğlu
- Doğum yeri ve tarihi: Ankara – 14.11.1983
- Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti
- Medeni Durumu: Bekâr
- Askerlik Durumu: Tamamlandı
- Çalıştığı Kurum: Pak Gıda Üretim ve Pazarlama A.Ş.
- İletişim Adresi ve Telefonu: Yahyakaptan Mah. Uluçınar Cad. Koru Sok. F-28 Blok D:16  
İzmit/Kocaeli - +905557480792

### 2. Eğitimi

- Lisans: Biyoloji (İngilizce) – Abant İzzet Baysal Üniversitesi (2002-2006)
- Yüksek lisans: Biyomühendislik – Ege Üniversitesi (2006-2009)
- Doktora: Tıbbi Biyoloji – Kocaeli Üniversitesi (2014-...)
- Yabancı Dili: İngilizce (İleri Seviye), Almanca (Başlangıç Seviyesi)

### 3. Unvanları

- Ar-Ge Uzmanı – Pak Biyoteknoloji Merkezi / Pakmaya

### 4. Mesleki Deneyimi

- Ar-Ge Uzmanı – Pak Biyoteknoloji Merkezi / Pakmaya (2016-...)
- Rekombinant Kreatin Kinaz ve Troponin-I Antijenlerinin Geliştirilmesi ve Bunlara Karşı Antikor Geliştirilmesi Projesi / Kocaeli Üniversitesi (2013-2016)
- Epitop görüntüleme için vimentin proteinine karşı geliştirilen anti-anjiyojenik scFv antikorunun üretimi / Aarhus Üniversitesi (2012-2013)
- İnsan yaşlanmasında biyomarkerların tespit edilmesi, MarkAge Projesi / Aarhus Üniversitesi (2012-2013)
- Aljinat ile immobilize edilen hibridoma hücrelerinin kullanımı ile *Salmonella enteritidis*'e karşı büyük ölçekli monoklonal antikor üretimi, Master Tezi / Ege Üniversitesi (2006-2009)

- Ticari aljmatın ultra-safılaştırılma prosesi / Ege Üniversitesi (2006-2009)

## 5. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Preparative Biochemistry and Biotechnology (Hakem)

## 6. Bilimsel Etkinlikler

- Seçilmiş Yayınlar:

### Patentler:

- **Selimoglu, S.M.**, Taşpınar-Demir H., Türker, M. Pak Gıda Üretim ve Pazarlama A.ř. Glutasyon İçeriği Arttırılmış Deaktive Maya Üretim Yöntemi. 06.08.2018 - No. PT2018-00462- Ulusal Patent.
- **Selimoglu, S.M.**, Alemdar, F., Türker, M. Pak Group of Companies. A Strain Development Method. ABD Patent Ofisi - Değerlendirme Aşamasında.

### Makaleler:

- **Selimoglu, S.M.**, Kasap, M., Akpınar, G., Gormus, U., Wis, A.M., Karadenizli, A. "Improved production of highly active and pure Human Creatine Kinase". *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28:28-36, 2018.
- **Selimoglu, S.M.**, Kasap, M., Akpınar, G., Karadenizli, A. "Overcoming difficulties on synthesis of cardiac troponin-I". *Prep Biochem Biotechnol*, 47(1): 94-99, 2017.
- Kasap, M., Akpınar, G., Guzel, N., **Selimoglu, S.M.** "Stable expression of human proteins in cultured cells". *TJMBB*, 1:72-9, 2016.
- **Selimoglu, S.M.**, Kasap, M., Akpınar, G., Karadenizli, A. "Monoklonal Antikor Teknolojisi'nin Dünü, Bugünü ve Yarını". *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(1): 6-14, 2016.
- **Selimoglu, S.M.** "Conscience Dilemma: to become a Bioengineer or to survive as a Biologist". *Theoretical Biology Forum*, 107(1-2), pp: 143-150, 2014.
- **Selimoglu, S.M.**, Ayyıldız-Tamis, D., Deliloglu-Gurhan, I., Elibol, M. Purification of alginate and feasible production of monoclonal antibodies by the alginate-immobilized hybridoma cells". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(2): 233-238, 2012.
- **Selimoglu, S.M.**, Elibol, M. "Alginate as an immobilization material for Mab production via encapsulated hybridoma cells". *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2): 145-159, 2010.



- **Selimoglu, S.M.**, Ayyildiz, D., Nalbantsoy, A., Elibol, M., Gurhan, S.I.D. "Monoclonal Antibody Production by the Immobilized Hybridoma Cells via Alginate Encapsulation". *Biyomut: 2009 14th National Biomedical Engineering Meeting; IEEE*, 345e 47th St, New York NY 10017 USA; ISBN: 978-1-4244-3605-7, pp: 364-364, 2009.
- Ayyildiz, D., **Selimoglu, M.**, Elibol, M., Deliloglu-Gurhan, I. "Cultivation of calcium-alginate encapsulated myeloma cells in bioreactor". *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 3(2): 48-53, 2009.

