

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İMMUNOJEN ASCT2 SEKANSİNİN REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ VE  
POLİKLONAL ASCT2 ÜRETİMİ

Gamze Çağatay

Danışman Öğretim Üyesi  
Doç. Dr. Erkan YILMAZ

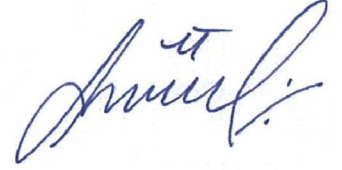
ARALIK

2014

## ETİK BEYAN

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

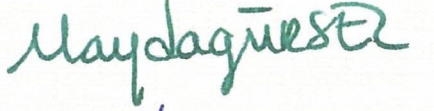
Gamze ÇAĞATAY




## ONAY

Doç. Dr. Erkan YILMAZ danışmanlığında, Gamze ÇAĞATAY tarafından hazırlanan bu çalışma 25/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Mayda GÜRSEL

İmza: 

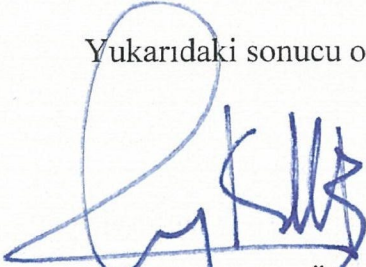
Üye : Prof. Dr. Hakan GÜRDAL

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Erkan YILMAZ

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İmmunojen ASCT2 Sekansının Rekombinant Protein Üretimi ve Poliklonal ASCT2  
Üretimi

Gamze ÇAĞATAY

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. Erkan YILMAZ

Biyoteknoloji alanında veterapötik çalışmalarda son on beş yıldır, antikor üretim teknolojisi devrimsel gelişmelerin en önemlilerinden biri haline gelmiştir. Bu teknolojinin oluturulması için öncelikle saf, spesifik ve güvenli antijenlerin oluşturulması gerekmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi istenilen özelliklere sahip antijenin üretilmesi için kullanılan en temel yöntemlerden bir tanesidir. Bu çalışmada glutaminin hücre içine alınmasında görevli amino asit taşıyıcı 2 proteini (ASCT2)'nin immunojenik molekülünün rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi vepoliklonal ASCT2 antikor üretimi gerçekleştirilmiştir. Balb/C dişi farenin karın içinde oluşan 'ascites' ismi verilen sıvı toplanmış ve hedef antijene spesifik antikor üretildiğini göstermek için yapılan ascites sıvısı ve kuyruk veninden alınan serum örnekleri western blot deneylerinde primer antikor olarak kullanılmıştır. Ascites sıvısı ve serumun içindeki antikorların istenilen antijene bağlandığı tespit edilmiştir. Bir sonraki adımda fazla miktarda ascites örneğinin toplanıp antikor saflaştırma koşulları optimize edilecektir. Saflaştırılmış ASCT2 poliklonal antikorun yeterli donanımına sahip şirketlerde ELISA kiti oluşturulmasında kullanılmasını hedeflemektedir. Çalışmanın ikinci kısmında ise ASCT2 proteininin ifadenmesinin karaciğer kanser hücre hattı (HepG2) ve obez/normal farelerden alınmış karaciğer ve yağ doku gruplarında regülasyonu araştırılmıştır. HepG2 hücre hattında glutamin konsantrasyonu artırıldığında ASCT2 ifadenmesinin arttığı gözlenmiştir. Obez farelerin karaciğer ve yağ dokularında ise normal faredekilere göre daha fazla ifadenme olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, poliklonal antikor üretim teknolojisi başarılı bir şekilde uygulanmıştır ve laboratuvarında üretmiş olduğumuz poliklonal antikorları kullanarak ASCT2'nin obez farelerin karaciğer ve yağ dokularında daha fazla ifade edildiği gözlenmiştir.

2014, 91 sayfa

Anahtar Kelimeler: ASCT2, Rekombinant Protein, Western Blot, Poliklonal Antikor

## **ABSTRACT**

M.Sc Thesis

Recombinant Protein of Immunogen Sequence of Human ASCT2 and ASCT2 Polyclonal  
Antibody Production

Gamze ÇAĞATAY

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erkan YILMAZ

Antibody production technology has been one of the greatest beneficiaries in biotechnology and therapeutic fields over the past 15 years. In order to get this technology, we need more highly purified, more specific, and safer antigens. Recombinant DNA technology is one basic method for the production of target antigens. In this study, immunogen sequence site of human amino acid transporter 2 (ASCT2), role in glutamine transport into the cell, was manufactured by recombinant DNA technology. In addition polyclonal ASCT2 antibody was produced. Intraperitoneal liquid called ascites was collected from Balb/C female mice and serum obtained from mice tail vein and ascites liquid were used as primary antibody in western blot analysis to prove antibodies are specific to target antigen. It was shown that the antibodies in ascites liquid and serum bound to the ASCT2 antigen. In the next step, more amount of ascites samples will be obtained and antibody purification conditions will be optimized. We plan to develop ELISA kits working in correlation with some companies. In the second part of this study, the regulation of ASCT2 protein was investigated in human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) and liver and adipose tissue in obese/normal mice. As a result, we succeed anti human ASCT2 polyclonal antibody production and the expression of ASCT2 in liver and adipose tissue of obese mice was more than in that of lean mice.

2014, 91 pages

Keywords: ASCT2, Recombinant Protein, Western Blotting, Polyclonal Antibody

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, tez çalışmalarında bilgisiyle ve önerileriyle beni yönlendiren, sadece bir hoca olarak değil abim olarak gördüğüm değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Erkan YILMAZ'a,

Tez çalışmalarım süresince bana engin bilgileriyle katkıda bulunan ve tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e,

Tez çalışmama desteklerinden dolayı değerli hocam Doç. Dr. Mustafa Türker DUMAN'a,

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Gülizar AYDOĞDU, Alp TUNCER, Avşar ABBASI ve Pelin SERMİKLİ'ye,

Uzun yıllardır dostluğumuzun devam ettiği, her zaman yanımda duran, tüm zor zamanlarımda yardımına koşan, birlikte unutulmaz anılar biriktirdiğim, onun için çok ama çok güzel bir hayat dilediğim dostum Hatice YILDIZHAN'a,

Birlikte büyüdüğüm, büyürken varlığına iyi ki varlar dediğim, her zaman yanımda olacağını bildiğim kardeşim Eyüp ÇAĞATAY'a ve kuzenim Fatma ÇAĞLUOĞLU'na,

Tez çalışmamın deneysel aşaması için her türlü imkan ve olanakları bana açan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı çalışanlarına,

Almış olduğum kararlara her zaman saygı duyan, maddi ve manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, varlığımızı hep bir bütün olarak gördüğüm canım annem Sevim ÇAĞATAY'a, ve babam Fikret ÇAĞATAY'a,

Ve son olarak Öncelikli Alanlara ve Sanayiye Yönelik Burs kapsamında verdiği burs desteğinden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)'na

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Gamze ÇAĞATAY

ANKARA, Aralık 2014

# İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ONAY</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2.KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. Gen Transferi.....	2
2.2. Gen İzolasyonu .....	2
2.3. Geni taşıyacak uygun araç .....	3
2.3.1. Vektörler.....	3
2.3.2. Virüsler.....	4
2.3.3. Kozmidler.....	4
2.3.4. İfadeleme Vektörleri .....	4
2.4. Transformasyon .....	5
2.5. Klonu içerisine almış hücrenin seçilmesi .....	5
2.6. Protein İfadesinin İndüklenmesi.....	6
2.7. Protein Saflaştırılması.....	7
2.8. Amino Asit Taşıyıcı Tip2 Protein (ASCT2) .....	8
2.8.1. ASCT2 Fonksiyonu .....	8
2.8.2. ASCT2 özellikleri.....	10
2.8.3. Glutamin .....	10
2.8.3.1. Obezite ve İnsülin Hareketinin Düzenlenmesinde Rolü .....	11
2.8.3.2. Kanserli Hücrelerin Glutamin Bağımlılığı .....	11
2.9. Antikor Teknolojisi .....	11
2.9.1. İmmun Sistem .....	11
2.9.2. Antikorlar.....	12
2.9.3. Antikor Yapısı.....	13
2.9.4. Sentezlenmesi .....	14
2.9.4.1. Yan Zincir Teorisi.....	14
2.9.4.2. Kalıp Teori.....	14
2.9.4.3. Öğretici Teori .....	15
2.9.4.4. Klonal Seçim Teorisi .....	15
2.9.4.5. Somatik Rekombinasyon .....	16
2.9.5. Antikor Sınıflandırması.....	16
2.10. Poliklonal Antikorlar .....	18

<b>2.11. Monoklonal Antikorlar</b> .....	<b>19</b>
<b>2.12. Antikor Üretim Aşamaları</b> .....	<b>21</b>
2.12.1. Antikor Üretmesinde Hayvan Seçimi.....	22
2.12.2. İmmünizasyon Metodu.....	22
2.12.3. İmmünojen Hazırlanması.....	23
2.12.4. Adjuvan Seçimi.....	23
2.12.5. Enjeksiyon.....	24
2.12.6. Antikor Görüntüleme (Screening).....	25
2.12.7. Antikor Titrasyonu.....	26
2.12.8. Antikor İzotiplendirmesi.....	26
<b>3.GEREKÇE VE AMAC</b> .....	<b>27</b>
<b>4.MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1. Materyal</b> .....	<b>29</b>
4.1.1. Genel Reaktifler.....	29
4.1.2. Kullanılan RNA Örnekleri.....	29
4.1.3. RNA İzolasyon Reaktifleri.....	29
4.1.4. cDNA Sentez Reaktifleri.....	29
4.1.5. PZR Reaktifleri.....	30
4.1.6. Restriksiyon Enzimleri.....	30
4.1.7. pET28A Vektör.....	30
4.1.8. Ligasyon, Transformasyon, Plazmit İzolasyon Reaktifleri.....	32
4.1.9. Protein Purifikasyon, Desalting protokolü.....	32
4.1.10. Protein İzolasyon ve Tayin Reaktifleri.....	32
4.1.11. Hayvan İmmünizasyonu.....	32
4.1.12. Western Reaktifleri.....	33
4.1.13. Antikor Tiplendirme Reaktifleri.....	33
4.1.14. Hibridoma Reaktifleri.....	33
<b>4.2. Yöntem</b> .....	<b>33</b>
4.2.1. Hücre Kültürü.....	33
4.2.2. Total RNA İzolasyonu.....	35
4.2.3. ASCT2 proteininin antijenik bölgelerinin saptanması.....	35
4.2.4. RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi.....	35
4.2.5. cDNA Sentezlenmesi.....	36
4.2.6. İnsan ASCT2 Ekstrasellüler Kısımına Primer Tasarımı.....	36
4.2.7. PZR Reaksiyonu.....	37
4.2.8. Agaroz Jelde Yürütme.....	39
4.2.9. Guanidin DNA Saflaştırılması.....	39
4.2.10. Plazmit ve PZR Ürünlerinin Kesilmesi.....	40
4.2.11. Ligasyon.....	41
4.2.12. Transformasyon.....	41
4.2.13. T7 Koloni PZR.....	42
4.2.14. Alkalin Lizis Midi Prep ile Plazmit İzolasyonu.....	43
4.2.15. Plazmit Sekansı.....	43
4.2.16. BL21 Hücrelerine Transformasyon.....	45
4.2.17. BL-21 Hücre Lizisi ve SDS-PAGE.....	46
4.2.18. HepG2 Hücrelerinin Lizis Edilmesi ve Protein Eldesi.....	46
4.2.19. Protein Konsantrasyon Tayini.....	46
4.2.20. SDS PAGE.....	47
4.2.21. Örneklerin Hazırlanması.....	48
4.2.22. Jele Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi.....	48
4.2.23. Coomassie Boyaması.....	48



4.2.24. Affinite Kromatografisi ile Protein Saflaştırması .....	48
4.2.25. Protein Desalting Protokolü .....	49
4.2.26. Antijen Hazırlanması .....	50
4.2.27. İmmünizasyon .....	50
4.2.28. Antikor Titrasyonu .....	51
4.2.29. Western Blot .....	51
4.2.29.1. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi .....	51
4.2.29.2. Membran Bloklaması .....	52
4.2.29.3. Birincil Antikor Uygulaması .....	52
4.2.29.4. İkincil Antikor Uygulaması .....	52
4.2.29.5. Membranın Görüntülenmesi .....	53
4.2.29.6. Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	53
4.2.30. Fareden Dalak Alınması .....	53
4.2.31. Antikor İzotiplendirmesi .....	54
4.2.32. Füzyon .....	54
4.2.33. Hibridomaların Besiyeri Değiştirilmesi .....	55
<b><u>5.ARAşTIRMA BULGULARI</u></b> .....	<b>56</b>
<b>5.1. Rekombinant Protein Üretimi</b> .....	<b>56</b>
5.1.1. Antijenik Bölgelerin Tespiti .....	56
5.1.2. HepG2 Hücrelerine Glutamin Uygulaması ve Total RNA Eldesi .....	58
5.1.3. ASCT2 PZR .....	59
5.1.4. ASCT2 Ürünün Guanidin Tiosiyanat ile Saflaştırılması ve Enzim Kesimi .....	60
5.1.5. ASCT2 ve pET28A vektör dizileri .....	61
5.1.5.1. pET28A Vektör Dizisi .....	61
5.1.5.2. ASCT2 Nükleotit Dizisi .....	61
5.1.5.3. ASCT2 Amino Asit Dizisi .....	62
5.1.5.4. ASCT2 Ekstrasellüler Alt Yapı (Domain)'in Nükleotit Dizisi .....	63
5.1.5.5. Plazmit Sekansı .....	64
5.1.6. Koloni PZR .....	65
5.1.7. Alkalen Lizis ile ASCT2 Plazmit Eldesi ve Jelde Yürütülmesi .....	65
5.1.8. Protein Purifikasyon Ürünlerinin SDS-PAGE Sisteminde Gözlenmesi .....	66
5.1.9. Ekstrasellüler ASCT2'nin Moleküler Ağırlılığının Hesaplanması .....	67
5.1.10. Protein Purifikasyonu .....	68
<b>5.2. Antikor Tabanlı Bulgular</b> .....	<b>70</b>
5.2.1. Antikor Titrasyonu .....	70
5.2.2. Ascites Sıvısının ve Serumun Test Edilmesi .....	70
5.2.3. İkinci Kez Fare İmmünizasyonunun Antikor Bulguları .....	73
5.2.4. ASCT2 regülasyonu .....	74
5.2.5. Hibridoma oluşumu .....	77
5.2.6. Antikor İzotiplendirmesi .....	78
<b><u>6.SONUÇ VE TARTIşMA</u></b> .....	<b>79</b>
<b><u>KAYNAKLAR</u></b> .....	<b>82</b>
<b><u>EKLER</u></b> .....	<b>88</b>
<b>EK 1: Etik Kurul Formu</b> .....	<b>88</b>
<b><u>ÖZGEÇMİş</u></b> .....	<b>91</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Lac operon.....	7
Şekil 2.2. Antikor Yapısı .....	14
Şekil 2.3. Klonal Seçim Teorisi.....	16
Şekil 2.5. Monoklonal Antikor Üretimi.....	20
Şekil 4.1. pET28a Vektör Haritası (13) .....	31
Şekil 4.2. ASCT2 ekstrasellüler dizisine spesifik primerlerin PerlPrimer programı ile tasarlanması.....	37
Şekil 4.3. Manyetik boncuklar ve saflaştırma adımları.....	44
Şekil 4.4. Manyetik plate.....	45
Şekil 5.1. ASCT2 protein dizisinin EMBOSS antijenik web sitesinde analiz edilmesi .....	56
Şekil 5.2. Uniprot ASCT2 ekstrasellüler dizi .....	57
Şekil 5.3. Uniprot ASCT2 dizi gösterimi .....	58
Şekil 5.4. Total RNA jel görüntü.....	59
Şekil 5.5. Hedef ASCT2 dizisinin PZR ürünleri.....	60
Şekil 5.6. Saflaştırılan ASCT2 PZR ürünü ve enzimle kesimi ürünleri (DNA ladder, ASCT2 PZR ürünü, ASCT2 enzim kesim ürünü).....	60
Şekil 5.7. ASCT2 gen dizisi.....	62
Şekil 5.8. ASCT2 amino asit dizisi (sarı ile işaretli kısım ekstrasellüler bölge) .....	63
Şekil 5.9. ASCT2'nin çoğaltılan bölgesinin dizisi .....	64
Şekil 5.10. ASCT2 dizisinin sekans görüntüsü .....	64
Şekil 5.11. Sekans genel görüntüsü .....	65
Şekil 5.12. Koloni PZR (1-12 örnekleri transformasyon gerçekleşmiş JM109 E.coli plate üzerinden seçilen kolonilerdir.).....	65
Şekil 5.13. Alkalin lizis protokolü sonucunda ASCT2 plazmiti .....	66
Şekil 5.14. Kolonileri IPTG ile indükleyerek elde edilen protein lizatları (1-9 transforme olmuş farklı kolonilerdir) .....	67
Şekil 5.15. Kolon ile saflaştırılan rekombinant proteini (Elüsyon-EL1, EL2, EL3; Flow through -Flow1, Flow2; yıkama- Y1,Y2,Y3).....	68
Şekil 5.16. Standart eğri grafiği (BCA sonucunda elde edilen değerler ile excell'de çizilmiştir.) .....	69
Şekil 5.17. (a) Ascites sıvısı ve (b) ticari poliklonal antikor ile hücre lizatları üzerinde yapılan western görüntüleri.....	71
Şekil 5.18. Ascites sıvısı (a) ve (b) ticari poliklonal antikor ile doku örnekleri üzerinde yapılan western görüntüleri.....	72
Şekil 5.19. Serum örneği ile yapılan western blot görüntüsü .....	72
Şekil 5.20. HepG2 lizatları ve rekombinant ASCT2 proteinleri üzerinde serum içindeki poliklonal antikorun test edilmesi (serum, ikinci kez immunize edilmiş farenin kuyruk veninden alınmıştır.) ....	73
Şekil 5.21. Obez ve zayıf farelerden alınmış karaciğer örnekleri üzerinde serum içindeki poliklonal antikorun test edilmesi .....	73
Şekil 5.22. Ascites sıvısı ile yapılan western blot görüntüsü (serum, ikinci kez immunize edilmiş farenin kuyruk veninden alınmıştır.) .....	74
Şekil 5.23. Tubulin antikorunu kullanıldığında elde edilen western blot görüntüsü .....	74

<b>Şekil 5.24.</b> Yarı kuantitatif analiz (glutamin regülasyonu).....	75
<b>Şekil 5.25.</b> Glutamin konsantrasyonu ve zamana bağlı ASCT2 ifadenmesi .....	76
<b>Şekil 5.26.</b> Yağ dokuda ASCT2'nin regülasyonu (a: poliklonal ASCT2 antikor b: beta aktin kullanılmıştır.).....	77
<b>Şekil 5.27.</b> Füzyon olmuş hücre.....	77
<b>Şekil 5.28.</b> Antikor izotiplendirme deneyi sonucu plate görünümü .....	78

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<i>Çizelge 2.1. Poliklonal antikor üretimi için kullanılacak hayvanların yaşları.....</i>	<i>25</i>
<i>Çizelge 2.2. Farklı hayvan türlerinde bir bölgeye enjekte edilecek antijen-adjuvan karışımının maksimum hacimleri .....</i>	<i>25</i>
<i>Çizelge 4.1. ASCT2 primer tasarımı .....</i>	<i>30</i>
<i>Çizelge 4.2. pET28A vektör özellikleri.....</i>	<i>31</i>
<i>Çizelge 4.3. ASCT2 ekstrasellüler bölgesinin çoğalması için kurulan touch down PZR .....</i>	<i>38</i>
<i>Çizelge 4.4. Touch down PZR koşulları .....</i>	<i>38</i>
<i>Çizelge 4.5. İkinci defa kurulan Touch-down PZR koşulları.....</i>	<i>39</i>
<i>Çizelge 4.6. Guanidin DNA saflaştırma protokol bileşenleri .....</i>	<i>40</i>
<i>Çizelge 4.7. Restriksiyon protokol bileşenleri.....</i>	<i>40</i>
<i>Çizelge 4.8. Ligasyon protokol bileşenleri .....</i>	<i>41</i>
<i>Çizelge 4.9. T7 PZR reaktifleri.....</i>	<i>42</i>
<i>Çizelge 4.10. T7 PZR Koşulları .....</i>	<i>42</i>
<i>Çizelge 4.11. T7 Primerleri ile Siklus PZR Koşulları .....</i>	<i>44</i>
<i>Çizelge 4.12. Stop Solusyon Reaktifleri.....</i>	<i>44</i>
<i>Çizelge 5.1. ASCT2 proteininin antijenik dizileri .....</i>	<i>57</i>
<i>Çizelge 5.2. Nanodrop ND-1000 RNA sonucu.....</i>	<i>59</i>
<i>Çizelge 5.3. PZR ürünü ve plazmitin enzim kesimi sonrası Nanodrop Sonuçları.....</i>	<i>61</i>
<i>Çizelge 5.4. ASCT2 ekstrasellür kısmının dizisi .....</i>	<i>67</i>
<i>Çizelge 5.5. Pepstat programı sonucu.....</i>	<i>67</i>
<i>Çizelge 5.6. BCA testi için hazırlanan standartların OD değerleri.....</i>	<i>69</i>
<i>Çizelge 5.7. Rekombinant proteinlerin miktarı.....</i>	<i>70</i>
<i>Çizelge 5.8. Serum (solda) ve ascites sıvısı (sağda) antikor titrasyon değerleri .....</i>	<i>70</i>
<i>Çizelge 5.9 ImageJ programı sonucu elde edilen excel dosyası.....</i>	<i>75</i>
<i>Çizelge 5.10. Antikor izotiplendirmesi sonucu spektrofotometrede ölçülen değerler .....</i>	<i>78</i>

## SİMGELER DİZİNİ

APS	Ammonium per sulfate
ASCT2	Nötral amino asit taşıyıcısı
cDNA	Komplementer DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
Fab	Fragment antigen binding
HAT	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine
HepG2	Human Liver Hepatocellular carcinoma
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
Ig	İmmüoglobulin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani broth
MCS	Multiple Cloning Site
mRNA	Mesajcı RNA
PEG	Polietilen glikol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TEMED	Tetramethylethylenediamine
sIgA	Salgısal İmmüoglobulin A
Slc1a5	Solute carrier family 1, member 5

## 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji alanında antikor üretim teknolojileri son yılların vazgeçilmez çalışmaları haline gelmiştir. Bilindiği üzere, antikorlar vücuda giren yabancı moleküllere karşı B hücreleri tarafından üretilen glikoprotein yapısında moleküllerdir. Bu yabancı moleküller antijen olarak adlandırılmaktadır. Antikorlar poliklonal ve monoklonal antikor olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Poliklonal, farklı B hücre klonlarının antijenin farklı epitoplarını tanıması için üretilen heterojenik bir karışımdan oluşan antikorlardır. Bu antikorlarıntanısal yöntemlerde kullanılabilir ve çok az miktarda hedef proteinlerini tanıyabilir olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak terapötik amaçlı kullanımlar için uygun değildir. Monoklonal antikor ise proteinin (antijenin) tek bir epitopunu tanıyan ve diğer proteinler ile çapraz reaksiyon vermeyen, tek bir B hücre klonunun ürettiği homojen bir karışımdan oluşan antikorlardır (1).

Biyoteknolojinin temeli olan Rekombinant DNA Teknolojisi, bir genomdaki binlerce gen arasından tek bir genin ayrıştırılmasını, tanımlanmasını ve bu genin klonlanmış DNA molekülü olarak büyük miktarlarda üretilmesini mümkün kılmaktadır. Antikorlar, enzimler, proteinler, antijenler ve daha bir çok biyolojik ürün bu teknoloji ile üretilmektedirler (2).

ASCT2 nötral amino asitlerin hücre içine girip çıkmasını kontrol eder. Glutaminin hücre içine alınmasında hücre zarı üzerinde taşıyıcı olarak görev alır. Kanserli hücrelerde, bazı hastalıkların patojenitesinde, spesifik dokularda normalden daha yüksek oranda ifade edildiği bilinmektedir (3). İlerleyen zamanlarda, ASCT2'nin sadece bir biyobelirteç olarak değil, terapötik olarak da kullanılabilme olasılığını düşündüğümüzde ASCT2 antikorunu teknolojisinin üzerinde durmak ve geliştirmenin önemli olabileceğini düşünülmektedir.

## **2. KURAMSAL TEMELLER**

Rekombinant DNA teknolojisi, verilen bir konaktan genleri tanımlamak, izole etmek, manipüle etmek, ve yeniden ifadelendirmek gibi amaçları olan bir teknolojidir. İlgili genin izole edilmesi ve çoğaltılması metoduna genin klonlanması denilmektedir. Klonlama ile ilgili gen bölgesini, canlı organizmalarda kendi kendine çoğalabilen vektör, plasmit ya da virus gibi taşıyıcılar içerisine sokarak rekombinant DNA oluşturulmuş olunur. Rekombinant DNA molekülleri prokaryotik ya da ökaryotik bir konak hücreye yerleştirilir. Konak hücrenin çoğalması ile birlikte hedeflenen gen bölgesini içine almış vektör de çoğalır. Böylece, konaktaki yabancıDNA molekülü sayıca artmış olur (4).

Bu teknoloji ile konak organizmaya girmiş iki farklı türden DNA moleküllerinin bir araya gelmesi ile tıpta, tarımda ve endüstride bir değeri olan yeni genetik kombinasyonlar üretilir. Bu şekilde kes-yapıştır teknolojisi olan yönteminin farklı amaçları olabilir. Bilinen gen ürünlerinin fonksiyonu ve regülasyonu ile ilgili temel anlayışlar geliştirmek, hücre içi genetik bozuklukları düzeltmek, hastalığa duyarlı konaklarda yabancı genler ifadelemek, geniş kullanımlar için çok miktarda protein üretmek rekombinant teknolojisinin amaçlarından bazılarıdır (4, 5).

### **2.1. Gen Transferi**

Gen transferi teknolojisinin önemi moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği alanında yapılan çalışmalar ile birlikte günden güne artmaktadır. Bu teknoloji sadece akademik araştırmalarda kullanılmamakta, aynı zamanda endüstriyel uygulamalarda giderek artan ve gelişen bir teknoloji ile yerini almaktadır. Rekombinant protein teknolojisi ile gen transferi yaparken dört temel adımdan geçilir (6, 7).

### **2.2. Gen İzolasyonu**

Hedeflenen gen bölgesini klonlamak için konak hücreden sekansın izole edilmesi gerekir. Toplam haberci RNA (mRNA) izolasyonundan sonra komplement DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilir. Bir diğer izolasyon yöntemi olarak gen kütüphanlerini kullanarak etiketlenmiş gen kopyası ve mRNA dizisine sahip olunursa, bütün genomdaki klonlar arasında araştırılan geni içeren klon saptanabilir (7).

## 2.3. Geni taşıyacak uygun araç

### 2.3.1. Vektörler

Kromozomdan bağımsız olarak, kendi kendini replike edebilen, çift sarmallı, halkasal DNA molekülüne plazmit denir. Plazmitler bakterilerin hayati fonksiyonları kontrol eden genler haricinde esansiyel olmayan genler içerirler. Genellikle bakterilerde bulunurlar; ancak çok nadir olarak *Saccharomyces cerevisiae* gibi ökaryotik hücrelerde de bulunabilirler. 1.000 ile 1.000.000 baz çifti uzunluğu arasında olabilirler. Bağımsız olarak hücre bölünmesinde kendisini eşleyebilir ve çoğalabilir ya da plazmit önce ana DNA'ya kaynaşabilir, sonra hücre bölünmesinde onunla birlikte çoğalabilir. Elbette bu kaynama sayesinde canlının özellikleri az ya da çok etkilenmektedir (8, 9).

Genetik biliminde kullanılan bu plazmitlere vektör adı verilir. İfadelenme, uygun genetik altyapıya sahip bir vektör kullanılarak tetiklenmektedir. Ekspresyon vektörlerinin genetik elementleri replikasyon orijini (ori), antibiyotik direnç belirteci, transkripsiyonel promotorlar, translasyon başlangıç bölgeleri (TIRs) ve transkripsiyonel ve translasyonel sonlandırıcılarıdır (10, 11).

Heterojenik protein üretilmesi için kullanılan sistemler arasından, gram- negatif bakteri *E.coli* ile çalışmak bir çok organizmaya göre avantajlıdır. Hızlı büyümesi, ucuz koşullarda yetiştirilmesi, genetik alt yapısının çözümlenmesi, klonlama vektörlerin rahatlıkla çoğalması ve mutant akrabalarının bulunması bu teknolojide kullanılma nedenlerindedir (10, 12).

En çok kullanılan plazmitlerden pBR322, ampisilin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı immün bölgeler içerirler. 6000 baz çiftine kadar DNA molekülünü taşıyabilirler. pET ekspresyon vektörleri de pBR322 plazmitinden türemiştir. Klonlama ve *E.coli*'de in vivo rekombinant protein ifadenmesi için yaygın olarak kullanılan ekspresyon vektörlerden bir tanesi de pET ekspresyon sistemleridir. Bu vektörlerin yaygın olarak kullanılma nedeni, T7 bakteriyofaj 10 genine sahip olmasıdır. Bu genin kodladığı T7 RNA polimeraz ile yüksek seviyede transkripsiyon ve translasyon yapılması tetiklenmektedir. pET vektörleri antibiyotik dirençlilik geni, lacI genine ve T7 promotor ve lac operatörüne sahiptir. Bu sistemde, ilgili bölgenin protein kodlayan kısmı T7 promotorunun ve *10 leader* dizisinin aşağı kısmına klonlanır ve *E. coli* suşlarına transforme edilir. T7 RNA



polimerazın *lacUV5* promotorundan ifade edildiği kromozom entegre kasetin isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ile indüklenmesi ile protein ifadenmesi sağlanır. Protein ifadenmesi için kullanılacak bir diğer yöntem polimeraz ifadeleyen bakteriyofaj lambda CE6 ile hücreyi enfekte etmektir. T7 RNA polimeraz suşlarda olmadığı için klonlanmış hedef genin bazal ifadenmesi oldukça düşüktür. IPTG, vektörde aktif T7 RNA polimeraz çalışmasının tetikleyerek, konağın RNA polimerazı ile transkripsiyon açısından yarışır. Böylece, hedef protein birkaç saat içerisinde hücre içerisindeki ifadenen proteinlerin çoğunu oluşturacaktır. Lac represör (LacI) T7 RNA polimerazın promotora gidip bağlanmasını engeller. İlgili genin proteine dönüşmesi için IPTG varlığında LacI'nın bağlı olduğu operatör DNA dizisinden düşer ve bunun yokluğunda, T7 RNA polimerazın T7 promotorunu tanması ile transkripsiyon başlar. Eğer bakteri orta log büyüme fazında indüklenirse ( $OD_{600nm}$  0.6-0.9), protein maksimum seviyede üretilebilecektir (14, 15, 16).

### **2.3.2. Virüsler**

En az tehlikeli ve en çok çalışılan virüs  $\gamma$  fajı kullanılabilir. 49 kb boyutunda çift iplikli bir yapıya sahiptir. Her iki ucunda da, 12 nükleotitlik complement diziler bulunur. Bu uçlar "cos" (yapışkan-cohesive) olarak isimlendirilir. Enfekte olmuş hücrede, cos bölgesi içerisinde DNA zinciri kopyalanır, faj içerisinde paketlenir (17).

### **2.3.3. Kozmidler**

Plazmitlerin ve fajların işe yarar kısımlarının hibrid oluşturması ile oluşturulmuş vektörlere kozmid denir. Kozmidler 25,000-35,000 bp arasında DNA dizisi kopyalamak için müsaittirler.  $\gamma$  fajlarındaki yapışkan uçlara (cos bölgelerine) sahiptirler.  $\gamma$  fajının cos bölgeleri pBR322 plazmitinin tet/r geni içerisine klonlanır. Amp/r geni içerisine bir şey girmemiştir. Yabancı DNA molekülü küçük parçalara kesilir ve cos bölgesinin içine aktarılır. Tetrasiklin duyarlılığı ve ampisilin dirençliliğine göre seçilirler (18).

### **2.3.4. İfadenme Vektörleri**

Replikasyon orijini, seçilebilir markör, çoğalabilir klonlama bölgelerine (MCS) sahip olurlar. İndüklenebilir promotora sahip olmaları nedeniyle MCS'nin aşağı bölgesine girmiş ilgili genin transkript oluşumunu ve translasyonunu sağlarlar (17).

## 2.4. Transformasyon

Transformasyon rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak hücre dışı uygulamalar ile hücre genotipine müdahale etme işlemidir. Kısaca, ekzogenik bir DNA molekülünün hücre içine alınıp hücre ile bütünleşmesidir. Transformasyonun ilk aşamasında 0 derecede yüksek konsantrasyonda katyonların varlığında ekzogenik DNA bakteri yüzeyine yapışır ve bağlanır. Sıcaklık 0°C'den 42°C'ye çıkarıldığında, hücre duvarından sitoplazmaya girer. Ekzogenik DNA, DNAaz' e karşı dirençli hale gelir. Sonunda içeri girmiş yabancı DNA molekülü, bakteride hayatını devam ettirebilmek için ya kendi başına kararlı bir replikon oluşturur ya dayerleşmiş replikon ile homolog rekombinasyon yapar.

Transformasyon işlemine başlamadan önce ilgilenilen gen bölgesi vektör ile ligaz enzimi aracılığıyla birleştirilir. Bu işleme ligasyon adı verilir. Genellikle nükleik asitler, örneğin plazmitler kendiliğinden bakteri hücrelerinin içine giremezler bunun için uyarıcı bir etki gereklidir. Bu yüzden transforme olacak hücre membranlarının düzenlenmesi, dışarıdan gelecek molekülleri hücre içine kolaylıkla alabilmeleri için kompetan hücre olmaları gerekir. Hücre,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , ya da  $Rb^{+}$  gibi katyonların herhangi biri ile muamele edildiğinde kompetan hale gelmektedir. Kompetan hücre hazırlamak için farklı metotlar vardır; kalsiyum klorür ( $CaCl_2$ ), rubidium klorür ( $RbCl$ ) ve transformasyon stoksolusyonu (TSS) metotları en çok bilinen ve kullanılan metotlardır. TSS çözeltisini kullanarak *E.coli* hücrelerini kompetan hale getirmek hem hızlı, hem kolay hem de yüksek oranda transformasyon verimliliği oluşturur. *E. coli*'nin hemen hemen tüm suşları TSS ile kompetan hale getirilebilir ve bu hücreler yıllarca verimliliğini kaybetmeden kararlı halde -80°C'de yaşayabilirler. TSS içerisinde Luria-Bertani (LB) broth, poli etilen glikol (PEG), dimetil sülfoksit (DMSO) ve Mg katyonları bulunur (19, 20).

## 2.5. Klonu içerisine almış hücrenin seçilmesi

Konak hücreye transforme edilmiş yabancı DNA molekülünü içeren vektöre sahip kolonileri, transforme olmamış kolonilerden ayırt edebilmek için vektör üzerinde bulunan antiyotik genleri ile seçicilik sağlanabilir. Bu genler sayesinde, vektörü almış koloniler antibiyotiğin içerisinde bulunduğu besiyerinde dirençlilik genine sahip olduğu için yaşarken, transforme olmamış kolonilerde antibiyotiğin dirençlilik geni olmadığı için o ortamda yaşayamazlar. Sonuç olarak dirençlilik genleri rekombinant genin konağa girip girmediğini görüntülemek amacıyla vektör üzerinde bulunurlar (21). İçeri alınan plazmitin

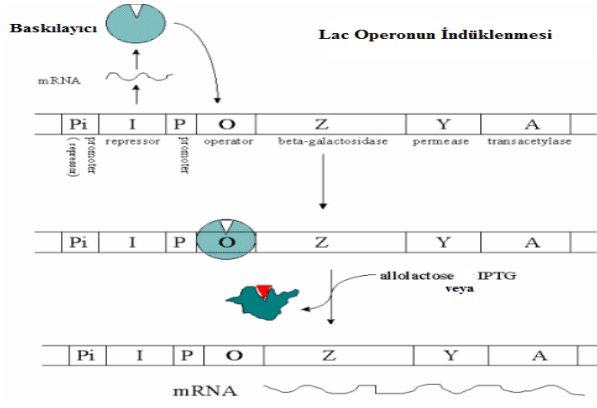
hedef gen dizisini içermeyebilir. Bunu anlamak için de Lac sistemi kullanılabilir ya da koloni polimeraz zincir reaksiyonu ile genin içeri girip girmediği kontrol edilir (4).

Antibiyotiklerin yaptığı antibakteriyel hareket bakteride dört farklı mekanizmaya etki eder. Hücre duvarı biyosentezinde, nükleik asit metabolizmasında ve tamirinde, protein sentezinde yer alan enzimlerin düzenlenmesini ya da inhibisyonunu sağlayarak antibakteriyel özellik kazanırlar. Rekombinant teknolojisinde en çok karşılaşılan antibiyotikler; ampisilin, tetrasiklin, kanamisin, neomisin, kloramfenikol'dür. Kanamisin 30S ribozomal alt ünitesine bağlanarak mRNA'nın yanlış okunmasına neden olur. Bu yanlış okuma anormal peptitlerin hücre içerisinde birikmesine ve sonunda bakteri hücrelerinin ölümüne neden olur (14). Aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir; *Streptomyces kanamyceticus* bakterisinden izole edilmiştir ve sülfatlı formunda kullanılır (22, 23).

## 2.6. Protein İfadesinin İndüklenmesi

*E. coli*'de lac operonunun düzenlenmesi gen ifadenmesinin transkripsiyon seviyesinde negatif olarak kontrolü için gerekli bir paradigmadır. Lac operonunun kontrolü diğer negatif olarak bakteriyel sistemlerin düzenlenmesine göre daha etkilidir. İndükleyici varlığında, Lac enzimleri 1000 kat artabilirken, gal operonu 20 kattan az indüklenir. Lac operonun baskılanması ile lac promotoruna RNA polimerazın bağlanmasını direk olarak engellenmiş olur. IPTG allolaktozu taklit eden bir moleküldür. Laktoz ise lac operonun transkripsiyonunu tetikleyen bir metabolittir. IPTG, yapısındaki sülfür atomu hücre tarafından hidrolize olmayankimyasal bir bağ yaratır. Böylece, hücre onu metabolit olarak kullanamaz, parçalayamaz ve IPTG konsantrasyonu sabit olarak kalır (24).

Lac operatör dizisinin önünde T7 promotorun yerine *E.coli*'nin RNA polimerazının bağlanabileceği lac promotor dizisi vardır. Promotorun önünde ise lac operonunu açılıp kapanmasını kontrol eden repressor bölgesi bulunur (Şekil 2.1.) (25). Laktoz yokluğunda, lacI operatör bölgeye bağlanır ve DNA'yı 40° bükür. Bu bükülme, T7 RNA polimerazın promotor bölgesine bağlanmasını engeller. Ortamda bulunan IPTG, lac represörüne bağlanır ve lac operatöründen tetramerik represörü çıkarır. Böylece lac operonunda genlerin (beta galaktosidaz gibi) transkripsiyonuna izin verilmiş olunur (26, 27).



**Şekil 2.1.** Lac operon

## 2.7. Protein Saflaştırılması

Proteinlerin hücre ve dokudan saf halde izole edilmesi oldukça önemlidir. Özellikle proteinin konsantrasyonu düşük ise hücre içerisindeki diğer proteinlerden ayırmak için ve saf halde elde etmek için saflaştırılacak proteine uygun yöntemin seçilmesi gerekir. Saflaştırmada farklı yöntemler kullanılmaktadır. Saf veya safa yakın protein eldesi için bu yöntemlerden bir veya birkaçı arka arkaya kullanılmaktadır (28, 29).

Proteinleri izole edebilmek için öncelikle yapılması gereken bazı adımlar vardır. İlk olarak, izole edilecek proteinin fazla miktarda üretilebileceği doku veya hücre grubu seçilir. Proteini fazla miktarda üretmiş hücre veya dokular uygun tampon çözeltiler ile homojenize edilir. Bu tampon çözelti hücre membranını ve nükleus membranını parçalar, böylece proteinler açığa çıkar. Tampon kullanılarak proteinin kimyasal yollarla açığa çıkması sağlanırken yüksek frekansta ses dalgaları etkisine bırakarak (sonikasyon) mekanik bir hücre parçalama yöntemi de ardından yapılabilir. Oluşan homojenat belirli hızlarda santrifüj edilir ve hücre partiküllerinden uzaklaştırılır. Sonunda protein karışımı içeren bir süpernatant oluşur ve bu süpernatant saflaştırma yöntemleri için başlangıç materyali olur (28, 29).

Protein saflaştırma yöntemlerini dört temel başlık ile incelemek mümkündür. Bunlar; kromatografik yöntemler, elektroforetik yöntemler, santrifüjasyon yöntemleri, diyaliz-ultrafiltrasyon yöntemleridir (30, 31). Affinite kromatografisi kromatografik yöntemlerin içerisinde saflaştırmada kullanılan en yaygın ve hızlı yöntemlerden bir tanesidir. Tek basamakta oldukça saf bir protein eldesi mümkündür. Bu yöntemde polisakkarit yapısındaki koenzim bağlı agaroz tanecikleri kolon dolgu maddesi olarak kullanılır.

Üretilirken proteinin uç kısımlarına tasarlanan enzim proteinleri, protein karışımı kolona uygulandığında agaroz taneciklerindeki koenzimin serbest ucuna spesifik olarak bağlanır. Protein süpernatantında diğer proteinler koenzim serbest ucuna bağlanma özelliğine sahip değildir bu yüzden kolondan uzaklaşırlar. Hedef proteini kolondan almak için sistemdeki ile aynı ancak daha yoğun konsantrasyonda serbest koenzim içeren bir çözelti kolona ilave edilir. Kolondaki entegre koenzim ile çözültideki koenzim arasındaki rekabetten dolayı proteinler ilave edilen çözeltideki koenzime bağlanarak kolondan alınır. Sonuç olarak, koenzime spesifik olan enzim proteini diğer proteinlerden tek bir basamakta saflaştırılır (32).

Affinite kromatografisinde en çok tercih edilen sistem hareketsiz metal affinite kromatografisi (IMAC)'dir. IMAC sisteminde, agaroz matriks üzerinde hareketsiz olarak duran geçiş metalleri ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) ile histidin işaretli hedef protein arasında bağlar oluşur. Histidin bu metal iyonları ile en güçlü bağı oluşturacak bir amino asittir. Histidin-imidazol çemberinde, elektron verici gruplar sayesinde nikel ile koordinasyon bağları oluşur. Bu şekilde purifiye edilecek protein kolona tutunur ve histidin ile yarışacak olan yüksek konsantrasyonda imidazol ile muamele edilir. Hedef protein tekaşamada elde edilmiş olur. Elde edilen protein hiçbir zaman % 100 saf değildir. Bu yüzden, kolondan sonra tuzlardan arındırmak için 'desalting' işlemi yapılır. Desalting yapmak için molekül büyüklüğüne göre (size exclusion) kromatografi, dializ-ultrafiltrasyon ve tampon değişimi gibi farklı teknikler vardır. Desalting işlemi proteinin sadece tuzdan değil, deterjan, nükleotit ve lipit gibi diğer yabancı maddelerden de uzaklaştırılmasını sağlar (32, 33).

## **2.8. Amino Asit Taşıyıcı Tip2 Protein (ASCT2)**

### **2.8.1. ASCT2 Fonksiyonu**

Anti sistem ASC amino asit taşıyıcı 2 (ASCT2) 541 amino asitten oluşan 10 tane polipeptit zincirinin membranın içerisine gömülü olduğu bir transmembran proteindir. Hücre zarı üzerindeki sodyum iyonları aracılığı ile nötral amino asitlerin hücre içine alınmasında görev alan taşıyıcı bir proteindir. Substrat özelliklerine bağlı olarak amino asitlerin hücre içine girmesini sağlayan farklı sistemler vardır. Dört ana amino asit taşıyıcı sistem tarafından hücre içine taşınmaktadır. Bu dört taşıma sistemleri A, ASC, N ve sodyum

independent L'dir. Bu taşıyıcıların aktif olarak çalışması doku çeşidine ve bu reseptörlerin farklı amino asitleri alma eğilimine bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (34, 35).