Posterler:

- Islek, E.E., Kasap, M., Akpınar, G., Kara, B., Kanli, A., **Selimoglu, M.** "(In-vitro) Expression of Bend4 Shed Some Clues About Its Physiological Function". X Annual Congress of the European Proteomics Association, Istanbul, 2016.
- **Selimoglu, M.**, Kasap, M., Akpınar, G., Karadenizli, A. "Novel Design for the Improved Stability and Production of a Heterodimeric Enzyme, Human Creatine Kinase MB". X Annual Congress of the European Proteomics Association, Istanbul, 2016.
- **Selimoglu, M.**, Kasap, M., Akpınar, G., Karadenizli, A. "Expression and purification of a highly insoluble protein, cardiac troponin I". OurCon II 2014: Imaging Mass Spectrometry Conference & 1st Congress of the Proteomics Society (Turkey), Antalya, 2014.
- **Selimoglu, M.**, Guzel, N., Karaosmanoglu, K., Kasap, M., Akpınar, G., Kanli, A. "His-tagged Green Fluorescent Protein as a standard for Immobilized Metal Affinity Chromatography Separation Studies". OurCon II 2014: Imaging Mass Spectrometry Conference & 1st Congress of the Proteomics Society (Turkey), Antalya, 2014.
- Ayyildiz-Tamis, D., Nalbantsoy, A., Ozen, M.O., **Selimoglu, M.**, Elibol, M., Deliloglu-Gurhan, I. "Animal Cell Culture Processes and Scale Up". ICAST 2010: The Fourth International Student Conference on Advanced Science and Technology, Izmir, 2010.
- **Selimoglu, S.M.**, Ayyildiz, D., Nalbantsoy, A., Elibol, M., Deliloglu-Gurhan, I. "Purification of Alginate for Feasible Production of Monoclonal Antibodies by the Immobilized Hybridoma Cells". *Biotech Metu 2009 International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends*, Ankara, 2009.
- **Selimoglu, S.M.**, Elibol, M., Bedir, E. "Chemical Ultra-Purification of Commercially Purchased Alginate". 4th National Bioengineering Congress with International Participation, Izmir, 2008.

- Aldığı Burslar:
  - GSST (Graduate School of Science and Technology) Bursu, Aarhus Üniversitesi, Danimarka, 2012-2013.
- Ödüller:
  - Üstün Performans Ödülü, Pakmaya, Pak Gıda Üretim ve Pazarlama A.Ş., 2018.
  - GSST (Graduate School of Science and Technology) Bursu, Aarhus Üniversitesi, 2012-2013.
  - Görevde Başarı Belgesi, Karantina Koşu Kurulu ve İşletilmesi, Türk Hava Kuvvetleri, 2010.
  - Bölüm İkincisi Olarak Mezuniyet, Fen Edebiyat Fakültesi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi, 2006.
- Projeler:
  - TTRaFFIC (ERA-IB-15-011): Toxicity and Transport for Fungal production of Industrial Compounds / Pak Gıda ve Pazarlama A.Ş. (2016-2019)
  - MeMBrane (ID:37): MEmbrane Modulation for BiopRocess enhANcEment, CoBioTech,Proje Yürütücüsü / Pak Gıda ve Pazarlama A.Ş. (2018-...)
  - Organik Ekmek Mayası Prosesi Geliştirilmesi ve Pilot Ölçekte Üretimi, TÜBİTAK Proje No: 1170273 / Pak Gıda ve Pazarlama A.Ş. (2018-...)
  - Glutasyonu Artırılmış Deaktive Maya Üretim Prosesi / Pak Gıda ve Pazarlama A.Ş. (2018-...)
  - Doğal Küf Önleyici Ürün Geliştirilmesi / Pak Gıda ve Pazarlama A.Ş. (2017-...)
  - Doğal (Non-GMO) Yöntemlerle Elde Edilen Yeni Maya Suşlarının Temel Davranışlarının ve Ticari Potansiyellerinin Belirlenmesi, Proje Yürütücüsü / Pak Gıda ve Pazarlama A.Ş. (2016-...)
  - Rekombinant Kreatin Kinaz ve Troponin-I Antijenlerinin Geliştirilmesi ve Bunlara Karşı Antikor Geliştirilmesi, Marmara Kalkınma Ajansı Destekli Proje/Kocaeli Üniversitesi (2013-2016)
  - Epitop görüntüleme için vimentin proteinine karşı geliştirilen anti-anjiyojenik scFv antikorunun üretimi / Aarhus Üniversitesi (2012-2013)
  - İnsan yaşlanmasında biyomarkerların tespit edilmesi, MarkAge Projesi / Aarhus Üniversitesi (2012-2013)

- Aljinat ile immobilize edilen hibridoma hücrelerinin kullanımı ile *Salmonella enteritidis*'e karşı büyük ölçekli monoklonal antikor üretimi, Master Tezi / Ege Üniversitesi (2006-2009)
- Ticari aljınatın ultra-saflaştırılma prosesi / Ege Üniversitesi (2006-2009)
- Verdiği Konferans/Seminerler:
  - Maya Üretim Prosesi Teknikleri. 5. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, Üsküdar Üniversitesi, İstanbul, 2017.
  - Aljinat Enkapsülasyonu ile İmmobilize Edilen Hibridoma Hücreleri ile Monoklonal Antikor Üretimi. Biyomut: 2009, 14. Uluslar arası katılımlı Biomedikal Mühendislik Kongresi, İzmir, 2009.
  - Bakterilerde Gen Ekspresyonu ve Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması, Teorik Ders ve Uygulama. I. Moleküler Klonlama ve Protein Ekspresyonu Uygulamaları Kursu, Kocaeli Üniversitesi, 06-08 Aralık, 2017.
  - Bakterilerde Gen Ekspresyonu ve Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması, Teorik Ders ve Uygulama. I. Moleküler Klonlama ve Protein Ekspresyonu Uygulamaları Kursu, Kocaeli Üniversitesi, 06-08 Eylül, 2018.

## EKLER

### Etik Kurul Onayı

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2017/108	Proje No: 2017/203	Tarih: 19/07 2017
	Prof. Dr. Murat KASAP sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input checked="" type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*		

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

#### Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Şemil Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

\* Gereke ve öneriler:

*Distalle kırıkların değerlendirilmesinde  
Araştırma*

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Onay formu	21.09.2016/KOGOEK01.1	2/2