ASC sistemine ait ASCT2 alanin, serin, treonin, sistein, metiyonin, asparjin ve glutamin nötral amino asitlerini sodyum iyonuna bağlı olarak hücre içine alınmasını sağlar. Hücre içine glutamin alımının artması için bu amino asiti içeri alan taşıyıcı proteinlerin aktivasyonu gerçekleşir. İnsan tümör hücrelerinde yaygın olarak ifade edilen amino asit taşıyıcısı ASC sistemlerinden oluşur (35,36). ASCT2 sadece nötral amino asitleri değil dallı zincirli aromatik amino asitleridesubstrat olarak kullanılmaktadır. Feline endojenik virüs RD114, baboon M7 endojenik virüs ve tip D simian retrovirüsler için viral hücre yüzey reseptörü olarak görev alırlar (37,38). ASCT2 mTORC1 sinyal yolağının çalışmasına ve otofajinin baskılanmasına yardımcı olur. ASCT2, sodium bağlı amino asit transporter 2, adiposity amino asit transporter, AAAT, nötral amino asit transporter B, ATB, amino asit transporter B<sup>o</sup>, ATB<sup>o</sup>, ATBO, baboon M7 virüs reseptör, M7V1, M7VS1, insulin-aktive amino asit transporter, FLJ31068, RD114 virüs reseptör, RD114/simian tip D retrovirüs reseptör, RDR, RDRC, ya da R16 olarakta bilinmektedir (39, 40).

ASCT2, solute carrier family 1 protein ailesine ait 5. üye olarakta bilinmektedir (SLC1A5). Expressed sequence tag (EST) veri tabanı kullanarak yapılan çalışmalarda, kanserli dokularda ASCT2 ya da SLC1A5, SLC7A5 ve SLC38A5 ifadelerinin önemli oranda arttığı gözlenmiştir. Normal karaciğer dokuya göre hepatoblastoma ya da hepatosellüle kanser karaciğer dokusundaki SLC1A5 ifade düzeyi çok miktarda arttığı kanıtlanmıştır. Hepatoma hücreleri normal karaciğer hücrelerine nazaran daha fazla glutamin taşır ve kullanırlar. Bu yüzden, bir çok kanser hücre hattında bu transporter kullanılmaktadır (41,42). Tümör hücrelerinin gelişimi için de glutamin önemli bir kaynaktır. Bungard ve Mcgivan grubu hepatoma hücre hattı HepG2 ASCT2 promotörünün ifadeleneşinin ve aktivitesinin glutamine bağlı olduğunu göstermişlerdir (3). Sonuç olarak, hepatoma hücrelerinde ASCT2 promotör aktivitesi ve ASCT2 proteinin ifadeleneşmesi ortamdaki glutamin varlığına bağlı olarak düzenlenmektedir (23, 24).

Kolorektal ve prostat kanser dokularında immunohistolajik boyamalarda ve westerb blot analizlerinde, ASCT2 ifade düzeyleri çok yüksek saptanmıştır. Yapılan çalışmalar ASCT2'nin, kolorektal kanser, karaciğer kanseri, göğüs kanseri, astrositom, nöroblastomların bazı hücre hatlarında glutamini içeri alan protein olarak çalıştığını göstermiştir. ASCT2 proteini glutaminin hücre içine alınmasında görev alan önemli bir

transporter olduğu için glutaminile ilgili çalışmalarda ASCT2 önemli bir hedef molekül olabilir. Son yıllarda, özellikle USA'da nüfusun büyük bir çoğunluğunda görülen obezite üzerinde yapılan araştırmalar çok yönlülük kazanmıştır. Obez insan ve hayvanların plazmalarında dolaşan amino asit seviyeleri karşılaştırıldığında diğer amino asitlerin plazma seviyeleri obez grubunda daha yüksek çıksa da, özellikle dallı zincirli amino asitlerin (BCAA; lösin, izolösin ve valin) ve glutamin plazma seviyelerinin obezlerde çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (43-45). Glutaminin adipositlerde insulin dirençliliğinin gelişmesinde rol aldığı ancak diğer hücrelerde (L6 kas hücreleri gibi) böyle bir görevinin olmadığı yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Tip 2 diyabetin geliştiği obez farelerin adipoz dokularında glutaminin hücre içine daha fazla girdiği tespit edilmiştir (46).

### **2.8.2. ASCT2 özellikleri**

İnsanda ASCT2 geni 19. kromzomun q13.32 kolunda yer almaktadır. Sodyum: dikarboksilat (SDF) simporter ailesinin SLC1A5 alt grubuna aittir. Proteini 541 amino asitten oluşmaktadır. 165. ve 228. amino asitlerde glikolizasyon olmaktadır. Endojenik ASCT2'nin moleküler ağırlığı 50-60 kDa iken, glikolizeolmuş ASCT2 70-80 kDa olarak ölçülmüştür (47).

### **2.8.3. Glutamin**

Glutamin amino asitler içerisinde vucutta en çok bulunan amino asittir ve esansiyel nitrojen vericisidir (48). Glutamin kas gelişiminde, böbrekte amonyum üretilirken asit-baz dengesinin düzenlenmesinde, karaciğer üreogenesisinde, hepatik (karaciğer) ve renal (böbrek) glikoneojenezde substrat olarak kullanılan, glutatyon üretiminde esas olarak görev yapan nükleik asit ve protein sentezinde fonksiyonları olan bir amino asittir<sup>49</sup>. Enterosit, fibroblast, lenfosit ve kanser hücreleri gibi hızlı bölünen hücrelerin bir özelliği de hücre içine yüksek oranda glutamin alımı gerçekleştirmeleridir. Bu amino grup asit nörotransmitter öncüsü olarak, hücre proliferasyonunda, özellikle kanserli hücrelerin çoğalmasında görev almaktadır (42). Glutamin metabolizmasının önemli olabileceğinin düşünöldüğü ve iddia edildiği bazı hastalıklar vardır. Aşağıda bu hastalıklardan bazıları bahsedilmektedir.

### **2.8.3.1. Obezite ve İnsülin Hareketinin Düzenlenmesinde Rolü**

Adipoz doku enerji hemoztazisinin önemli bir düzenleyicisi ve insülin dirençliliğinin gelişiminde rol oynaması özelliği ile bilinmektedir (50, 51). Adipoz dokuda inflamasyon oluşumu, insülin dirençliliği gelişiminde en önemli faktörlerden biri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (52, 53). Kandaki şekerin metabolik sağlığı etkilediği bilinmekle beraber, obezite, tip2 diyabet gibi hastalıklarda insülin durumunun değişen yağ asitleri ve amino asitleri metabolizması arasında bağlantılar olduğu görülmüştür. Yapılan bir çalışmada obez çocuklarda kanda yüksek dallı zincirli amino asitler (BCAA, lösin, valin, izölösün) seviyeleri ve glutamin gözlenmiştir (54). Obez insanlarda ve hayvan modellerinde BCAA ve glutaminkonsantrasyonu normal olanlara göre daha fazladır (45, 55).

### **2.8.3.2. Kanserli Hücrelerin Glutamin Bağımlılığı**

Otto Warburg kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla daha fazla glikoz alma ve daha çok laktik asit üretme eğiliminde olduğunu kanıtlamıştır. Glikoz alımının onkogenik aktivasyonu Warburg Etki'nin nedeni olarak gösterilir (56,57). Bilindiği üzere kanser hücreleri glikozu ve glutamini alır ve anabolik makromoleküler sentezinde metabolize ederler. Tirozin kinaz reseptörü ya da Ras ve PI3K-Akt sinyal yolları ile başlayan yaygın olan onkogenik sinyal iletim yolları glikolitik metabolizmayı uyarır (58). Myc glutamin metabolizmasında görev alan bazı genlerin ifade edilmesini tetikler. Örneğin, Myc transkripsiyon faktörü glutamin taşıyıcıları ASCT2 (SLC1A5) ve SLC7A5, ifadenmesini artırabilir. Myc aktivasyonu glutamin alımını kolaylaştırmasının yanı sıra, glutaminin glutamik asit ve sonunda laktik asite metabolize olmasına yardım eder (59).

## **2.9. Antikor Teknolojisi**

### **2.9.1. İmmun Sistem**

Hayvan ve insan gibi canlı varlıklarda enfeksiyonlardan ve toksitelerden korunmak için geliştirilmiş biyolojik savunma sistemlerine immün sistem(lat. immunis, dokunulmaz, hür, temiz anlamında)denir. Bu sistem yabancı hücrelerin, virüslerin ya da makro moleküllerin vücuda yerleştikten sonra nötralizasyonu için evrimleşmiştir. İmmun sistemin kullandığı doğal bağışıklık (non spesifik) ve edinsel bağışıklık (spesifik) olmak üzere iki ana savunma



sistemi vardır. Vücuda ilk defa giren yabancı moleküllere öncelikle doğal bağışıklık hücreleri saldırırlar. Doğal bağışıklık çok eski bir immün sistem olup tüm vertebralarda görülür ve türler arasında korunmuştur. Bu bağışıklıkta önceden oluşmuş olan proteinler ve hazırda var olan hücreler kullanılmakta ve immün savunmanın ilk basamağı olan erken yanıt oluşturulmaktadır. Doğal immunitede ilk bariyerler deri, müköz membranlar ve deri-müköz membran sekresyon tabakalarıdır. İkinci bariyer immün sistemde monosit, makrofaj, dendritik hücre, doğal katil hücre (NK), eozinofil, bazofil, nötrofil ve mast hücreleri etkili olmaktadır. Edinsel bağışıklık ise hücre yüzey reseptörlerini sentezleyen ya da yabancı moleküllere karşı protein salgılayan lenfositler tarafından kontrol edilir. İki bağışıklık sisteminde; doğal immün sistemde tekrarlanmış bir yanıt oluşturulmazken edinsel bağışıklık sistemi özellikli moleküllere karşı hareket eder ve sürekli bir yanıt vardır (60).

İmmün sistemde çok temel bazı terimler karıştırılmaktadır. Örneğin; bağışıklık sisteminde uygun antijene tetikleyen moleküle immunojen denir. Antijen ve immunojen bir molekülün farklı özelliklerini göstermektedir. İmmunojenite, herhangi bir molekülün sadece içe yönelik özelliği değil aynı zamanda uygun cevabı tetiklemesi olarak tanımlanır. Antijenite ise antikora bağlanabilme yeteneğinin olması olarak bilinir. Bir diğer örnek olarak immunoglobulin ile antikor isimleri terimsel olarak aynı gibi görülmekte, antikor bilinen bir antijene bağlanan moleküldür. İmmunoglobulinde ise hedeflenen bağlanmanın gerçekleşip gerçekleşmesine bakılmayan bir grup proteinden oluşur (60).

### **2.9.2. Antikorlar**

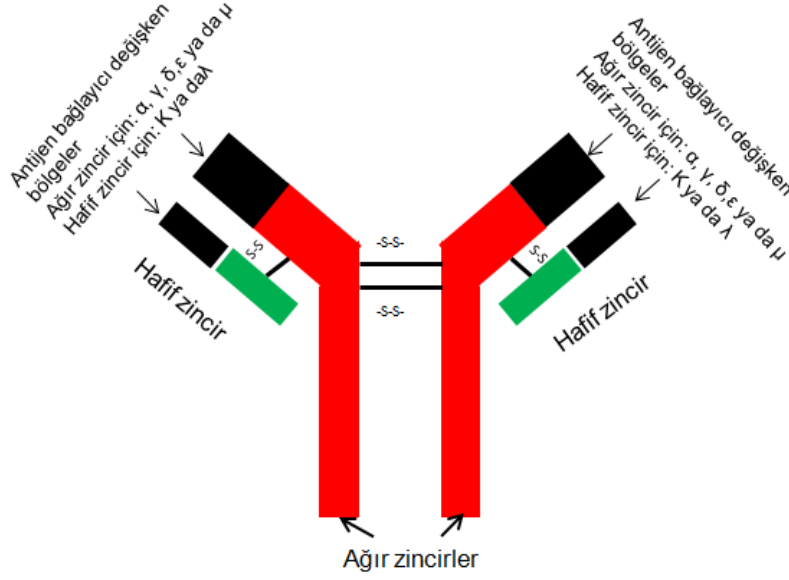
Antikorlar vücuda yabancı moleküller girdiğinde onlara yanıt oluşturan konak tarafından üretilmiş proteinlerdir. Önemli yapısal ve fonksiyonel özellikleri olan glikoprotein ailesi içerisindeki proteinlerdir. Fonksiyonel açıdan, antikorlar antijenlere, özelleşmiş hücelere ve bağışıklık sistemindeki bazı proteinlere bağlanarak karakterize olurlar. Bu karakterizasyon savunma sisteminin askerlerinden B hücreleri tarafından yapılır. Her patojene karşı özel bir antikor üretilmesi için B hücrelerinin milyonlarca antikor üretme kapasitesi vardır. Vücudun yaklaşık olarak 100 milyon farklı antikor üretebileceği tahmin edilir. Bu kadar çeşitli antikor yapılması immünoglobulin genlerinin değişik kombinasyonlarda düzenlenmesinde saklıdır. Antikorlar antijenlere, özelleşmiş bazı hücelere ya da immün sistemin proteinlerine bağlanma yeteğine sahip moleküllerdir. Vücuda giren yabancı antijenler öncelikle makrofajlar gibi antijen sunan hücreler tarafından fagositoz yolu ile hücre içine alınırlar. Bu tip hücrelerin içine giren antijenler

küçük parçalara ayrıştırılırlar. Antijen fragmanlarının her biri bu hücrelerin yüzeğinde bulunan MHC (major histocompatibility complex) class II glikoproteinleri aracılığı ile T yardımcı hücrelerine ya da direk B hücrelerine sunulurlar. Bu şekilde B hücrelerinin antikor sentezlemesi başlamış olur (1).

### **2.9.3. Antikor Yapısı**

Antikorlar Y şeklinde yapıya sahiptirler. Bu yapıyı üç tane protein domaininden ikisi özdeş olup, Y yapısının kollarını oluştururlar. Her bir kol, antijene bağlanma bölgesine sahiptir. Gövde kısmı ise immun yanıtın oluşmasında önemlidir. Bu üç protein kısmı birbirinden proteaz papain muamelesiyle ayrılır. Antijen bağlanma bölgelerini içeren iki kısım Fab fragman olarak isimlendirilirken, bağışıklığın düzenlenmesinde yer alan gövde kısmı Fc fragmanı olarak tanımlanır. Fab ve Fc fragmanları arasında kalan bölgeye ise hinge denir. Bu kısım iki antijen bağlanma bölgesine hareketliliği verir. Bu şekilde hareketlilik antijene bağlanma bölgelerinin farklı antijen konformasyonları ile kompleks oluşturabileceğinin kanıtıdır (1).

Her bir immünglobülin ikisi hafif diğer ikisi ağır olmak üzere dört tane polipeptit zincirinden oluşur. Hafif zincir 25 kDa, ağır zincir 55 kDa ağırlığında olup birbirlerine disülfid bağları ile, her bir ağır zincirde yine kendi aralarında disülfid bağı ile bağlıdır (Şekil 2.2. ). Antikorların ağır polipeptit zincirlerine göre 5 farklı çeşiti vardır ; IgG, IgM, IgA, IgE, ve IgD. Bu antikor sınıfları ağır zincir çeşitlerine göre ve buldukları bölgeye göre sınıflandırılırlar. IgG moleküllerinin ağır zincirleri  $\gamma$ -zincirlerinden, IgM molekülleri  $\mu$ -zincirlerinden, IgA'ler  $\alpha$ -zincirlerinden, IgE'ler  $\epsilon$ -zincirlerinden, IgD'ler ise  $\delta$ -zincirlerinden oluşur. Zincirlerdeki bu farklılıklar immun yanıtlar esnasında ya da olgunlaşmasında farklı fonksiyonlar gösterirler (1).



**Şekil 2.2.** Antikor Yapısı

#### 2.9.4. Sentezlenmesi

Yabancı antijen molekülünün vücuda girmesi ile makrofajlar, T ve B lenfositleri arasındaki iletişim sayesinde antikor cevabı oluşmaktadır. Ig moleküllerinin immun yanıt oluşumunda çok fazla antijene karşı spesifik olarak nasıl sentezlendikleri araştırmacıları uzun yıllardan beri meşgul etmektedir. Antikor sentezinin nasıl gerçekleştiği konusunda bugüne kadar ileri sürülen hipotezler vardır (61). Bunlar;

##### 2.9.4.1. Yan Zincir Teorisi

Ehrlich isimli bir fizikçi tarafından 1897 yılında ileri sürülmüştür. Artık geçerliliği yoktur. Bu teoriye göre hücrelerin besinleri içine alabilmesi için her çeşit besin maddesine göre reseptörleri vardır. Antijenler tesadüfi olarak bu reseptörler ile uyum içinde olduklarında onlarla birleşirler. Reseptörün fonksiyonu bu birleşme ile bozulur. Sonucunda hücrenin beslenmesi bozulur ve hücre hayatta kalabilmek için çok sayıda reseptör üretmeye başlar. Bunların fazlası dolaşıma geçerek antikor ismini alırlar (61).

##### 2.9.4.2. Kalıp Teori

Brienl, Mudd ve F. Haurowitz bilim insanları tarafından ortaya atılmış bir teoridir. Bu teoriye göre, yabancı antijen molekülleri organizmaya girdiklerinde antikorların sentezlendiği bölgeye doğru göç ederler. Antijen bir kalıp gibi kullanılır ve antijenin

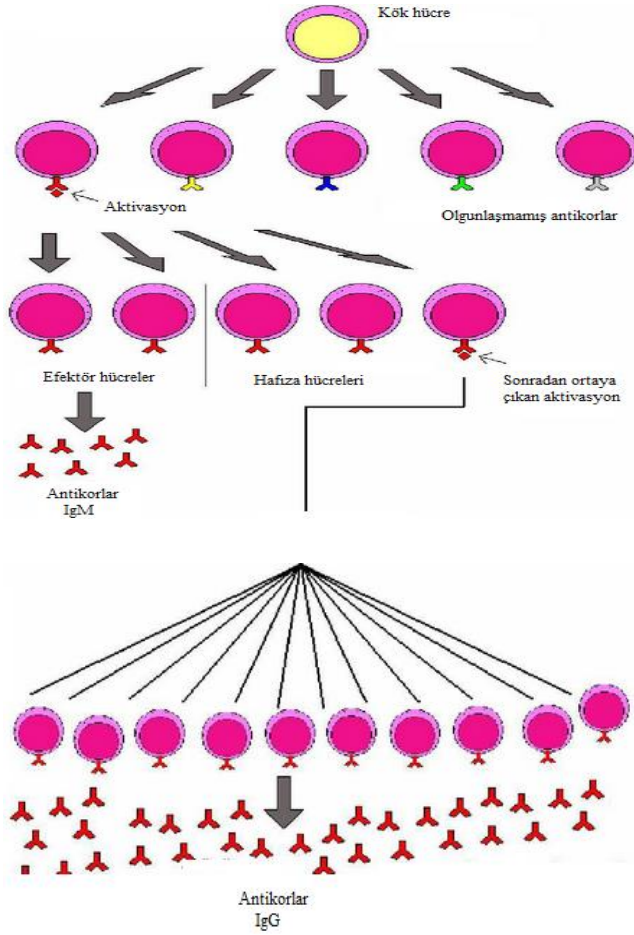
bağlandığı bölgelere özel antikorun amino asit dizilişi, ona göre şekillenir. Uygun Ig sentezi için, antijenin bazı kısımları hücrede kalır. Böylece özgül antikorlar sentezlenir. Ancak yapılan çalışmalarda Ig sentezleyen hücrelerde antijene rastlamadıkları için bu teoride geçerliliğini yitirmiştir (61).

#### **2.9.4.3. Öğretici Teori**

Bu teoriye göre, antikorlar hayvan serumu içerisinde kısa bir süre içerisinde yabancı antijenlere karşı spesifik bir şekilde sentezlenebilirler. Bu kadar kısa zamanda üretilmelerinden dolayı teori bu ismi almıştır. Antikorlar üç boyutlu yapısını ve işlevini antijene özgü alırlar. Anahtar- kilit uyumu gözlenir. Antikorun denature olup, tekrar kendisinin katlanması antikorun yapı ve işlevini tekrardan kazandıramayacağı bu teorinin savunduğu hipotezdir. C. Anfinsen ise bu teorinin aksine bir ribonüklez'ın yapısının açılıp kapanmasının antijen varlığında tekrar eski haline gelebildiğini göstermiştir. Bu teorinin de geçerliliği yoktur (61).

#### **2.9.4.4. Klonal Seçim Teorisi**

Jerne ve Burnet'in ortaya attığı günümüzde halen destek gören bir teoridir. Buna göre, bir ya da benzer bir grup antijen immun cevap verebilen hücrelerle birleşir. Bu sebepten, her canlıda, antijene yanıt verebilecek her tip lenfositin çok sayıda bulunduğu kabul edilmektedir. Antijenin organizmaya girmesi ile kendisine uyan B hücresi ile karşılaşır ve onu uyarırlar. Bu uyarı sadece ona spesifik olarak gelişir ve lenfositler hızla çoğalmaya başlar. Spesifik bir antijene karşı özgül antikor sentezleyebilen hücre kolonisi oluşur. Bu teorinin eksik tarafı, lenfosit yüzeylerindeki Ig reseptör farklılığının nasıl gerçekleştiğini açıklayamamasıdır (Şekil 2.3.) (61,62).



Şekil 2.3. Klonal Seçim Teorisi

#### 2.9.4.5. Somatik Rekombinasyon

1976 yılında Japon bilim adamı S. Tonevega milyonlarca antikor üretiminin genetik olarak nasıl mümkün olabileceği konusunda bazı çalışmalar yapmıştır. Araştırmasında, fare embriyo hücrelerinde antikor değişken (V) ve sabit (C) bölgelerinin genlerinin birbirinden uzak, antikor sentezleyen plazma hücrelerinde bu genlerin yan yana olduğunu göstermiştir. Antijene bağlanan değişken bölgeye ait çok sayıda gen bölgesi varken, sabit bölge için ise az sayıda gen bölgesi bulunmuştur. B lenfositlerinin gelişme süresince değişken bölgelerderekombinasyon ve mutasyon yolu ile milyonlarca çeşit antijenin bağlanabileceği DNA dizilimleri oluşmaktadır (61).

#### 2.9.5. Antikor Sınıflandırması

Antikorlarda beş çeşit ağır zincir sabit bölgesi vardır. Bunlar, ağır zincirin sabit bölgesine göre IgG, IgM, IgA, IgD, ve IgE olarak isimlendirilen ve vücutta farklı görevleri olan

izotipleridir. IgG molekülleri gamma ağır zincir yapılarına, IgM'ler mu, IgA'lar alfa, IgE'ler epsilon ve IgD'ler delta zincirlerine sahiptirler. Beş farklı ağır zincir çeşiti var iken, kappa ve lambda olmak üzere sadece iki çeşit hafif zincir bulunmaktadır. İmmunoglobulin G izotipinin bazı alt grupları da vardır. Örneğin bu alt gruplar insan ve farede farklılıklar göstermektedir. İnsan IgG dört farklı alt gruba sahiptir: IgG1, IgG2, IgG3, ve IgG4. Fare IgG'nin ise IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3 olmak üzere dört alt grubu vardır (1,63).

### **IgG**

Y harfi şeklinde olup, monomer yapıdadır. Bu immunoglobulin plazma B hücreleri tarafından sentezlenir. Plasenta yoluyla anneden fetüse geçen tek Ig'dir. Doğumun ilk haftasında bebeği enfeksiyonlardan korumada ve bağışıklık sisteminin güçlenmesinde yardımcı olur. Bebeğin kendi özgül immunoglobülinlerini üretmesi doğum ile başlar ve iki yaşına kadar devam eder (1).

### **IgM**

Ig'ler arasında en büyük ağırlığa sahip makroglobulindir. Beş temel IgG molekülünü benzeyen yapının birbirlerine disülfid bağları ile bağlanması ile oluşan yıldız benzer bir yapısı vardır. Antijen uyarımına karşı ilk sentezlenen ama yarı ömrü kısa olan bir moleküldür. Kısa ömürlü bir antikor olduğundan serumda kısa bir süre sonra miktar olarak azalır ve IgG molekülü görevi üstlenir (1).

### **IgA**

Genel yapısı IgG molekülüne benzer ve iki monomerin birbirine J bağlayıcı polipeptit zinciri ile bağlanması sonucu dimer yapısındadır. Gözyaşı, tükürük, solunum, sindirim, ve genital sistem salgıları ve sütte bulunur. Sekretuar dokularda mukoza altındaki plazma hücreleri tarafından salgılanırlar ve salgısal parça ile epitel hücrelerince birleştirilirler. Bu yüzden salgısal IgA ismini de alırlar. Dışarıdan giren mikroorganizmaların mukozayı istila etmelerine, o bölgeye yerleşmelerine ve enfeksiyon oluşmasına sIgA molekülleri engel olur. Besin olarak alınan zararlı makromoleküller ile kompleks oluşturarak emilimini engellerler (1).

## **IgD**

Serumda az miktarda vardır ve görevi tam olarak bilinmemektedir. Bir hipoteze göre B hücrelerinin farklılaşmasında görev alırlar. Çoğunlukla B lenfositlerinin yüzeyinde bulunur ve antikor üretilmesini tetiklemesi ile bilinir. Isı ve proteolitik enzimler ile kolayca degrades olabilen immunoglobülin çeşididir (1).

## **IgE**

Serumda en az miktarda bulunan Ig'dir. Fc bölgesinin mast hücrelerine ve bazofil lökositlere bağlanabilmesi bu antikorun en belirgin özelliğidir. Parazitik Helmin enfeksiyonları, astım, saman nezlesi ve alerjik durumlarında bu antikorun üretim seviyesi artar (1).

### **2.10. Poliklonal Antikorlar**

Antijene karşı immun yanıtın oluşması antijen üzerindeki spesifik epitopu hedef alan B hücrelerinin aktivasyonu ile olur. Serumunda farklı bağlanma özelliklerine sahip heterojenik bir antikor kompleksi oluşur. Böylece antijenin üzerindeki farklı epitopları tanıyan farklı antikorların üretilmesi ile farklı klon B hücreleri meydana gelir. Çok sayıda klon, tek bir antijen için çok sayıda işaretleme olanağı sağlar. Bir antijen üzerinde birden fazla epitop tanıyan antikorlara poliklonal antikor denir. Poliklonal antikorlar genel olarak IgG, IgM ve IgA antikor izotiplerini içerirler. Poliklonal antikorlar immunopresipitasyon, histokimya, ELISA, hastalıkların teşhisi, immunoturbidimetrik metotlar, western blot tekniği, bioçip teknolojisi alanlarında araştıma amaçlı kullanılabilen genişçaplı amaçları olan antikorlardır. Monoklonal antikor üretimine göre hem daha çabuk hem de daha ucuz bir yöntemdir. Poliklonal antikorların bazı dezavantajları da vardır. Örneğin, çok fazla spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleştirerek herhangi bir antijen üzerindeki farklı epitoplara bağlanarak antijeni tanıyabilirler. Bu özelliği ile tanınması mümkün olmayan antijenlerin tanıyabilirler. Poliklonal antikorlar çapraz tepkime ve düşük özgünlük gibi dezavantajlara da sahiplerdir (64).

Antikor üretiminde serum, ascites sıvı ve hibridoma hücrelerin supernatantları kullanılır. Serum yaygın olarak poliklonal antikor üretiminde kullanılır. Hibridoma supernatantı ise monoklonal antikor üretimi için kullanılır. Ascites sıvısı ise hem poliklonal hem de

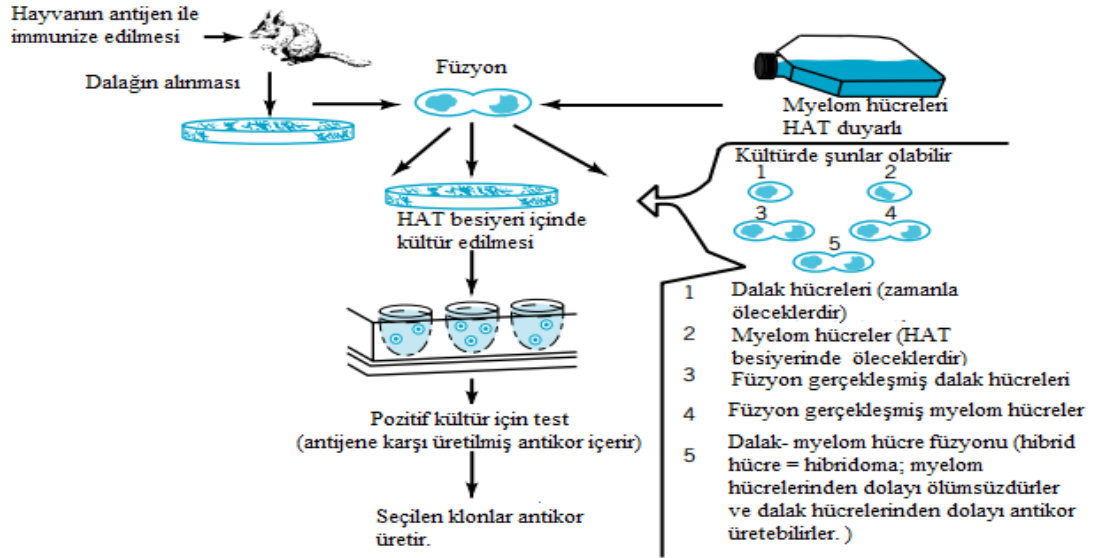
monoklonal antikor üretiminde kullanılabilir. Ascites sıvısı, peritoneal tümörden gelişen farenden alınan intraperitoneal sıvıdır (1).

Genellikle, laboratuvarlarda poliklonal antikor üretimi için tavşan kullanılır. Çünkü tavşan, fareye göre daha çok miktarda serum içerir. Bu yüzden farenden poliklonal antikor çok miktarda toplamak oldukça zordur. Harlow ve Lane farenden poliklonal antikor üretimini mümkün olup olmadığını tartışmışlardır ancak ayrıntılı bir yöntem oluşturamamışlardır (1,60). Harlow ve ekibi, farenden yüksek miktarlarda poliklonal antikor üretebilecekleri basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde göre, immunize olmuş fareler arzu edilen antikor içeren ascites sıvısını üretmek için tetiklenebilirler. Böylece, serumdan elde edilen düşük miktardaki antikor eldesinden kurtulunur. Tek bir immunize edilmiş farenden 5-15 ml arasında ascites sıvısı alabildiklerini göstermişlerdir. Üretilen antikorlar iyi titrasyona sahipse, bu antikorlar bir çok amaç için yeterli olmaktadır. Antijen miktarın kısıtlı olmadığına, antikor miktarını artırmak ve fareler arasındaki varyasyonu minimize etmek için aynı anda birkaç fare immunize edilebilir (1).

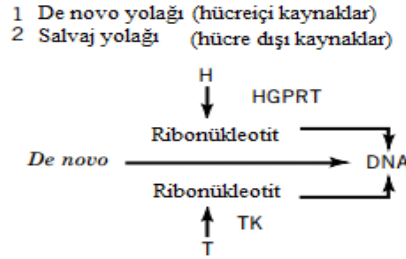
## **2.11. Monoklonal Antikorlar**

Monoklonal antikor, antijenin tek bir epitopunu tanıyan tek bir B hücresi klonunda üretilmiş tek bir antikora monoklonal antikor denir. Laboratuvarlarda monoklonal antikor üretimi ilk kez Georges Kohler ve Cesar Milstein tarafından gerçekleştirildi, 1984 yılında Nobel ödülüne layık görüldüler (65). Bu protokolda ilk olarak bir antijen ile farenin immunizasyonu gerçekleştirilmiştir. Antikor üretmeye başladığında immunize olmuş farenin dalağı alınır. B hücreleri hücre kültüründe sonsuz bölünemeyecekleri için, sonsuz bölünmelerini sağlayacak olan myelom tumor hücreleri ile kaynaştırılır ve ortaya çıkan hücrelere hibridoma denir. Bu hücreler tek tip bir hibridoma hücresinden çıkacakları için onların ürettiği antikorlara da monoklonal antikor denilir. Antikor üretebilen hibridoma hücre popülasyonu 24 ya da 48 well plakelere klonlanır. Daha sonra, klon seçimi gerçekleştirmek için ELISA yapılır. Seçilen klonlar besiyeri içerisine supernatant salgılar ya da üretilen bu supernatantlar farenin peritoneal boşluğuna enjekte edilir. Oluşacak olan ascites sıvısı monoklonal antikorca zengindir (1,65). Poliklonal antikorların yeterince saf ve yoğun olmadığı ve yan etkisinin fazla olabileceği düşünülürse, monoklonal antikorların spesifik olarak hareket etmeleri onları tıpta tedavi amaçlı daha kullanılabilir ve daha zararsız kılmaktadır (66).





#### HÜCRESEL DNA SENTEZİ



**Şekil 2.4.** Monoklonal Antikor Üretimi

Teoride, myeloma hücresi ile antikor salgılayan hücre arasındaki füzyon aracı bir molekül ile gerçekleştirilir. Pratikte, polietilen glikol (PEG) aracılığı ile füzyon sağlanır. Pontecorvo (1975) tarafından ilk defa memeli hücreler için PEG kullanılmış olup, başarılı bir füzyon gerçekleştirilmiştir. PEG sayesinde myelom hücresi ile B hücrelerinin hücre zarları kaynaşıp bir hücre içerisinde iki veya daha fazla çekirdeğin olduğu hibridoma hücresi oluşmuş olur. Mitozdan önceki aşamada çekirdek zarlarının erimesine kadar bu heterokaryon yapı kalır. Mitoz esnasında ve sonrasındaki bölünmelerde, kromozomlar küçük hücrelere ayrılırlar. Burada fonksiyonel immunoglobulin genlerini taşıyan kromozomlar kaybolursa, antikor üretimi duracaktır. Bu genlerin yaşadığı ortamı oluşturup, füzyon olmayan ölümsüz myelom hücrelerinden kurtulmak için ilaç kullanılır (67). Myelom hücrelerinde pürin nükleotit biyosentezinde salvaj yolağındaki enzimlerden bir tanesinde mutasyon görülmektedir. Bu mutasyon hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT) geni üzerindedir. HPRT enzimi pürinleri kurtarma yolunda görev alan,

hipoksantinden inozin monofosfat, guaninden guanozin monofosfat oluşturan ve eksikliğinde ürik asidin aşırı üretimine neden olan transferaz sınıfından bir enzimdir. Bu enzimin fonksiyonel olmadığı durumlarda salvaj yolağı çalışmamaktadır. Kültür ortamına aminopterin, methotrexate ya da azaserin gibi de novo sentezini de durduracak ajanların koyulması ile her iki sentez yolağıda çalışmayacağı için myeloma hücreleri ölecektir (1,68). Füzyon olmuş hibridoma hücreleri B hücrelerinden gelen sağlam hppt geni sayesinde salvaj yolağı aktif olacak ve aminopterin gibi ilaçların verildiği kültür ortamında yaşayacaklardır. Azaserin sadece pürin biyosentezini bloke ederken, aminopterin ve methotrexate de novo hem pürin hem de pirimidin sentezini bloke eder. Hibridoma hücrelerinin seçilimi için hipoksantin, aminopterin ve timidin olduğu HAT besiyeri hazırlanır. HAT besiyeri içerisinde hibridoma hücrelerinin seçilimi sağlandıktan yaklaşık bir hafta sonra oluşan klonlar kümeleşir ve mikroskopta görünür hale gelir. Yapılan her bir klon seçiminden sonra ELISA yöntemi ile en iyi antikor sağlayan klon seçilir. Fonksiyonel olarak çalışıp çalışmadığına ise western blot yöntemi ile bakılır (1).

## **2.12. Antikor Üretim Aşamaları**

Vücut, içine giren yabancı moleküllere karşı farklı savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Antikorlar vücuda yabancı moleküller girdiğinde onlara yanıt oluşturan konak tarafından üretilmiş proteinlerdir. Vücudun baş edemediği ya da bazı hastalıklarda antikor tedavisi uygulanır. Biyoteknoloji alanında çalışan insanlar, bu problemi çözmek için antikor üretim teknolojilerini üzerinde durmaktadırlar (1). Kullanılabilir spesifik antikor oluşturmak için; immunojenin hazırlanması, immunizasyon, hibridoma oluşturulması ve toplanması (monoklonal antikor için)/ serum ya da ascites sıvısının toplanması (poliklonal antikor için), antikorun hedef antijene yönelik üretildiğinin gösterilmesi (antibody screening), izotiplendirme, saflaştırma ve spesifik bir metotta direk bir kullanımı için işaretlendirme yapma yapılacak işlemleri kapsamaktadır. Poliklonal antikorlar serumdan direk elde edilebilir. Monoklonal antikorlar için immunize olmuş hayvandan antikor salgılayan dalak hücreleri ile ölümsüz myelom hücrelerinin füzyonu gerçekleştirilir ve hücre kültürü süpernatantında spesifik antikorları salgılayan monoklonal hibridoma hücre hatları yaratılır (Şekil 2.5.) (62).

### **2.12.1. Antikor Üretmesinde Hayvan Seçimi**

Laboratuvar koşullarında antikor üretirken hayvan seçimi önemlidir. Antikorum veya antiserumun miktarı, antijen ile antikorum üretildiği türler arasındaki filogenetik ilişki, üretilmek istenen poliklonal antikorum efektör fonksiyonu ve antikorum kullanım amacı gibi faktörler hangi hayvanların kullanılabileceğini belirlemektedir. Türlerin farklı alt türleri, MHC moleküllerinde ve immun yanıtta regülasyon mekanizmalarında antijenlerin sunulmasında genetik varyasyonlar yüzünden farklı reaksiyonlar da verebilirler. Poliklonal antikor üretimi için yaygın olarak kullanılan hayvan tavşandır. Kan alabilmek, yüksek titrede yeterli hacimde, yüksek afinitede ve antiserumunu üretebilmek için tavşan kullanmak daha çok tercih edilmektedir. Memelilerden uzak filogenetik aileye sahip olan tavukta özellikle hücre içi proteinlerine karşı antikor üretmek faydalıdır. Poliklonal antikorlar tavuk yumurta sarısından üretilir. Ayrıca tavuktan üretilen antikor miktarı kemirgenlerin üreteceği antikor miktarından fazladır. Fareler ise az miktarda üretim için daha uygun olabilir. Poliklonal antikor üretimini etkileyen diğer faktörler kullanılacak immunojenin yapısı, ne kadar sürede üretilabileceği, immunojen/adjuvan formülasyonunun yapısı, kanın toplanma tekniği, hayvanların türü, sağlığı ve genetik durumu, yeme biçimleri olabilir. Enfeksiyon ajanlarının varlığı ve stres immun cevabın oluşmasını baskılayabilir. Poliklonal antikorum efektör fonksiyonu ve antikorum kullanım amacı gibi faktörler hangi hayvanların kullanılabileceğini belirlemektedir. Türlerin farklı alt türleri, MHC moleküllerinde ve immun yanıtta regülasyon mekanizmalarında antijenlerin sunulmasında genetik varyasyonlar yüzünden farklı reaksiyonlar da verebilirler. Poliklonal antikor üretimini etkileyen diğer faktörler kullanılacak immunojenin yapısı, ne kadar sürede üretilabileceği, immunojen/adjuvan formülasyonunun yapısı, kanın toplanma tekniği, hayvanların türü, sağlığı ve genetik durumu, yeme biçimleri olabilir. Enfeksiyon ajanlarının varlığı ve stres immun cevabın oluşmasını baskılayabilir (1).

### **2.12.2. İmmünizasyon Metodu**

İmmunojenin üretilmesinden sonraki aşamada hayvanların immunize edilmesi için gerekli koşulların hazırlanması gerekir. Antijen hazırlama metodu, adjuvan kullanımı, enjeksiyonun hangi bölgeye yapılacağı, enjeksiyon miktarı ve hangi sıklık ile yapılacağı immunizasyon protokolü boyunca ayrı ayrı düşünülmesi gereken durumlardır (1).

### 2.12.3. İmmunojen Hazırlanması

İmmunojenin özellikleri immunizasyon aşamasında önemlidir. Hazırlanan immunojen kullanılacak hayvanda toksik etki yaratmamalıdır. Aseptik koşullarda hazırlanmalı, steril, toksinlerden ve pirojenlerden arındırılmış olmalıdır. Özellikle, herhangi kimyasal rezidu, endotoksin veya diğer toksik kontaminantlar minimize edilmelidir. pH ise fizyolojik koşullara uygun olmalıdır. Protein yapısındaki çoğu immunojen, mikrogözenekli selüloz asetat fitreleri (0.22µ por çapında) yardımı ile sterilize edilmelidir. İyi bir antikor cevabı oluşturmak için enjekte edilecek immunojen miktarı, immunize edilecek hayvanın soyuna, adjuvan türüne, enjeksiyon miktarı ve sıklığına ve son olarak immunojenin immunojenitesine bağlı olarak değişmektedir. İmmunojen durumu ve büyüklüğüne bağlı olarak üretilen poliklonal antikorun miktarı ve kalitesi değişebilmektedir. Küçük polipeptitleri ve protein yapısında olmayan moleküllerin enjeksiyonunda immun yanıt oluşturabilmek için kendisinden daha büyük immunojenik yapıda taşıyıcı bir proteine ihtiyaç vardır. İmmunojene karşı oluşacak olan cevabın baskılanmaması için uygun taşıyıcı molekül seçilmelidir. İmmunojenin konformasyonu bazı durumlarda önemli olabilmektedir (69).

### 2.12.4. Adjuvan Seçimi

Adjuvanlar immun cevabın oluşmasını güçlendirmek için ve antikor üretiminin sürekli olması için gerekli moleküllerdir. Adjuvan aynı zamanda immunojenin dalak ve/ veya immun yanıt oluşumunda hücreler arası iletişimin gerçekleştiği lenf nodlarına dağılmasına yardımcı olur. Adjuvanlar direkt ya da indirekt olarak makrofaj ya da T yardımcı lenfositleri gibi çeşitli hücreleri aktive edebilirler. Üretilen antikorun sürekliliğini, alt sınıfını ve antijene bağlanma derecesini etkileyebilirler. Zamanla, adjuvan sayesinde enjekte edilen bölgede immunojenin yavaş bir şekilde dağılımı ve immun sistemi situmule etmesi ile immunojen depolonabilir. Adjuvanların laboratuvar hayvanları için stres ya da acı oluşturmamasına araştırmacıların dikkat etmeleri gerekmektedir.

İmmunojen küçük bir molekül ise tek başına immun yanıtı genellikle tetikleyemeyeceği için adjuvana ihtiyaç duyulabilir. Yüksek konsantrasyonda antijen, adjuvan kullanmayı gerektirmeyebilir. Kullanılırken immunojen/ adjuvan karışımı küçük hacimlerde kolaylıkla enjekte edilebilir. Antikor üretiminde istenmeyen sonuçların ortaya çıkmasında adjuvanın sürekli uygulanması etkili olabilir. Yaygın olarak kullanılan adjuvanlar; Freund's

tamamlanmış (Complete)/ tamamlanmamış (Incomplete) adjuvanı, Quil A, Ribı, TiterMax ve mineral tabanlı alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat ve kalsiyum fosfat gibi adjuvanlar vardır (70,71).

Çoğu araştırmacı Freund's tamamlanmış adjuvant (FCA) isimli adjuvanı geniş çeşitlilikte antijenlerdeki etkinliği sayesinde altın standart olarak kullanılır. Bu adjuvant yüzey aktif madde yapısındadır (surfactant). FCA en etkili adjuvanlardan bir tanesi olmasına rağmen, kronik inflamasyon yanıtının daha fazla oluşmasına neden olabilir. Tamamlanmış Freund's adjuvanın tamamlanmış olandan farkı içerisinde heat-killed mikobakteriyum özütü bulunmaktadır(1, 72, 73). Hayvan ilk kez antijen ile immunize edildiğinde Freund's tamamlanmış adjuvan antijen ile karıştırılarak mikobakteriyum özütü sayesinde hayvanın hem hüneral hem de hünerel immun cevabı tetiklenir.

### **2.12.5. Enjeksiyon**

Enjeksiyon subkutanöz (SC), intramüsküler (IM), deri içi (ID), intraperitoneal (IP), ya da damar içi (IV)'nden yapılabilir. Sübkütenez (deri altı) enjeksiyon yöntemi yağ yada vizkoz jel adjuvanlarla enjekte edilirken tercih edilir. Damar içi enjeksiyon, fare ve sıçan gibi küçük hayvanlarda yağ bazlı ve vizkoz adjuvanlarda ilk tercih olmamalıdır. Deri içi enjeksiyon ise çoğunlukla tavşanlar ve büyük hayvanlarda uygulanır. Adjuvan ile karıştırılmış örneklerin intraperitoneal olarak enjeksiyonu tercih edilmez çünkü hayvanda inflamasyona, karın zarı enfeksiyonuna, davranışsal değişikliklere sebep olabilir (71).

İmmunize edilecek hayvanın bağışıklık durumu immunizasyon sonucunu etkiler. Bu yüzden hayvanın yaşı önemlidir. Poliklonal antikor üretimi için genç deney hayvanlarının kullanılması önerilir. Erken yaşlarda bağışıklık sistemi olgunlaşmadığı için vücuda giren antijene karşı daha hızlı bir yanıt oluşacaktır (71). İmmunizasyon için kullanılacak hayvanların yaşları ile ilgili bilgiler Çizelge 2.1.' de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Poliklonal antikor üretimi için kullanılacak hayvanların yaşları

Hayvan	Yaş
Fare	6 haftalık
Sıçan	6 haftalık
Tavşan	3 aylık
Kobay	3 aylık
Tavuk	3-5 aylık
Keçi	6-7 aylık
Koyun	7-9 aylık

Hayvana yapılacak olan enjeksiyon hacmi mümkün olduğu kadar az olmalıdır. Adjuvan ile birlikte vurulacak olan maksimum miktarlar Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir (71).

**Çizelge 2.2.** Farklı hayvan türlerinde bir bölgeye enjekte edilecek antijen-adjuvan karışımının maksimum hacimleri

Türler	Maksimum Enjeksiyon Hacmi	İlk Enjeksiyon Bölgesi	Sonraki Enjeksiyon Bölgesi
Fare, Hamster	100 µl	s.c.	s.c.
Fare, Hamster	50 µl	i.m.	i.m.
Kobay, Sıçan	200 µl	s.c., i.m.	s.c., i.m.
Tavşan	250 µl	s.c., i.m.	s.c., i.m.
Kuzu, Keçi	500 µl	s.c., i.m.	s.c., i.m.
Tavuk	500 µl	s.c., i.m.	s.c., i.m.

s.c.=subkutanöz, i.m. = intramusküler

#### **2.12.6. Antikor Görüntüleme (Screening)**

Hayvanda gelişen antikor örneklerinin hedef antijene spesifik olarak gelişip gelişmediğini anlamak için yapılan işlemler 'antibody screening' olarak isimlendirilmektedir. İmmünizasyon işlemi süresince yüksek seviyede antijen spesifik poliklonal antikor üreten hayvanların immunize olup olmadığını tanımlamak için screening yapılır. Eğer amaç monoklonal antikor yapmak ise yeterince immunize edilmiş hayvanlar ile işleme devam edilir. Screening işlemi poliklonal antikorlar için serum, monoklonal antikorlar için hücre kültürü süpernatanı kullanarak ELISA yöntemi ile yapılır (74,75).

### **2.12.7. Antikor Titrasyonu**

Yeterli miktarda antijen ile yeterli süre hayvanın immunize edilmesi sonucunda hayvanın verilen antijene karşı immunize olduğunu kanıtlamak için ELISA yöntemi ile antikor titrasyonu yapılır. Alınan değerlere göre hayvanın immunize olduğuna karar verildikten sonra üretilmek istenen antikorun poliklonal mi monoklonal mi olacağına göre işlemlere devam edilir. Hayvandan alınan kandan elde edilen serumda poliklonal antikorlar bulunurken, monoklonal antikor üretimi için farklı adımlara ihtiyaç duyulur (1,64,71). 1988 yılında Overkamp ve arkd. hayvanın karınıçi boşluğunda kendiliğinden üremiş olan ascites sıvısının poliklonal antikorca zengin olduğu yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir (76).

### **2.12.8. Antikor İzotiplendirmesi**

Antijenin antikor ile stimülasyonundan sonra B hücrelerinin her birklonu aynı V alt yapılarına (domain) sahip olmalarına rağmen farklı isotipler üretebilmektedirler. Naif B hücreleri hem IgM hem de IgD olmak üzere iki çeşit reseptörü de hücre zarlarında bulunduruacak şekilde üretirler. Antijenle karşılaşan T yardımcı hücreleri aracılığı ile sunulan CD40 reseptörü ve salgılanan sitokinlere göre antikorun ağır zincir kısmında izotip dönüşümü (switching) meydana gelir. İzotip dönüşümü sonucunda IgM ve IgD ifade eden B hücrelerinin farklı soyları antijenin en iyi şekilde yok edilmesini sağlayacak isotipleri ve alt grupları üretirler (77). Özet olarak, T yardımcı hücreleri tarafından B hücrelerine sunulan farklı enfeksiyöz reaktiflerine göre dönüşüm gerçekleşmektedir. Örneğin, polisakkarit antijenleri genellikle IgM izotiplerini uyarırlar. Virüs ve bakterilere cevap olarak ise IgG üretilir. Bağırsak parazitlerinin çoğuna karşı genelde IgE antikorü,mukozalyolla geçen antijenlere karşı ise IgA antikorisotip dönüşümleri sağlanır<sup>71</sup>. Antikor üretilip, spesifite ve aktivite testleri yapıldıktan sonra hangi izotip antikorların üretildiğini gözlemlemek için ticari kitler (ELISA, membran kitleri) yardımı ile izotiplendirme testleri yapılır. Bu kitler farklı türlere göre antikorların sınıf ve alt sınıflarının saptarlar. Örnek verilirse, farede üretilen antikor izotipini saptamak için kullanılacak kitte ağır zincir izotipini saptamak için IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM anti- immunoglobulin antikorları kullanılırken, zayıf zincirleri tanımlamak için kappa ve lambda anti-immunoglobulinleri kullanılmaktadır (77).

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Antikor üretim teknolojisinin giderek geliştiği ve ihtiyaç duyulduğu bu yüzyılda antikor teknolojisinin uygulama yöntemlerini öğrenmek ve farklı yaklaşımlar geliştirmek hem terapötik uygulamalarda hem de bilimsel çalışmalarda kullanılmasına önemli katkılar sağlayacaktır. Antikorum poliklonal ya da monoklonal antikor olmasına göre üretim aşamaları değişmektedir. Üretim için kullanılacak olan hayvan modeli, immunojenin seçimi ve hazırlanması, hayvan immunizasyonu, antikorum saflaştırılması gibi adımların her birinde amaca yönelik olarak farklı yollara gidilebilmektedir.

Literatürde, glutamin amino asitinin tümör hücre gelişimi için, hücrenin hayatını devam ettirebilmesi için ve metabolizması için önemli bir amino asit olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (78, 79, 80, 81). Amino asit taşıyıcı protein ASCT2 (SLC1A5) kanser hücrelerinde glutaminin hücre içine alımını gerçekleştiren bir reseptör proteindir (3,81, 82, 83). ASCT2 ifadenmesinin kanser hücrelerinde yüksek miktarda ifade edildiği ve ASCT2'nin fonksiyonunu kaybettiği zaman glutaminin hücre içine alınmasının, hücre büyümesinin ve mTORC1 yolağının aktivasyonunun önemli derece azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (81,84,85). Bunlara ek olarak, obez ve tip 2 diyabet geliştirmiş hastalarda amino asit metabolizması incelenmiş ve normal bireylere göre farklılıklara sahip olduğu gösterilmiştir. Obez bireylerde dallı zincirli amino asitlerin ve glutamin seviyelerinin kanda yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir (55,86). Tezin amacı ASCT2 poliklonal antikoru üretilmesidir. Üretilen antikor glutaminin metabolik yolaklardaki etkisinin daha detaylı incelenmesinde yapılması planlanan ileriki ek çalışmalarda kullanılacaktır.

Antikor üretim stratejisi olarak; ASCT2'nin bağışıklık sisteminde antijeni tanıdığı immunojenik kısmı rekombinant protein olarak üretmek (ekstrasellüler dizi) ve üretilen bu antijen ile farelerin bağışıklık sistemini uyararak ASCT2'ye karşı antikor üretimini gerçekleştirmektir. Daha önceden yapılan ASCT2 poliklonal ve monoklonal antikor üretim çalışmalarında hedef antikoru tanıyacak antijenin hazırlanma aşamasında ASCT2 proteinin ekstrasellüler dizileri belirlemek için ExpASY Proteomics Server kullanılmıştır. Proteinin 74-98, 154-224, 287-305, 361-380, 420-425 amino asit dizileri arasındaki dizilerin antikorum tanıyabileceği epitop kısımları olduğu tespit edilmiştir (87). ASCT2 antikorumun tanıyabileceği kısımların üretilen immunojen proteinde mutlaka olması gerekmektedir. Bu



yüzden bu çalışmada aynı şekilde ekstrasellüler diziler tespit edildikten sonra antikorun bağlanabileceği antijenik dizi tespiti için EMBOSS antijenik analiz programı kullanılmıştır. Ekstrasellüler kısmın tamamını içine alan 154-224 arasındaki amino asit dizisi hedef dizi olarak seçilmiştir ve rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak bu bölge klonlanmıştır. Balb/C fareler üretilen immunojen ASCT2 proteini ile immunize edilmiştir. Ascites sıvısı ve kandan alınan serum örneklerinin antikorca zengin olduğu bilinmektedir. Bu yüzden bu örnekler toplanmış ve hedef immunojene spesifik bir antikor geliştirdiğini anlamak için uygun örnekler üzerinde immünolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

Sonuçta üretilen ASCT2 poliklonal antikorunu deneylerimizde başarılı bir şekilde çalışmıştır. Bir sonraki adımda ASCT2 antikorunun ELISA kitine dönüştürülmesi için yeterli donanıma sahip şirketlerle birlikte gerekli çalışmalara devam edilmesini hedeflemekteyiz.

## **4. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **4.1. Materyal**

Proje kapsamında, 4 Eylül 2013 tarihli ve 2013-15-117 karar no'lu etik kurulu onayı (EK 1) alınmıştır.

#### **4.1.1. Genel Reaktifler**

Genel laboratuvar kimyasalları olarak Fischer Scientific, Applichem, Merck, Promega, Sigma Aldrich, Ambresco, Biorad, Invitrogen firmalarının ürünleri kullanılmıştır.

#### **4.1.2. Kullanılan RNA Örnekleri**

İnsan hepatoma kanser hücre hattı (HepG2) glutamini yüksek oranda bulunan Sigma **D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium (DMEM) besiyeri ile kültüre alınmıştır. 37°C inkübatörde hücrelerin büyümesine ve çoğalmasına izin verilmiştir. Tripsin ile kaldırılan hücreler santrifüj ile çöktürülüp tripsin uzaklaştırıldıktan sonra pelletler -80°C dolapta saklanmıştır.

#### **4.1.3. RNA İzolasyon Reaktifleri**

Total RNA izolasyonu için Trizol Invitrogen protokolü kullanılmıştır. Kullanılan reaktifler; Kloroform, İzopropanol, Ethanol Absolut, Glikojen, DNaz ve RNazsız çift distile su'dur.

#### **4.1.4. cDNA Sentez Reaktifleri**

Total RNA'dan ters transkripsiyon ile cDNA eldesi için First Strand cDNA Synthesis Protocols (BioLabs E6300) kitindeki reaktifler kullanılmıştır. Bu reaktifler; d (T) VN (50 µM), nükleaz free H<sub>2</sub>O, M-MULV Reaksiyon mix, M-MULV Enzim mix tüplerini içermektedir.

#### 4.1.5. PZR Reaktifleri

Elde edilen cDNA ürünü üzerinden ASCT2 proteinin C uç dizisini çoğaltmak için primerler, Primer 3 ve PerlPrimer programları yardımı ile tasarlanmıştır. Çoğaltılmak istenen hedef dizi sonradan yapılacak restriksiyon deneylerinde enzimler yardımı ile kesileceği için, 5' primer uçlarına enzimin tanıyacağı diziler eklenmiştir. Çizelge 4.1. primer tasarımını göstermektedir. Sentromer firmasında tasarlanan primerler sağlanmıştır. Q5 High Fidelity DNA polymerase (BioLabs, M0491) kiti içerisindeki reaktifler PZR ürünü olarak kullanılmıştır. PZR reaksiyonu Biorad DNA Engine Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.1.** ASCT2 primer tasarımı

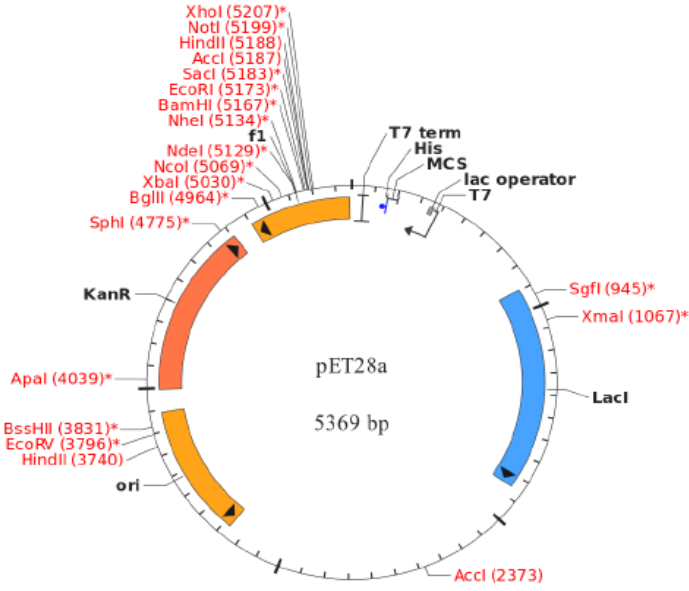
Gen Sembolü	Genbank Id	F/R primer 5'→3'		Enzim Tanıma Dizisi		Amplifiye edilen fragment boyu (bp)
Asct2	AF334818.1	AATCGCTAGCATGATCATCTTGCCGCTGGT	Forward	NheI	GCTAGC	576
		ATTAAGCTTCTCCATCTCCACGATCTTGCC	Reverse	HindIII	AAGCTT	

#### 4.1.6. Restriksiyon Enzimleri

NheI (BioLabs, R0131S) ve HindIII (BioLabs, R0104S) restriksiyon endonükleazları ve tampon çözeltileri, PZR ürünleri ve plazmit kesiminde kullanılmıştır.

#### 4.1.7. pET28A Vektör

DNASU firmasından klonlama işleminde kullanılacak olan vektör pET28A, sipariş edilmiştir. Çizelge 4.2.'de gösterilen bilgiler DNASU websitesinden alınmıştır.



Şekil 4.1. pET28a Vektör Haritası (13)

Çizelge 4.2. pET28A vektör özellikleri

Çeşit	İsim	Başlangıç Pozisyonu	Sonlanma Pozisyonu
Multiple Klonlama Bölgesi	MCS (XhoI, NotI, EagI,HindIII, Sall, SacI, EcoRI, BamHI, NheI, NdeI, NcoI)	158	203
Bakteri orjini	f1 orjini	4903	5358
Bakteri replikasyon orjini	Ori	3270	3889
promotor	T7 promotor	368	386
Represör geni	LacI	896	1852
Seçici markör	KanR	3995	4807
Tag	6xHis tag	140	157
Trxn regülasyon elementi	Lac operatör	347	363
Trxn terminasyon sekansı	T7 terminatör	26	72

#### **4.1.8. Ligasyon, Transformasyon, Plazmit İzolasyon Reaktifleri**

T4 DNA ligaz enzim (Thermo Scientific, EL0014) ve tampon ürünleri kullanılmıştır. Transformasyon aşamasında gerekli LB Broth (Conda, #1231) , laboratuvarında hazırlanmış TSS çözeltisi(LB broth, PEG, DMSO and Mg<sup>+2</sup>) ve SOC besiyeri (20 g/L Triptofan, 5 g/L Maya Özü, 4.8 g/L MgSO<sub>4</sub>, 3.603 g/L dekstroz, 0.5g/L NaCl, 0.186 g/L KCl), buz kabı, 42°C'ye ısıtılmış su banyosu, cam tüp malzemeleri, öze kullanılmıştır. Santrifuj cihazı olarak Allegra X-15 Beckman Coulter ve Thermo Scientific MicroCL 17 kullanılmıştır. Steril ortam Evolite Butan Propane Vidalı Kartuş tüpteki ateş ile sağlanmıştır. Plazmit izolasyonu için alkalin lizis tamponları hazırlanmış, fenol-kloroform (Life technologies, #15593031) temin edilmiştir.

#### **4.1.9. Protein Purifikasyon, Desalting protokolü**

Protein purifikasyonu için HisPur Ni-NTA Resin ve Kitleri (Thermo Scientific, #88221) ve desalting protokolü için D-Salt Poliakrilamid plastik desalting kolonları (Pierce, #89849) kullanılmıştır.

#### **4.1.10. Protein İzolasyon ve Tayin Reaktifleri**

Protein izolasyonu için modified RIPA çözeltisi (pH 7.2) hazırlanmıştır. MRIPA 50 mM Tris (Sigma, #A2264), %1 Triton X 100 (Sigma, #9002-93-1), %0,2 sodyum deoxcholate (Sigma, #302-95-4), %0,2 SDS (Fisher Scientific, #134135), 1mM EDTA (Gerbu, #1034) reaktiflerinden oluşmaktadır. Sonics Vibra Cell sonikatör cihazı metot sırasında kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu tayininde BCA protein assay kit kullanılmıştır (Pierce,#23225).

#### **4.1.11. Hayvan İmmünizasyonu**

Freund's complete (Sigma, F5881) ve incomplete adjuvanları (Sigma, F5506) fare immunizasyonunda antijen ile belli oranlarda karıştırılarak hayvanlara verilmiştir.

#### **4.1.12. Western Reaktifleri**

Elektroforez sistemi (Bio-rad Mini Protean Tetra vertical, #165-8000) western protokolü için kullanılan sistemdir. Poliakrilamid jel hazırlarken akrilamid 4K solusyonu (Applichem, A1672), Tris (Sigma, A2264), SDS (Fisher Scientific, #134135), amonyum persülfat (APS) (Gerbu, #1708), Temed (Scharlan, TE0050) reaktifleri uygun konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Koşma tamponu (pH 8.3) 250 mM glisin, 25 mM tris, %0.1 SDS ve transfer tampon (pH 9.3) 48 mM tris, 39 mM glisin (Fisher Scientific, BP381-1), 0.04% SDS, 20% metanol içermektedir. Yıkamalar için kullanılan PBS-Tween (pH 7.5); 80 mM disodyum hidrojen (MERCK, #106587), 20 mM sodyum fosfat monobasic monohidrat (Sigma, #10049-21-5), 100 mM sodyum klorür (Fisher Scientific, BP 358-1) ve %0.1 Tween 20 (Sigma, P9416) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

#### **4.1.13. Antikor Tiplendirme Reaktifleri**

Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit (Pierce, #37503) kullanılmıştır. Ultra saf su ile kitin içerisinden çıkan solusyonlar hazırlanmıştır.

#### **4.1.14. Hibridoma Reaktifleri**

RPMI besiyeri (glutaminsız, phenollü) (Lonza, BE 12-167F), Fetal Sığır Serum (Lonza, DE 14-801F), Penisillin/Stretomisin, 10,000 units/ml (Lonza, DE-17602E), L-glutamin (Lonza, BE 17-605E), HAT Media Supplement Hybri-Max (Sigma, H0262), HT Media Supplement(50X) Hybri-Max (Sigma, H0137), Polietilen glikol solusyonu Hybri-Max, %50 (w/v), steril-filtreli BioReagent (Sigma, P7181) malzemeleri kullanılmıştır.

### **4.2. Yöntem**

#### **4.2.1. Hücre Kültürü**

Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce laminar flow içerisinde 15 dakika UV'ye bırakılır. Su banyosu 37°C ayarlandıktan sonra besiyeri için gerekli olan malzemeler (DMEM besiyeri, fetal sığır serumu (FBS), penisilin streptomisin ve glutamin) koyulur yaklaşık yarım saat erimesine ve ısınmasına izin verilir. Laminar flow çalışmaya başlamadan 15 dakika önce çalıştırılır. Isınan solüsyonlar su banyosundan çıkarılır ve

özellikle kapak kısımlarına gelecek şekilde %70 etanol ile temizlenir ve laminar flow'un içine alınır. DMEM besiyeri içerisine % 10 FBS eklenir, daha sonra 200 mM L-glutaminden son konsantrasyon 2mM olacak şekilde ilave edilir. Son olarak 100x konsantrasyondaki penisilin streptomisin (1 mililitrede penisilin 10, 000 ünite, streptomisin 10 mg' dir.) besiyerine eklenip besiyeri iyice karıştırılır. Hücrelerin üzerine ilave edilecek besiyerinin sıcaklığı 37 °C olmalıdır.

Bu çalışmada HepG2 hücre hattı kullanılmıştır. 15 ml lik steril santrifüj tüpüne 10 ml DMEM besiyeri ilave edilir. Hücreler kriyotüpler içinde saklandıkları sıvı azottan (-196°C) çıkartılarak 37°C'deki su banyosunda hızlıca çözdürülür ve olası kontaminasyonu önlemek için tüpler %70'lik alkolle silinerek laminar flowa alınır. Hücreler kriyotüpten alınıp 10 ml besiyerinin içerisine bırakılır ve 21°C'de 800 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan besiyeri pompaya bağlı cam pastör pipeti yardımıyla çekilip atılır. Pelletin üzerine 6 ml DMEM besiyeri eklenir. Serolojik pipet ile hücreler 45 derecelik açıyla tüpün çeperine vurulup homojenize edilir. T75 cm hücre kültürü üretme kabına (flask) alınıp 37°C'deki %5 karbondioksit içeren inkübatöre bırakılır. Ertesi gün besiyeri değiştirilir ve bundan sonraki değişmelerde hücreler hergün kontrol edilerek 2-3 günde bir yapılır.

HepG2 hücrelerinin yüzey alanını %90 kapladığı hale geldiğini kontrol etmek için hücre kültürü mikroskobu kullanılarak kontrol edilir. Hücre pasajlanmak istendiğinde HepG2 hücreleri yüzeye yapışan hücreler oldukları için yapıştıkları yüzeyden kaldırılmaları için tripsin kullanılmaktadır. Bunun için flasklar 37°C'deki inkübatörden laminar flowa alınır. Üzerlerindeki besiyeri çektilir ve yerine divalent katyonları (Ca<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup>) içermeyen fosfat tampon solüsyonu (PBS) (pH=7.0) eklenerek hücrelerin yüzeyi yıkanır. Bunun nedeni serumun tripsin gibi bazı enzimlerin etkisini inhibe etmesidir. Daha sonra PBS uzaklaştırılır ve yerine 3 ml % 0.25 tripsin / EDTA solüsyonu eklenir. 37 °C'deki inkübatörde yaklaşık 3-8 dakika arası bekletilir ve bu süre içerisinde ara ara inkübatörden çıkartılıp mikroskop altında hücrelerin yüzey ile interaksiyonunu kesip kesmediğine bakılır. Hücreler hücre kültürü kabı yüzeyinden ayrıldığı zaman 15 ml lik santrifüj tüpüne alınıp üzerine hemen 10 ml besiyeri eklenir ve hücreleri içeren besiyeri 800 rpm de 3 dakika santrifüj edilir. Süpernatant uzaklaştırılır ve pellet RNA izolasyonu için kullanılır.

#### **4.2.2. Total RNA İzolasyonu**

HepG2 hücre pelletinin üzerine 1000 µl Trizol eklenir ve hücreler parçalanır. Trizol ile homojenize edilen örneklerin üzerine 200 µl kloroform eklenir, solusyon homojen bir görünüm alana kadar vortexlenir ve oda ısısında 5 dakika bekletilir. Örnekler daha sonra önceden 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 12000 g'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında tüplerde 3 ayrı faz oluşur. En üstte şeffaf ve RNA'nın bulunduğu temiz faz, ortada beyaz bulutumsu DNA fazı ve en altta, organik fazın görülmesi beklenir. Tüpler fazların karışmaması için hareket ettirilmeden santrifüjden çıkartılır. En üstteki RNA'yı içeren şeffaf faz ortada bulunan faza yaklaşımadan başka bir tüpe aktarılır. Aktarılan RNA'nın üzerine 500 µl izopropanol (2-propanol) ve pellet oluşumunu kolaylaştırmak için 0,5 µl glikojen (20 mg/ml) eklenir ve oda ısısında 10 dakika bekletilip 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 12000g'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüjün sonunda tüpün dibinde beyaz bir RNA pelleti görülmesi beklenmektedir. Süpernatandankurtulunur ve pellet 1 ml %70 etanol ile 12000 g'de 5 dakika santrifüj edilir, bu işlem 2 kere tekrarlanır. Yıkanan pellet tüplerin kapakları açık bırakılarak kurutulur ve uygun miktarda yaklaşık 30-50 µl nükleaz içermeyen su ile çözülür.

#### **4.2.3. ASCT2 proteininin antijenik bölgelerinin saptanması**

Antikoron protein tanıyacağı bölge ASCT2 proteinin ekstrasellüler zinciridir. Uniprot web sitesi kullanılarak ekstrasellür dizi tespit edilir. Bu dizi antijenik bölgeler tespit edilirken kullanılacaktır. EMBOSS analiz programı proteinlerin antijenik bölgelerinin saptanılmasında kullanılan bir biyoinformatik programıdır. Yarı deneysel ve amino asit rezidularının fizyokimyasal özelliklerine dayalı olarak bu bölgeler tespit edilmektedir. Online olarak kullanılabilen EMBOSS sitesine ekstrasellüler dizi yapıştırılır ve program çalıştırılır. Ortaya çıkan sonuçlardan uygun antijenik bölgelerden dört tanesini içine alan antijenik bölge seçildi ve bu bölge için primerler tasarlandı.

#### **4.2.4. RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi**

RNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) ile ölçülür. DNA'nın, 280 nm proteinin, 230 nm de fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boyudur. A260/A280 oranının 1,8-2,2 aralığında olması RNA'nın saf olduğunu gösterir. Elde edilen RNAların bütünlüğü ve kalitesi ayrıca % 0.8 agaroz jel elektroforezi ile analiz edilir.



Hazırlanacak jelin konsantrasyonuna göre gerekli miktarlarda agaroz alınarak, 1xTAE (40mM Tris, 20mM asetik asit ve 1mM EDTA) içinde mikrodalga fırın içerisinde çözülür. Jel dökülüp donduktan sonra 2 µl 5x yükleme tamponu, 8µl RNA örneklerinden eklenerek 75V'da 60 dakika yürütülür. 5mg/ml etidyum bromür içerisinde 15 dakika çalkalayıcı üzerinde boyanır. Görüntüleme ultraviyole ışık altında yapılır ve Biorad VersaDoc 1000 görüntüleme cihazında görüntüsü alınır.

#### **4.2.5. cDNA Sentezlenmesi**

cDNA sentezi için materyal olarak, elde edilen saf ve yeterli miktarda total RNA kullanılır. BioLabs cDNA sentez kiti protokolü kullanılmıştır. Eriyebilecek malzemeler buz üzerine koyulur. Örneklerde DNA kontaminasyonunun olup olmadığı incelemek için ters transkriptazın yerine nükleaz içermeyen suyun kullanıldığı negatif kontrol grubu hazırlanır. RNaz içermeyen iki tüp içerisine 6 µl RNA (10 ng–1 µg) örneği ve 2 µl d(T)<sub>23</sub>VN (50 µM) primeri eklenir. RNA, 70°C'de 5 dakika denatüre edilir. Bu sırada başka tüpe 10 µl M-MuLV reaksiyon mix ve 2 µl M-MuLV enzim mix karışımı hazırlanır. Denatüre olmuş RNA örnekleri ile hazırlanan karışım 20 µl olur ve 42°C'de 1 saat boyunca inkube edilir. Daha sonra tüpler, enzim inaktivasyonu için 80°C'de 5 dakika bekletilir. Oluşan cDNA ürünü -20°C'de saklanır.

#### **4.2.6. İnsan ASCT2 Ekstrasellüler Kısımına Primer Tasarımı**

Liyofilize halde gelen primerler DNaz ve RNazsız suda 100 pmol/µl konsantrasyonda çözülür. PZR reaksiyonları için 10 pmol'e diluye edilir. Primerler -20°C'de saklanır. Aşağıda primer tasarımının adımları belirtilmiştir;

1. ASCT2'nin ekstrasellüler bölgesinin amino asit dizisinin tespiti (UniProt)
2. ASCT2 ekstrasellüler nükleotit dizisinin tespiti (NCBI)
3. Sekansın PerlPrimer programına girilmesi (primer T<sub>m</sub>, uzunluk, bağlanacağı bölgenin lokasyon aralığı bilgilerinin girilmesi)
4. Farklı ileri-geri primer çiftlerinin blast analizi için seçilmesi
5. NCBI Blast ile tasarlanmak istenen primerlerin organizma DNA'sında hedef bölge dışında başka bir yere bağlanıp bağlanmadığının tespiti
6. Saç tokası ve dimer oluşturup oluşturmadığının tespiti için Oligo Analyzer (IDT) programının kullanılması

Seçilen bölgenin hedef cDNA bölgesine yönelik primerler, PerlPrimer programı kullanılarak tasarlanır. Gen bölgelerine spesifik primer bölgelerinin özgünlüğüne, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> kullanılarak bakılır. Primer tasarlanırken kullanılacak olan primerlerin; saç tokası yapısı oluşturmamasına, ürünün büyüklüğüne, tekrar bazların olmamasına ve Tm değeri dikkate alınmalıdır.

The screenshot shows the PerlPrimer program interface with the following settings and results:

**Standard PCR** | Bisulphite PCR | Real-time PCR | Sequencing | **Primers**

**Primer Tm:** 50 - 65 °C Difference 0.5 °C

**Primer Length:** 18 - 24 bases

**Amplified range:** 5' 1 - 410 3' 932 - 1020  
Amplicon size: 522 - 1019 bases  
Set from ORF: -10 +10

**Options:**  
 Exclude %GC  GC clamp  
Add 5' F seq: [ ] Frame:   
Add 5' R seq: [ ] Frame:

**Sequence:**  
ATGGTGGCCGATCCTCCTCGAGACTCCAAGGGGCTCGCAGCGCGGAGCCCACCGCCAACGGGGGCTG  
GCGCTGGCCCTCCATCGAGGACCAAGGCGGCGCAGCAGGCGGCTACTGCGGTTCCCGGGACCAGGTGGCG  
CGCTGCCCTCGAGCCAACCTGCTTGTGCTGCTGACAGTGGTGGCCGTGGTGGCCGGCGTGGCGCTGGGA  
CTGGGGGTGTGGGGGCGGCGGCTGGCGTGGCGGCGGAGCGCTTGACCGCCTTCGTCTTCCCG  
GGCAGACTGCTGCTGCGTCTGCTGCGGATGATCATCTTGGCCCTGGTGGTGTGCAGCTTGATCGGCGGC  
GCGCCAGCCTGGACCCCGGCGGCTCGGCGCTTGGGCGCCTGGGCGCTGCTCTTTTTCTGGTCACC

**Results:**

Forward Primer	Pos	Len	Tm	Reverse Primer	Pos	Len
AACCTGCTTGTGCTGCTGAC	153	20	64.07	CAGTACCAGGAGCCCATGGA	962	20
ACCTGCTTGTGCTGCTGAC	154	19	63.61	CAGTACCAGGAGCCCATGGA	962	20
TGGTGTGCAGCTTGATCGG	322	19	63.38	CAGTACCAGGAGCCCATGGA	962	20
TGGTGTGCAGCTTGATCGG	322	19	63.38	CAGTACCAGGAGCCCATGGA	962	20
ATGATCATCTTGGCCGCTG	303	18	57.97	TGAAGAGGAAGTAGATGAGGG	984	21
ATGATCATCTTGGCCGCTGGT	303	20	62.49	CGGGTGAAGAGGAAGTAGATGAG	988	23

**Şekil 4.2.** ASCT2 ekstrasellüler dizisine spesifik primerlerin PerlPrimer programı ile tasarlanması

#### 4.2.7. PZR Reaksiyonu

Primerlerin bağlanma kalitesinin en iyi hangi sıcaklıkta olduğunu tespit etmek için touch-down PZR gerçekleştirilir. Böylece spesifik olmayan amplifikasyonun azalması sağlanır. PZR'nin erken sikluslarında hedef optimumbağlanma (annealing) ısısından daha yüksek ısı ile başlanır. Primer bağlanma ısısı her siklusta yavaş yavaş azaltılarak optimum ısıya kadar ulaşılır ve kalan sikluslar bu ısı ile tamamlanır. Bu yaklaşım ilk sikluslarda daha spesifik bir bağlanma sağladığından doğru ürünün non spesifikler aleyhine artırılmasını sağlar. Fermentas PZR reaktifleri bu deney için kullanılmıştır. Çizelge 4.3'te gösterilen bileşenler (enzim hariç) -20 dolabından çıkarılır ve eriyene kadar beklenir. Bu esnada PZR tüpleri isimlendirilir. Örnek tüpü, cDNA negatif kontrol tüpü, PZR negatif kontrol tüpü olmak üzere üç tüp'lük PZR mix hazırlanır. Bileşenlerin tamamı eridiğinde vortekslenir. Çizelge 4.3.'de ki bileşenlerin miktarlar sırası ile eklenir ve sonunda bileşenler pipet ile iyice karıştırılır. DNaz-free tüp ve pipet uçları kullanılır. Hazırlanan tüpler buz üzerinden alınır cihaza koyulur.

**Çizelge 4.3.** ASCT2 ekstrasellüler bölgesinin çoğalması için kurulan touch down PZR mix

Bileşen	Miktar
Nukleaz'sız su	32 µl
10 X Reaksiyon mix	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
10 pmol İleri primer	2.5 µl
10 pmol Geri primer	2.5 µl
cDNA	2.5 µl
Fermentas Taq Enzim	1 µl
Toplam hacim	50

**Çizelge 4.4.** Touch down PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	
Denatürasyon	95°C	1 dak	<b>20 Siklus</b> Her siklusta sıcaklık 0,5 °C düşer
	95°C	30 san	
Primer Eşleşmesi	65 °C	1 dak	
Primer Uzaması	72 °C	1 dak	
Denatürasyon	95°C	1 dak	20 siklus
	95°C	30 san	
Primer Eşleşmesi	60 °C	1 dak	
Primer Uzaması	72 °C	1 dak	
	72 °C	5 dak	

**Çizelge 4.5.** İkinci defa kurulan Touch-down PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	
Denatürasyon	95°C	1 dak	20 Siklus
	95°C	30 san	
Primer Eşleşmesi	65 °C	1 dak	
Primer Uzaması	72 °C	1 dak	
Denatürasyon	95°C	1 dak	20 siklus
	95°C	30 san	
Primer Eşleşmesi	55 °C	1 dak	
Primer Uzaması	72 °C	1 dak	
	72 °C	5 dak	

Alınan sonuçlar neticesinde PZR optimizasyonuna devam edildi. Çizelge 4.5'teki PZR koşullarında primer bağlanma aşamasının sıcaklığı bir öncekinden farklıdır. Hazırlanan reaksiyona diğerinden farklı olarak 5X GC High Enhancer Reaksiyon tamponu eklenmiştir. Kurulan bu reaksiyon ile birlikte optimizasyon gerçekleşmiş ve elde edilen ürünün reamplifikasyonu yapılarak daha fazla miktarda elde edilmeye çalışılmıştır.

#### 4.2.8. Agaroz Jelde Yürütme

PZR'nin gerçekleşip gerçekleşmediği anlamak için ürünler %2 agaroz jel elektroforezi ile analiz edilir. 2 gr agaroz tartılır, 1xTAE içinde mikrodalga fırın içerisinde çözülür. Jel dökülüp donduktan sonra 2 µl 5x yükleme tamponu, 8µl PZR örneklerinden eklenerek 80V'da 60 dakika yürütülür. Stok etidyum bromürden saf su ile karıştırılarak hazırlanmış etrafı kapalı kutu içerisine koyulmuş sıvıda, jel 15 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir. Etidyum bromür boyamasından sonra Biorad VersaDoc 1000 görüntüleme cihazında görüntüsü alınır.

#### 4.2.9. Guanidin DNA Saflaştırılması

DNA saflaştırması PZR'den gelen primer, dNTPler, enzimler, tuzlar ve diğer kontaminasyonların uzaklaştırılmasını sağlamak için yapılır. +4°C dolabından malzemeler alınır ve buz üzerinde erimeye bırakılır. Ayrı bir eppendorf tüp içerisinde Çizelge 4.2-4'te

bileşenlerden verilen miktarlarda koyulur. Sodyum-asetat eklendiğinde tüpteki karışım sarı renge dönüşmelidir. Sonunda hazırlanan karışım filtrelili tüpe aktarılır. 2000 g' de 30 saniye santrifüj (sıcaklığı +4°C) edilir. Aşağı düşen sıvıdan kurtulunur. Filtre 500 µl 2-propanol ile 2000 g'de 30 saniye de iki defa yıkanır. Buraya kadarki kısımda aşağı inen süpernatandan kurtulunur. Silika filtre 10,000 g'de 2 dakika santrifüj ederek kurutulur. Filtrenin altı temiz bir eppendorf tüp ile değiştirilir. Filtreye değmeneden üzerine gelecek şekilde 50 µl DEPC'li su eklenir, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 10,000 g'de 2 dakika santrifüj ile saf ürün elde edilir. Filtredeki tüm örneği toplamak ve yoğunlaştırmak için alttaki örnek, filtreye tekrar yüklenerek işlem iki defa tekrarlanır.

**Çizelge 4.6.** Guanidin DNA saflaştırma protokol bileşenleri

DNA saflaştırma protokol	Stok	Çalışan	550 µl
<b>GuSCN</b>	8.00 M	4.30 M	295.63
<b>Na2SO3</b>	2000 mM	50 mM	13.75
<b>Bromtimol mavisi</b>	100 X	20 X	1.10
<b>NaAsetat pH 5.2</b>	3000 mM	21.5 mM	3.94
<b>DNA</b>			100
<b>H<sub>2</sub>O</b>			135.58

#### 4.2.10. Plazmit ve PZR Ürünlerinin Kesilmesi

Hedef bölgeyi vektörün içine sokabilmek için hem vektörün hem de PZR ürünün restriksiyon enzimleri ile tanıma bölgelerinden kesilmesi gerekir. NheI ve HindIII enzimleri kullanarak restriksiyon gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.7'te gösterildiği miktarlarda tüp içerisine koyulur, 37°C de 2 saat kesilmeye bırakılır. PCR cihazının kapağı ısıtılmaz.

**Çizelge 4.7.** Restriksiyon protokol bileşenleri

Tepkime hacmi 50 µl		Stok		Tüp		Hacim (µl)	
H2O						41.65	0.5
pET28A plazmit	ASCT PCR ürünü	5.4 µg/µl	0.07 µg/µl	10 µg	3 ug	1.85	42
Neb2 tampon		10x		1x		5	
BSA		1000 µg/ml		10 µg/ml		0.5	
NheI		10 U/µl		10 U		1	
HindIII		10 U/µl		10 U		1	

Kesilen ürünlerin saflaştırılması için Guanidin DNA saflaştırma protokolü uygulanır. Nanodrop'ta DNA miktarı ve saflığı ölçülür. Bu ürünler -80°C dolapta saklanır.

#### 4.2.11. Ligasyon

Ligasyon işleminde en çok dikkat edilmesi gereken işlemlerden biri vektör:insert oranıdır. Yapılan deneylerde sırasıyla 1:1, 1:5 ve 1:10 olarak vektör: insert konsantrasyonları denenmiştir. Promega biomath web sitesinden plazmit/DNA uzunluğu ve ölçülen OD değeri girilerek stok konsantrasyon hesaplanır. Vektör:insert oranı 1:10 yapıldığında başarılı bir transformasyon gerçekleştirdiği sonucu yapılan deneyler sonucunda karar verilmiştir. Çizelgede verilen miktarlarda tüplere sırasıyla malzemeler eklenir. Cihaz kapağı ısıtılmadan 22°C'de 2 saat inkübe edilir. Ürün -80°C dolapta saklanır.

#### Çizelge 4.8. Ligasyon protokol bileşenleri

Tepkime hacmi 20 µl	Stok	Tüp	1X
H2O			7.82
T4 ligaz tamponu	10 X	1 X	2
Vektör 1:10	0.0014 pmol/µl	0.010 pmol/µl	7.14
Insert	0.049 pmol/µl	0.0100 pmol/µl	2.04
T4 ligaz	5 U/ µl	5 U	1

#### 4.2.12. Transformasyon

*E.Coli* JM 109 gliserol bakteri stoğundan 10 µl alınır ve 20 ml LB besiyerinde 37°C'de çalkalayıcı etüvde 1 gece kültüre edilir. Ertesi gün ısıtılmış 50 ml LB içerisine 500 µl overnight büyütülmüş kültürden koyulur. 37°C'de 2 saat kadar çalkalamaya bırakılır. Kültür bulanıklığı ne çok ne de çok az olmamasına dikkat edilir, hücrelerin eksponensiyel fazını kaçırmamak için özen gösterilir. Soğutulmuş santrifüjde, 580 G'de 10 dakika hücreler toplanır. Besiyeri süzdürülür, ters çevrilerek peçete üzerinde iyice sıvının akması sağlanır. Buz üzerinde 300-400 µl TSS (Transformation and Storage Solution) eklenir. Karışım vortekslenmeden el ile tüp hafifçe karıştırılır. Hücreler TSS eklendikten sonra yarım saat buz üstünde inkübe edilir. Aktarılabilecek ligasyon ürünleri cam tüplere hazırlanır (her tüpe 5 µl kadar ürün). Transformasyon verimliliğini görmek için kontrol olarak boş pET28A plazmiti kullanılır. TSS içinde çözülmüş hücreleri DNA'ların üzerine 100 µl olacak şekilde eklenir. 1 saat buz üzerinde tüpler inkübasyona bırakılır. Buz inkübasyonu sonrası 42°C'deki su banyosunda 90 sn inkübe edilir, ve su banyosundan tüpler hemen buza

alınır. Üstlerine yaklaşık 900 µl ısıtılmış Soc Buyyon eklenir. Çalkalayıcıda 37°C’de 45 dakika kadar çalkalamaya bırakılır. Çalkalayıcıdan aldıktan sonra LB Kan agar plate’lere ekim yapılır. Ekimden önce 13,000 g’de 2 dakika çevirip yoğunlaştırılır ve konsantre halde içinde 200 µl kadar besiyeri kalmış halde bek alevi kullanılarak drigalski spatülü ile ekim yapılır. Gece boyu 37°C’ye bırakılan petrielerde plazmiti almış bakteriler koloni oluşturur.

#### 4.2.13. T7 Koloni PZR

Petrielerde oluşan E.coli kolonilerinin plazmiti içeri alıp almadığı hızlı bir şekilde gözlemek için T7 koloni PZR yapılır. Seçici petrielerde 16 saat inkübe edilmiş olan kolonilerin beyaz olanları steril kürdan yardımıyla seçilerek 10 µl dH<sub>2</sub>O içerisine çözülür. Çizelge 4.9’da açıklandığı şekilde PZR karışımı hazırlanır. Kalıp DNA yerine 1µl koloni kullanılır ve PZR ile pozitifsonuç veren kolonilerin kalan 9µl’lik kısmı uygun antibiyotik içeren sıvı besi yerine ekilir.

**Çizelge 4.9.** T7 PZR reaktifleri

Toplam hacim 15 µl	Hacim (µl)
10X Taq buffer	1.5
10 mM dNTP	0.75
T7 ileri primer	0.6
T7 geri primer	0.6
25 mMMgCl <sub>2</sub>	0.9
dH <sub>2</sub> O	4.65
Taq enzim	1
DNA	5

**Çizelge 4.10.** T7 PZR Koşulları

	Aşama	Sıcaklık	Süre
40 siklus	<b>Denatürasyon</b>	94°C	120 sn
		94°C	10 sn
	<b>Primer Eşleşmesi</b>	54°C	60 sn
		<b>Primer Uzaması</b>	72 °C
		72 °C	720 sn
		10 °C	forever

#### **4.2.14. Alkalen Lizis Midi Prep ile Plazmit İzolasyonu**

50 µg/ml kanamisin eklenmiş 10 ml LB'ye transformasyonu yapılmış ve seçici antibiyotik ile seçilmiş bakteriler inoküle edilir. Bir gece 37°C çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakılır. Sonrasında 2.000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilip besiyeri uzaklaştırılır. Pellet 200 µl soğuk alkelen liziz 1 çözeltisinde (Tris, EDTA, glikoz ve RNase A içerir.) vorteksenerek süspansiyon edilir ardından taze hazırlanmış alkalen liziz 2 çözeltisinden (sodium hidroksit (NaOH) ve deterjan Sodyum Dodesil (lauryl) Sülfat (SDS)) 400 µl eklenip 5 defa ters yüz edilerek karıştırılır. Daha sonra 300 µl alkalen liziz 3 çözeltisi (Potasyum asetat) eklenir ve 5 kez ters yüz edilir. Buz üzerinde 3-5 dakika inkübasyona bırakılıp ardından maksimum hızda 4°C' de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası 600 µl süpernatant temiz bir tüpe aktarılıp eşit hacimde fenol kloroform eklenir ve vorteksenir. Maksimum hızda +4°C'de 2 dakika santrifüj edilir ve üst faz temiz bir tüpe dikkatlice alınıp. 600 µl izopropanol eklenir ve vorteksenir. -20°C ye kaldırılıp gece boyu bekletilir. Maksimum hızda 5 dakika santrifüj edilir ve pellet düşürmeden izopropanol uzaklaştırılıp üzerine 1 ml etanol eklenip maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilir. Son olarak etanol uzaklaştırılıp 30-60 µl DNAaz içermeyen suda pellet çözülür. Nanodrop'da plazmit DNA miktarları ölçülür ve plazmit DNA'sının kalite tayini için agoroz jelde yürütülür.

#### **4.2.15. Plazmit Sekansı**

Hedef bölgenin tamamının pET28A vektörüne girdiğini teyit etmek için plazmid sekansı yapılır. İlk olarak T7 ileri ve geri primerleri ile elde edilen construct plazmide PZR kurulur. T7 primerleri kullanılmasının temel amacı vektör T7 promotorunu içermektedir ve hedef bölge hemen promotordan sonraki kısımda birleştirilmiştir. Promotor bölgelerine spesifik T7 primerleri ile kurulan PZR ürünleri %0.2'lik agoroz jelde yürütülür. 576 bp boyundaki hedef sekansın vektöre girmesi, promotorun içerisinde primerlerin bağlanması ile dahil olan fazladan 207 bp'lik bir bölge ile birlikte toplam boyu 783 bp olan bir ürün ortaya çıkması beklenir.

Elde edilen PZR ürünü guanidin tiosiyanat ile kolondan geçirilerek saflaştırılır. Saflaştırılmış ürün tekrar %2'lik agoroz jelde yürütülüp temiz bir bant görünüşü alındıktan sonra siklus sekansı yapılır. Siklus sekansının amacı işaretli dNTP'ler kullanarak okunması istenen diziyi işaretleyerek sekans cihazında görünür kılmaktır. 2 µl



T7 primer, 8µl premix ve 10µl PZR ürünü ile buz üzerinde bir tüp içerisinde karıştırılır. Thermalcycler içerisinde Çizelge 4.11'deki gibi bir programda çalıştırılır.

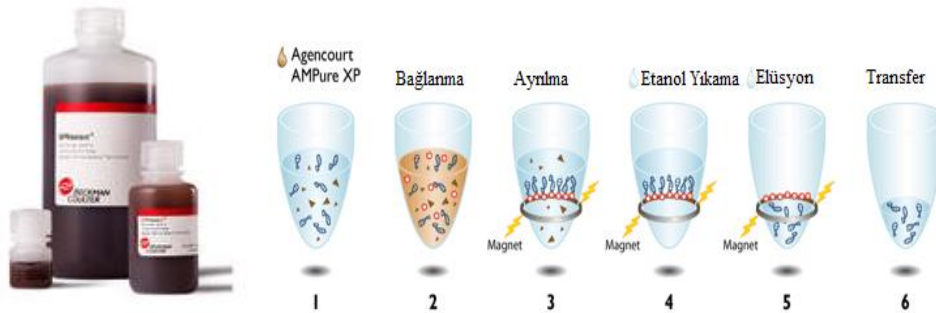
**Çizelge 4.11.** T7 Primerleri ile Siklus PZR Koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	
Denatürasyon	96°C	20 san	<b>30 Siklus</b>
	96°C	20 san	
Primer Eşleşmesi	52 °C	20 san	
Primer Uzaması	60 °C	4 dak	
Son sıcaklık	4 °C	Sonsuz	

Tüplerdeki reaksiyonu durdurmak ve içindeki kullanılmamış reaktiflerin aktifliğini durdurmak için stop solusyonu PZR bitmeye yakın hazırlanır. Bu solusyon oda sıcaklığında hazırlanmalıdır. Oda ısısında uzun süre bırakıldığında EDTA'nın çökmesine neden olacaktır bu yüzden oda sıcaklığında uzun süre bekletilmemelidir. Hazırlanan Stop solusyonundan (Çizelge 4.12.) 10.8 µl olacak şekilde reaksiyon tüplerinin üzerilerine dağıtılır. Elde edilen bu ürüne sekansa girmeden önce bir saflaştırma protokolünün daha uygulanması gerekir. Saflaştırma manyetik boncuklar yardımı ile yapılır.

**Çizelge 4.12.** Stop Solusyon Reaktifleri

Reaktif	Miktar
3M sodyum asetat pH 5.2	2.2µl
0.5 M Na <sub>2</sub> EDTA pH 8.0	2.2µl
20 mg/ml Glikojen	1.1µl
ddH <sub>2</sub> O	4.5µl



**Şekil 4.3.** Manyetik boncuklar ve saflaştırma adımları



**Şekil 4.4.** Manyetik plate

Saflaştırılacak olan ürünlerin üzerine 24 µl Beckman Coulter AgenCourt Clean Seq manyetik boncuklar ve 110 µl %73'lik isopropil alkol eklenir. 20-25 defa pipetting yapılır. 15 dakika odasıcaklığında inkübe edilir. Tüpler daha sonra manyetik plate'e yerleştirilir ve 5 dakika plate üzerinde inkübe edilir. Boncuklar tüpe belli bir yükseklikte halka şeklinde hedef ürünleri kendisine bağlayarak tutunmuştur. Tüp içerisindeki solüsyon pipet yardımı ile bocuklara zarar vermeden atılır. Üzerine 200 µl %73'lük isopropil alkol eklenir ve 5 dakika inkübasyon sonunda üzerindeki sıvı çektilir. 2. kez alkol eklenir ve yıkama yapılır. 5 dakika inkübasyonun sonunda manyetik plate üzerinde olan tüpler 20 dakikainkübasyona bırakılır ve alkolün kuruması sağlanır. -20°C'de saklanan SLS solusyonu inkübasyonun bitimine doğru dolaptan çıkarılır ve erimesine izin verilir. SLS elüsyon tamponunun uzun süre dışarıda bırakılmamasına özen gösterilir. İnkübasyonun sonunda tüpler plate'den kaldırılarak 45 µl SLS solusyonu eklenir ve 20-25 defa pipetting yapılır. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 5 dakikada manyetik plate üzerinde inkübasyona bırakılır. Halka şeklinde boncuklar tüpe bağlanmış dururken tüpler plate üzerinde çıkarılıp 45° açı ile duracak şekilde konur ve pipet ile boncuklara değmeden içindeki sıvı çekilir. Sekans cihazına koyulacak plate üzerine saflaştırılmış ürün eklenir. Buharlaşmayı engellemek için üzeri bir damla mineral-oil ile kaplanır. Cihaz çalıştırılır, program bittikten sonra analiz programı ile data analiz edilir.

#### **4.2.16. BL21 Hücrelerine Transformasyon**

Koloni PZR sonucunda pozitiflik gösteren kolonilerden elde edilen plazmitler, BL21 hücrelerine hedef dizinin translasyonu ve protein eldesi için transforme edilir. Transformasyonprotokolü kullanılan organizmanın BL2 olması dışında tüm tamamı aynıdır. Burada 9 sağlıklı koloni 50 ml LB Kan içerisine inokule edilir ve 37°C'de kültüre edilir. Uygun bulanıklık gözlendikten sonra 2X IPTG'li besiyeri (%2 tripton, 1 mM IPTG, 0,05 mg/ml Kan, LB) üzerine ilave edilir ve overnight 30°C'de çalkalamalı inkübatörde

kültür edilir. Koloniler içerisinde genel protein içeriğini gözlemlemek için protein izolasyonu ve ardından SDS-PAGE yapılır.

#### **4.2.17. BL-21 Hücre Lizisi ve SDS-PAGE**

Kültüre edilmiş BL-21 hücreleri falkon tüplere aktarıldıktan sonra 5,000 g'de 10 dakika soğuk santrifüjde (+4°C) çevrilir. Besiyerinden kurtulunur. Oluşan pelletin ufak bir kısmı steril kürdan ile alınır yükleme tamponu ile karıştırılarak SDS-PAGE'te kullanılmak üzere ayrılır. Kalan pellet 2-5 ml lizis tamponunda (50mM Tris, 400mM NaCl, %10 Gliserol, %1 Triton X100, %1 SDS, dH2O) iyice karıştırıldıktan sonra cam tüplere aktarılır. 15 dakika soğuk odada santrifüj edilir. Ardından buz üzerinde ultrasonikatörde 20 saniye (toplamda 3-4 dakika) tutularak bütün hücrelerin tamamen parçalanması sağlanır. Maksimum hızda 13.000 g'de +4°C'de 15 dakikalık santrifüjün ardından süpernatant temiz bir tüpe alınır ve protein tayini yapılır.

#### **4.2.18. HepG2 Hücrelerinin Lizis Edilmesi ve Protein Eldesi**

Lizis işlemi için kullanılan MRIPA tampon BL-21 *E.coli* bakteri süşunun parçalanması için kullanılan lizis tamponununundan farklıdır. MRIPA tampon daha çok ökaryotik hücre dokuların parçalanması için kullanılır. HepG2 hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda glutamin ile indüklenmesi sonucunda kültür edilmiş hücreler flaskın yüzeyini kapsayacak şekilde (T75 flask için 500 µl MRIPA eklenebilir) MRIPA eklenir ve kazıyıcı ile hücreler kaldırılır ve parçalanır. Parçalama işleminin daha verimli olması için mikroskop altında bütün hücrelerin kaldırıldığından emin olduktan sonra pipet yardımı ile hücreler 10-20 kez resuspend edilir. Daha sonra sonikatörde buz üzerinde 5 dakika parçalamaya devam edilir. Solusyonun açık sarı renge dönüşmesi hücrenin parçalanabildiğini ve protein açığa çıktığını ifade etmektedir. Sonikasyondan sonra temiz bir mikrosantrifüj tüp içerisinde +4°C ile 13,000 rpm de santrifüj edilir. Pellet kısmına pipetin ucu değdirilmeden süpernatant alınır ve temiz bir tüpe aktarılır. -20°C'ye proteinler kaldırılmadan önce protein konsantrasyon tayini yapılır.

#### **4.2.19. Protein Konsantrasyon Tayini**

Protein tayini için BCA (bikinkoninik asit) protein tayin kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde çıkan albumin standart ampüleri kullanılarak 2mg/ml, 1.5mg/ml, 1.0 mg/ml, 750 µg/ml,

500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 50 µg/ml lık standart protein çözeltileri HPLC H<sub>2</sub>O içerisinde hazırlanır ve ikişer tekrar yapılarak standart protein çözeltilerinden 25'er µl kuyucuklara dağıtılır. Ayrıca blank için iki kuyuya sadece HPLC H<sub>2</sub>O konur. Hücre lizatlarından bir miktar alınmış 1/5 oranında HPLC H<sub>2</sub>O ile dilüe edildikten sonra 25' er ul 96 lık plate kuyucuklarına ikişer tekrar yapılarak dağıtılır. BCA kiti içerisindeki A ve B ajanları 1/50 oranında karıştırılıp her bir kuyucuğa 200 µl ilave edilir, ardından 37°C' de 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılır. Sonrasında ise 562 nm'de spektrofotometride okuma yapılır. Çıkan değerler excell'e aktarılır ve standartların değerlerinden standart eğri grafiği excelle çizdirilir. Regrasyon tahmin denklemi excell tarafından hesaplanır. Ayrıca R<sup>2</sup> değeri de hesaplanır. R<sup>2</sup> değeri ne kadar 1'e yakınsa sonuçlar o kadar güvenilir demektir. Denklem üzerinde x değeri yerine hücre lizatlarımızın absorbans değerleri yerleştirip y değerleri hesaplanır. y değeri her bir örneğin protein konsantrasyonunu gösteririr ancak bu değer dilüsyon sonrası değerdir. Bu yüzden çıkan sonuçlar dilüsyon faktörü ile çarpılır. Bu şekilde elimizdeki hücre lizatlarının protein konsantrasyon değerleri hesaplanır.

#### **4.2.20. SDS PAGE**

Kullanılacak jelin yüzdesine, sayısına ve miktarına bağlı olarak hesaplamalar yapılır. Yürütme jeli olarak % 12 lik SDS PAGE hazırlanmıştır. 10 ml için 3.264 ml H<sub>2</sub>O, %30 luk akrilamid (29.2 g akrilamid, 0.8 g bisakrilamid) stok çözeltisinden 4 ml , 1.5 M tris tamponundan (pH 8.8 ) 2.532 ml, %10 SDS stok çözeltisinden 100µl konulmuştur. Polimerizasyon reaksiyonunda başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS) kullanılır. APS %10 olacak şekilde 30 mg tartılıp 300 µl H<sub>2</sub>O'da çözülmüştür. 100 µl taze hazırlanmış APS ve 10 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin) ilave edilir. Yürütme jeli karıştırılıp uygun şekilde yerleştirilmiş camlar arasına her jel için 5 ml hızlıca polimerleşme gerçekleşmeden dökülür. Üzeri % 20 izopropanol ile kapatılır. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol dökülür ve distile su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile su iyice kurutulur. Üst jel yani istifleme (stacking) jeli %5 lik hazırlanır. Total 4 ml hacim için 2.760 ml H<sub>2</sub>O, 657 µl %30 stok akrilamid, 500 µl 0.5 M tris tamponu (pH: 6.8) , 39 µl %10 SDS çözeltisi, 39 µl taze hazırlanmış APS, 4 µl TEMED eklenir. Karıştırılıp yürütme jelinin üzerine dökülür ve üzerine çalışmamız için uygun tarak yerleştirilip polimerleşmesi beklenir.

#### **4.2.21. Örneklerin Hazırlanması**

BL21 hücre lizatlarından ve HepG2 hücrelerinin farklı koşullarda glutamin konsantrasyonu ile mumale edilmesi elde edilen protein örnekleri ayrı ayrı jelde yürütülmüştür. Hücre lizatları jele yüklenirken her kuyucuğa eşit miktarda protein yüklemek önemlidir. Bu yüzden hücre lizatlarının protein tayin sonuçlarına bakılıp en az konsantrasyonda protein içeren hücre lizatı baz alınarak her kuyucuğa eşit miktarda protein gelecek şekilde hesaplama yapıp ardından uygun miktarda hücre lizatları örnek tamponu (Laemmlı tamponu, % SDS, 20% gliserol, 10% 2-merkaptoetanol, 0.004% brom fenol mavisi ve 0.125 M Tris HCl, pH 6.8) içerisinde 95°C'de 5 dakika kaynatılır.

#### **4.2.22. Jele Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütülmesi**

Yürütme tankının içerisi yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS) ile doldurulup, jel tankın içerisine yerleştirilir. Hazırlanan jelin tarağı dikkatlice çıkarılıp örnekler tarakların oluşturduğu kuyucuklara yüklenir. Yürütme tamponunu jelin her tarafına temas etmesi akımın geçmesi açısından önemlidir. Elektrotlar dikkatlice güç kaynağına bağlanır ve yürütme her jel için 15 mili amperde yaklaşık 2 saat olacak şekilde gerçekleştirilir

#### **4.2.23. Coomassie Boyaması**

Örnekler yürütüldükten sonra jel dikkatlice sistemden çıkarılır. Coomassie brilliant blue R-250 ile boyanmadan önce %20 izopropanol %10 asetik asit içeren fiksatif içinde 45 dakika fiksasyona bırakılır. Ardında coomassie brilliant blue R250 boyası (3 g/L coomassie brilliant blue R-250, %45 methanol, %10 glasiyel asetik asit, %45 dH<sub>2</sub>O) ile gece boyu boyanıp ertesi gün fazla boyadan kurtulmak için destain çözeltisine (50ml glasiyel asetik asit, 100 ml methanol, 370 ml H<sub>2</sub>O) alınıp arka plandaki boya gidene kadar bekletilir (yaklaşık 20-25 dakika) ve ardından jel VersoDoc cihazında coomassie boya sekmesi seçilerek görüntülenir.

#### **4.2.24. Affinite Kromatografisi ile Protein Saflaştırması**

Kolonilerden protein eldesi yapıldıktan sonra SDS poliakrilamid jelde hangi koloninin daha iyi proteini ifade edebildiğine karar verilir. Seçilen koloni daha büyük hacimde

IPTG'li besiyerinde kültüre edilir lizis protokolü uygulanır. Elde edilen protein lizati örneği affinite kromatografisi'nde kullanılır. HisPur Ni-NTA Resin ve kiti kullanılır. Kitin verdiği talimatlar doğrultusunda protokol uygulanır. Kolon yapısını muhafaza etmek için içerisinde solüsyona sahiptir. Kolon +4°C dolaptan çıkarılır, 50 ml hacmindeki falkon tüpe yerleştirilir. 700 g'de 2 dakikasantrifüj yapılarak sıvıdan kurtulunur. Kolon kapağı açılarak üzerine 6 ml dengeleme (Equilibration) tamponu (PBS- 10mM imidazol) eklenir. 700 g'de 2 dakikasantrifüj edilir, kolon düşük konsantrasyonda imidazol ile nonspesifik bağlanmaları engellemek ve PBS tamponu ile kolonun pH'sını ayarlamak için muamele edilmiştir. Hazırlanan 6 ml protein ekstraktı kolona ilave edilir. Kolonun ucuna kitin içerisinden çıkan bir tıpaç takılır ve yine falkon tüpe yerleştirilir. Oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Burada hedef proteine bağlı histidin tag'ler imidazol ve kolondaki nikel ile kompleks oluşturacak ve kolona tutulmasını sağlayacaktır. İnkübasyon sonunda temiz falkona yerleştirilmiş kolon 700 g'de 2 dakika çevrilir. Alta geçen sıvı flow through1 olarak isimlendirilir ve hedef protein dışındaki proteinlerin bir kolona tutunmadan aşağı iner. 6 ml hazırlanan yıkama tamponu (PBS-50mM imidazol) ile 700 g'de 2 dakikasantrifüj edilir. Bu işlem iki defa tekrarlanır. Purifiye edilmek istenen proteinleri kolondan ayırt etmek için 6 ml elüsyon tampon (PBS-200Mm imidazol) kolona ilave edilir. Kolonun ucuna tıpaçı takılır ve 10 dakika oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Sonrasında temiz bir falkon içerisine yerleştirilerek 700 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Kolondaki histidin tag'li proteinler imidazol ile bağlanma yarışına girerler ve imidazol daha yoğun olduğu için kolondaki nikel iyonlarına daha çok bağlanma affinitesi gösterir. Bu şekilde hedef protein yaklaşık %90 oranında purifiye halde elde edilir. Bu işlem 2 defa daha tekrarlanır. Elde edilen protein çözeltisindeki tuzlardan kurtulmak için desalting işlemi yapılır.

#### **4.2.25. Protein Desalting Protokolü**

Saflaştırılmış proteini tuzdan uzaklaştırmak için Pierce D-Salt Poliakrilamit Plastik Desalting kolonları kullanılmıştır. Kolon 15 ml falkon tüp içerisine yerleştirilir. Kolon içerisinde %0.02 sodyum azid bulunan saklama solüsyonu 1000 g'de 10 dakika santrifüj ile uzaklaştırılır. Kolonu hazır hale getirmek için 0.2 M amonyun bikarbonat (pH 8.0) dengeleme tamponundan kolona 4 ml eklenir. 10 dakika orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Sonrasında 1000 g'de 10 dakika santrifüjlenir. Düşen sıvıdan kurtulunur. Kolonun ağzı tıpaç ile kapatıldıktan sonra 2 ml protein solusyonu kolona aktarılır. Oda sıcaklığında 10

dakika orbital çalkalıyıcıda inkübe edilir. Temiz bir falkona kolon yerleştirilir ve 1000 g'de 10 dakika santrifüj ile protein solusyonu elde edilir. Spektrofotometrede 280 nm proteinin absorbans değeri ölçülür. Kolonlar birkaç defa daha kullanılabilmesi için, PBS (100mM sodyum fosfat, 150mM NaCl, pH 7.4) tamponu ile 2 defa yıkanır. 4 ml 0.15 M NaCl ve % 0.02 sodyum azid içerisinde kolon saklanır.

#### **4.2.26. Antijen Hazırlanması**

Her Balb/C dişi fare için 20 µg ekstrasellüler ASCT2 rekombinat proteini 1 birim olacak, freund complete adjuvan 1 birim olacak şekilde toplamda 500µl hazırlanır. Complete freund adjuvanı sadece ilk immunizasyon aşamasında kullanılır. Bir sonraki immunizasyonlarda antijen: freund incomplete adjuvan oranı 1:9 olarak hazırlanır.

#### **4.2.27. İmmünizasyon**

3 adet dişi Balb/C fareye sıfırinci günde freund complete adjuvan içerisinde hazırlanmış 20µg ASCT2 rekombinat proteinin intraperitonelenjeksiyonu yapılır. İkinci enjeksiyon 15 gün sonra, freund incomplete adjuvan içerisinde hazırlanmış 10µg antijen intraperitonel olarak gerçekleştirilir. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra, 45. günün sonunda hayvanların periton boşluklarında oluşan sıvılar toplanmaya başlamıştır. 60 gün sonunda hem karın içi boşluktan toplanan sıvılar hem de kuyruk veninden alınan kandaki serum -20°C'de uygun saklama koşullarında saklanır. Western blot yapılırken birincil antikor olarak bu örnekler kullanılacaktır.

Farelerin aniden ölmesi sebebiyle ikinci kez yeni bir dişi Balb/C farenin immünize edilmiştir. 30µg antijen her enjeksiyonda intraperitonel bölgeye verilmiştir. 15'er gün ara ile immunizasyona devam edilmiştir. 60. günün sonunda kuyruk veninden alınan serum ve karın içi boşluğundan alınan sıvı ile tekrar western blot yapılmıştır ve bu örnekler birincil antikor olarak kullanılmıştır.

#### **4.2.28. Antikor Titrasyonu**

2 µg/ml ve 4 µg/ml ASCT2 rekombinant proteini sodyum karbonat tampon çözeltisinde hazırlanır. 96 lık ELISA platede kuyucuk başına 100 µl dağıtılır. 1 gece +4°C'de inkübasyon süresinin ardından 200µl PBS-tween ile 3 kez yıkanır. Plate'de kalan solusyonlardan tamamiyle kurtulmak için peçete üzerine ters çevrilerek vurulur. Bloklama için PBS-T içinde hazırlanmış %5'lik süt tozu kullanılır. Her kuyucuğa 200 µl bloklama tamponu konur. 1 saat 37°C'de, 1 saatoda sıcaklığında inkübasyonuna bırakılır. Ardından primer antikor olarak kullanılacak poliklonal ascites ve serum örneklerinin 1:100, 1:1.000,1:10.000, 1:50.000, 1:100.000, 1:1000.000 olacak şekilde dilüsyonları hazırlanır. Dilüsyonlar PBS ile yapılır. PBS negatif kontrol olarak kullanılır. Hazırlanan primer antikorlardan her kuyucuğa 100 µl eklenir ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat bekletilir. 2 saatin ardından 200 µl PBS tween ile 3 kez yıkanır. Sekonder antikor olarak 1/5000 oranında PBS içinde dilüye edilmiş HRP işaretli anti mouse IgG antikorunu kullanılır. PBS içinde dilüye edilen sekonder antikordan kuyucuklara 100'er µl eklenir ve çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilir. Bu sürenin ardından PBS tween çözeltisiyle 3 kez yıkama yapılır. HRP'nin substratı TMB ((3,3',5,5'-tetramethylbenzidine))'den 100 µl eklenir ve karanlıkta 15 dakika bekletilir. 2M Sülfirik asit çözeltisinden 50 µl eklenir ve 450 nm dalga boyuna spektrofotometrik plate okuyucuda ölçümü yapılır.

#### **4.2.29. Western Blot**

SDS(sodyum dodesil sülfat) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) için jel hazırlanır. Yürütme jeli olarak % 12 lik, üst jel yani istifleme (stacking) jeli %5 lik hazırlanır. Rekombinant proteinin SDS-PAGE sisteminde yürütüldüğü protokol ile aynıdır.

##### **4.2.29.1. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi**

Jel yürütmesinin tamamlanmasının ardından jel dikkatlice çıkarılır ve jele uygun büyüklükte PVDF membrane kesilir. PVDF membran 3-5 dakika metanolde bekletilerek kuru olan membranın rehidrasyonunu sağlanır. Jel ve membran soğuk transfer tamponu (48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.04% SDS, 20% methanol) içerisine alınır ve yaklaşık 10 dakika yavaşça çalkalanır. Transfer esnasında kullanılacak kurutma kağıdı ve süngerler transfer tamponunda ıslatılır. Transfer için biorad ıslak transfer düzeneği kullanılır. Proteinler eksi yüküyle yüklendikleri için jelden membrana geçişin eksiden artıya doğru



olacağı gözönünde bulundurularak jel ve membran ona göre yerleştirilir. Kurutma kağıtları ve sünger hem alt hem üst kısma yerleştirilir. Kurutma kağıtları, jel ve membran yerleştirildikten sonra hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilir. Transferde tankın içine buz kalıbı konulur. Tankın içerisine kurutma kağıdı, jel ve membranı koyduğumuz aparatlar yerleştirilip güç kaynağına elektrotlar dikkatlice bağlanıp 100V'da 1 saat transfer gerçekleştirilir. Membrana transfer olmuş protein bantlarını görmek için membran ponceau S boyasıyla 5 dakika kadar boyanır ve membrane distile H<sub>2</sub>O ile yıkanır.

#### **4.2.29.2. Membran Bloklaması**

Membranla antikolar arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için uygulanır. %5 BSA PBS tween içinde hazırlanır. Bloklama iki saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilir.

#### **4.2.29.3. Birincil Antikor Uygulaması**

Kullanılan primer antikolar; poliklonal ascites, ASCT2 antijeni ile immunize olmuş fare serumu, tubulin, anti-Neutral amino acid transporter (ASCT2) (Millipore, ABN73) poliklonal antikor'dur. Membran 1/1000 dilüsyonunda hazırlanmış poliklonal ascites, direk serum örneği ve beta-tubulin antikorunu ile gece boyu +4°C'de inkübe edilir. Ticari ASCT2 poliklonal antikor ise 1/250 dilüsyonunda hazırlanır ve gece boyu +4°C'de inkübe edilir. Primer antikor uygulamasının ardından membran 3 kez 10'ar dakika PBS tween ile yıkanır. Ticari olarak satın alınan ASCT2 poliklonal antikor sadece bir western çalışmasında çalıştırılabilmektedir. Diğer çalışmalarda çalıştırılamamıştır.

#### **4.2.29.4. İkincil Antikor Uygulaması**

İkincil antikor seçimi yapılırken birincil antikor ile aynı hayvana karşı üretildiklerine dikkat edilmelidir. Yani birincil antikor hangi hayvandan alındıysa ikincil antikorda da yine o hayvana ait olmalıdır. ASCT2'ye karşı farede ürettiğimiz poliklonal antikor için sekonder antikor olarak HRP işaretli anti mouse IgG 1/5.000 oranında dilüe edilerek kullanılır. Beta-tubulin antikorunu için de yine HRP işaretli anti mouse IgG (cell signaling 7076) 1/5.000 oranında dilüe edilerek kullanılır. Ticari ASCT2 poliklonal antikoruna sekonder antikor olarak anti rabbit IgG (cell signaling, #7074) 1/2.500 oranında dilüe

edilerek kullanılır. Dilüsyonlar bloklama çözeltisi yani %5 BSA PBS tween içinde yapılır. Sekonder antikor içerisinde membran yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilip ardından PBS tween ile 3 kez 10' ar dakika yıkanma yapılır.

#### **4.2.29.5. Membranın Görüntülenmesi**

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate kiti içerisindeki luminol ve peroksit içeren çözeltiler 1:1 oranında karıştırılır. Hazırlanan bu çözeltinin tüpü aliminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunur. 300 µl'lik substrat çözeltisi görüntü cihazına damlacıklar halinde homojen bir şekilde dağıtılır. Suyu peçete üzerinde süzdürülmüş membranın proteinlerin transfer edildiği taraf ile temas etmesine izin verilir. 2-3 dakika bekledikten sonra Kodak 4000MM Image Station cihazında görüntü alınır.

#### **4.2.29.6. Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi**

Western sonucu görüntülenen ascites sıvısındaki ASCT2, ticari ASCT2 proteinlerin bant kalınlıkları imajJ programı aracılığıyla değerlendirilmiş ve sayısal değerlere dönüştürülmüştür. Protein bantları tubulin ve aktin ile normalize edilmiştir.

#### **4.2.30. Fareden Dalak Alınması**

Monoklonal antikor üretimi için immunize edilmiş farenin B hücrelerinin en çok bulunduğu dalağının alınması öncelikle yapılması gereken adımlardan bir tanesidir. İmmünizasyon için Balb/C dişi fare (8-10 haftalık) kullanılmıştır. 3 defa (d0, d14, d21, d45) 10-30 µg ASCT2 proteinin ekstrasellüler kısmının ifade edilmesiyle elde edilen antijen enjekte edilmiştir. Adjuvan olarak Freund's adjuvanı kullanılmıştır. 45. günün sonunda fare serumundan ELISA yapılır; titrasyon değeri ölçülür. Hayvanın yeterince immunize olduğuna karar verildikten sonra, hayvan ilgili antijen ile boost edilir. Adjuvan kullanılmadan sadece ilgili protein yüksek dozajda hayvanın intraperitoneal bölgesinden enjekte edilir (200 µl). Böylece hayvanın çok miktarda antikor geliştirilmesi hedeflenmiş olur. Hayvan boynu kırılarak öldürülür. Fare %70 alkol ile temizlendikten sonra açılır. Aseptik teknikler kullanılarak dalak alınır ve petri dish içine aktarılır. Mesh üzerinde küçük parçalara kesilir. Yağ ve bağ dokudan uzaklaştırılmaya çalışılır. 10 ml enjektörün arka kısmı (plunger) ile iyice ezilir ve steril 15 ml falkon içerisine transfer edilir. 10 ml

serumsuz besiyeri ile 3 defa 800 rpm'de 5 dakika yıkanır. Supernatan'dan kurtulunur. FBS ile iyice karıştırılıp resuspend edildikten sonra içerisinde 100 µl DMSO bulunan criyotüp içerisine 900 µl aktarılarak ağzı sıkıca kapatılıp, karıştırılır ve çabucak -80°C dolaba kaldırılır.

#### **4.2.31. Antikor İzotiplendirmesi**

Her bir test için yaklaşık 450 µl diluye edilmiş antikor kullanılır. Antikor hibridoma süpernatanı, saflaştırılmış antikor ya da ascites sıvısı olabilir. Poliklonal antikorların izotiplendirilmesi çok gerekli değildir. Ancak monoklonal antikorlarda, tek bir klondan antikorun üretildiğini göstermek için bu işlemin yapılması daha uygundur. Bu deneyde, immunize edilmiş farenin karın içinden toplanan ascites sıvısı ve serum antikor olarak kullanılmıştır ve ona göre seyreltmeleri yapılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce +4°C dolabından TMB substratı ve plate stripler oda sıcaklığına alınmış dengelenme sağlanır. Her bir örnekten 8 kuyucuğa 50 µl koyulur. Üzerlerine keçi anti-fare IgG + IgA+ IgM HRP konjuge solüsyon eklenir. 5 dak süresince plate çalkalayıcıda hızlı bir şekilde karıştırılır. Plate'in üzeri parafilm ile kaplanır ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılır. İçindeki materyallerden kurtulup her bir kuyuya 250 µl yıkama tamponu ekleyerek 3 defa kuyular yıkanır. Yıkama tamponundan uzaklaştıktan sonra her bir kuyuya 75 µl TMB substratı eklenir. 1 dakikadan sonra solüsyon mavi renge dönerek pozitif sonuç vermesi beklenir. Antikorun konsantrasyonuna ve izotipine göre spektrofotometrede ölçülen sinyal gelişimi ve yoğunluğu değişebilir. 10 dakika sonrasında durdurma solusyonu her bir kuyuya 75 µl olacak şekilde eklenir ve renk maviden sarıya döner. Son olarak 450 nm'de spektrofotometrede ölçülür. Absorbans okuması 0.2 değerinden yüksek olanlar pozitif kabul edilir.

#### **4.2.32. Füzyon**

Füzyondan 6 gün önce myeloma (FO) hücre hattı sıvı azotta çıkarılıp kültüre edilir. 5 tane T75 flask içerisinde myeloma hücreleri RPMI besiyeri içerisinde büyütülür. Füzyondan iki gün önce farelerin periton içi, PBS ile yıkanarak makrofaj toplanır. Yapılan deneyde 3 adet Balb/C, 3 adet C57BL/6 fare kullanılmıştır. Periton içinin çalkalanması sonucu PBS tekrar steril enjektör yardımı ile 50 ml falkon içinde toplanır. PBS'in bulanıklaştığı gözlenir çünkü içerisinde artık çoğunluğu makrofaj olmak üzere immun hücreler bulunur. 400g'de

10 dakikasantrifüj edilip %10 serum içeren RPMI içerisinde resuspend edilir ve 24 well plate'lere dağıtılır. (Bir fareden ortalama  $3 \times 10^6$  makrofaj alınır. Yaklaşık 5 fare 10 adet 24 well plate için yeterlidir.)

Füzyon günü splenositler  $-80^{\circ}\text{C}$  dolabından çıkarılıp,  $37^{\circ}\text{C}$  su banyosunda çözünme sağlanır. Serumsuz besiyerinde iki defa 400g'de 5 dakikasantrifüj edilip yıkandıktan sonra %10 serum içeren RPMI içerisinde resuspend edilir. Thoma lamında hem splenosit hem de F0 hücrelerinin sayımı yapılır. (Bir dalak yaklaşık  $5 \times 10^7$  ile  $2 \times 10^8$  arası lenfosit içerir.) Thoma lamı ile sayım yapıldığında  $7,5 \times 10^6$  splenosit gözlenmiştir. Beklenilenden yaklaşık 10 kat daha az hücre sayılmıştır. Bunun sebebi, hücreler bir kez dondur-çöz yapılmıştır. Fo hücreleri de serumsuz besiyeri ile 400g'de 5 dakika yıkandıktan sonra thoma lamında sayıldıktan sonra her iki hücre tipinden de 1:1 oranında yaklaşık 1 milyona yakın hücre ayrılmıştır. Fo ve splenositler 50 ml falkon içerisinde birleştirilir. 800g'de 5 dakikasantrifüj edilir ve süpernatanı dikkatlice çekilir. 500  $\mu\text{l}$  %50 PEG'i 1 dakikada çevirip karıştırarak verilir ve 1 dakika daha karıştırılır. 10 ml serumsuz besiyeri çekilir ve ilk 1 ml 1 dakikada karıştırılarak verilir. Kalan 9 ml karıştırarak 2 dakikada verilir. Karışım 400g'de 5 dakikasantrifüj edilir. Supernatan dikkatlice uzaklaştırılır ve 10 ml %20 FBS içeren besiyeri resuspend edilir. Toplam plate hacmine göre besiyeri hacmi hesaplanır. 50X HAT medium eklenir. 200  $\mu\text{l}$  her bir kuyuya eklenmiştir. Plate'ler %5  $\text{CO}_2$ 'li  $37^{\circ}\text{C}$  inkübatöre kaldırılmıştır.

#### **4.2.33. Hibridomaların Besiyeri Değiştirilmesi**

İki gün sonra taze 1X HAT içeren 300  $\mu\text{l}$  besiyeri her bir kuyuya eklenmiştir. 4. günde ise kuyularda tüm besiyerleri çekilir ve üzerine taze HAT içermeyen RPMI besiyeri eklenir. Fo hücrelerinin 4. günün sonunda tamamen öldükleri gözlenmiştir.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmalar sonucunda tespit edilen bulgular rekombinant olarak ASCT2 proteinin üretilmesi, poliklonal antikor üretim teknolojisi bulgularıve ASCT2 ifadenme regülasyonuolarak üç ana başlık altında ele alınmıştır.

### 5.1. Rekombinant Protein Üretilmesi

#### 5.1.1. Antijenik Bölgelerin Tespiti

Antijen bölgelerinin tespiti için öncelikle ASCT2 proteinin toplam 541 amino asit dizisi EMBOSS antijenik web sitesine (Şekil 5.1.) (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>) koyulup analiz edilmiştir.

EMBOSS explorer

---

**antigenic**  
Finds antigenic sites in proteins ([read the manual](#))

---

Unshaded fields are optional and can safely be ignored. ([hide optional fields](#))

---

Input section

Select an input sequence. Use one of the following three fields:

1. To access a sequence from a database, enter the USA here:
2. To upload a sequence from your local computer, select it here:  No file chosen

```
IVYDPPROSK GLAAAEPTAN QSLALASIED QSAASAEYCS  
SDQVRCCLR ANLLVLLTVV AVVAVGLSL QVSSAASALQ  
LQPRRLSAPV PSEELLRLV BUIZLPVYVC SLIQAASALQ  
PRAVRLRSH ILLPFLVTL LAGLAVGLSL LAAQSAASA  
ATNAGVQADG SAEINAPSEV LDGFLQALRN IEPNLYVAA  
PSCIGTYEE DMLTSTVYV PUSSEVESIN ILKLVVQAV  
FQVLRKLAB QSLASAEFV SMLATVYV SSSNKAEPQD  
RIFLVSRIV AVQVLLPFA
```

3. To enter the sequence data manually, type here:

---

Required section

Minimum length of antigenic region

---

Output section

Output report format (EMBOSS Motif)

---

Run section

Email address:

*If you are submitting a long job and would like to be informed by email when it finishes, enter your email address here.*

Şekil 5.1. ASCT2 protein dizisinin EMBOSS antijenik web sitesinde analiz edilmesi

Bu sayfada run antigenic kısmına basıldıktan sonra toplamda 22 antijenik bölge tespit edilmiştir (Çizelge 5.1.).

### Çizelge 5.1. ASCT2 proteininin antijenik dizileri

Rezidu pozisyonu	Sekans	Skor	Max Skor Pozisyonu
11->16	GLAAAE	1.038	15
22->28	GLALASI	1.095	25
36->42	GGYCGSR	1.073	36
45->73	VRRCLRANLLVLLTVVAVVAGVALGLGVS	1.258	57
75->84	AGGALALGPE	1.063	78
86->122	LSAFVFPGELLRLLRMIPLVVCSLIGGAASLDPG	1.271	107
129->169	AWALLFFLVTTLLASALGVGLALALQPGAASAAINASVGAA	1.197	134
177->191	<b>SKEVLDSFLDLARNI</b>	<b>1.103</b>	<b>183</b>
193->203	<b>PSNLVSAAFRS</b>	<b>1.105</b>	<b>199</b>
216->225	<b>TRVKVPVGGQ</b>	<b>1.147</b>	<b>221</b>
231->248	ILGLVVFVAVFGVALRKL	1.244	238
251->259	EGELLIRFF	1.080	256
266->289	TMVLVSWIMWYAPVGIMFLVAGKI	1.148	287
295->328	VGLLFARLGKYILCCLLGHAIHGLLVPLIYFLF	1.270	308
334->347	YRFLWGIVTPLATA	1.104	343
354->364	SATLPLMMKCV	1.099	361
371->383	AKHISRFILPIGA	1.099	382
390->431	AALFQCVAAVFIAQLSQSLDFVKIITILVTATASSVGAAGI	1.221	398
433->475	AGGVLTLAIILEAVNLPVDHISLILAVDWLVDRSCTVLNVEGD	1.180	456
478->485	GAGLLQNY	1.101	483
496->513	PELIQVKSELPLDPLPVP	1.134	509
520->526	LLKHYRG	1.090	522

Uniprot web sitesinden insan ASCT2 amino asit dizisi alındığında ekstrasellüler kısmın 154-224. amino asitler arası olduğu bilinmektedir. Bu diziler arasında dört farklı antijenik bölge tespit edilmiştir.

### BLAST

```
>sp|Q15758|154-224
QPGAASAAINASVGAAGSAENAPSKVEVLDSFLDLARNIIPSNLVSAAFRSYSTTYEERNI
TRVKVPVGGQ
```

Target database<sup>1</sup> UniProtKB E-Threshold<sup>1</sup> 10 Matrix<sup>1</sup> Auto Filtering<sup>1</sup> None Gapped<sup>1</sup> yes Hits<sup>1</sup> 250

Run Blast in a separate window.

[Run BLAST](#) [Clear](#)

### Sequence Feature

Entry & Position(s)	Q15758[154-224]
Description	Neutral amino acid transporter B(0), Homo sapiens
Feature key	Topological domain
Feature identifier	


















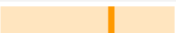

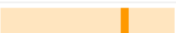

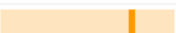

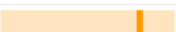
### Şekil 5.2. Uniprot ASCT2 ekstrasellüler dizi

## Subcellular location<sup>i</sup>

Cell membrane  ; Multi-pass membrane protein  . Melanosome

Note: Identified by mass spectrometry in melanosome fractions from stage I to stage IV.

### Topology

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view
Topological domain <sup>i</sup>	1 – 52	52	Cytoplasmic 	
Transmembrane <sup>i</sup>	53 – 73	21	Helical 	
Transmembrane <sup>i</sup>	99 – 119	21	Helical 	
Transmembrane <sup>i</sup>	133 – 153	21	Helical 	
Topological domain <sup>i</sup>	154 – 224	71	Extracellular 	
Transmembrane <sup>i</sup>	225 – 245	21	Helical 	
Transmembrane <sup>i</sup>	266 – 286	21	Helical 	
Transmembrane <sup>i</sup>	306 – 326	21	Helical 	
Transmembrane <sup>i</sup>	336 – 356	21	Helical 	
Transmembrane <sup>i</sup>	377 – 397	21	Helical 	
Transmembrane <sup>i</sup>	399 – 419	21	Helical 	
Transmembrane <sup>i</sup>	426 – 446	21	Helical 	

Şekil 5.3. Uniprot ASCT2 dizi gösterimi

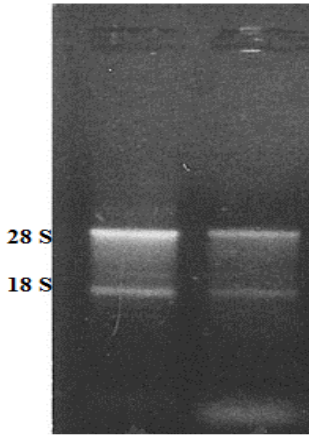
### 5.1.2. HepG2 Hücrelerine Glutamin Uygulaması ve Total RNA Eldesi

Tez çalışması kapsamında HepG2 insan karaciğer hepatoma hücreleri 4 saat süre ile 4 mM glutamin ile muamele edilerek ASCT2 proteinin ifadenmesinin artması sağlanmıştır. Kültüre alınmış HepG2 hücrelerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA kalitesini ölçmek için hem miktarı hem de saflığı spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) ile ölçülmüştür (Çizelge 5.2.). RNA'nın degrade olup olmadığına bakmak için ise agaroz

jel elektroforezinde yürütülmüştür (Şekil 5.1-4).Spektrofotometrede yapılan ölçümde miktarı ve saflığı, jel de ise degrede olmadığı gözlenmiştir.

**Çizelge 5.2.** Nanodrop ND-1000 RNA sonucu

<b>RNA Kalite Sonucu</b>	
<b>Konsantrasyon</b>	2931.9 ng/µl
<b>A<sub>260/280</sub></b>	2.03
<b>A<sub>260/230</sub></b>	2.22

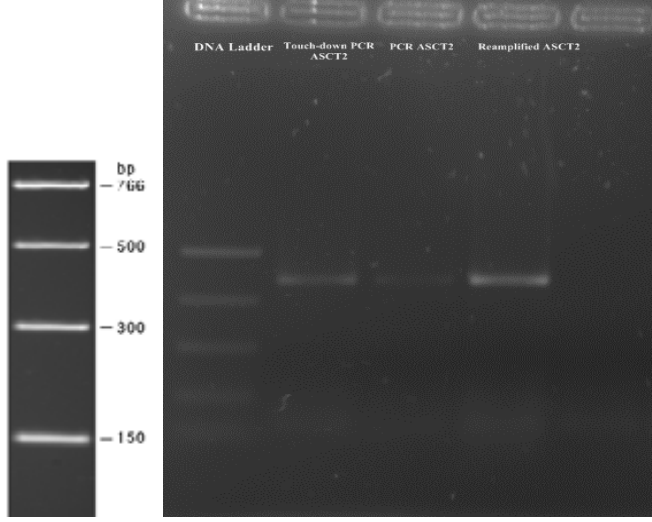


**Şekil 5.4.** Total RNA jel görüntü

### 5.1.3. ASCT2 PZR

Yapılan çeşitli PZR optimizasyonlarından sonra primerin en uygun bağlanma sıcaklığı 55°C olarak belirlenmiştir. %2' lik agoroz jelde optimizasyon aşamasının her bir ürünü yüklenmiş olup hedef 576 bç ürün gözlenmiştir.

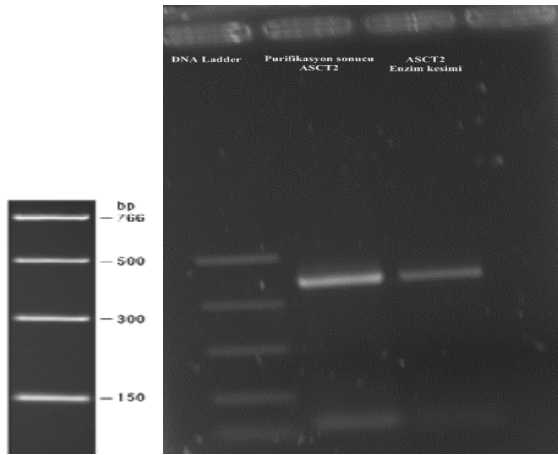




Şekil 5.5. Hedef ASCT2 dizisinin PZR ürünleri

#### 5.1.4. ASCT2 Ürünün Guanidin Tiosiyanat ile Saflaştırılması ve Enzim Kesimi

Guanidin tiosiyanat hem nükleik asitlere kuvvetli bir şekilde bağlanmış proteinleri (histon proteinler gibi) denatüre eder hem de ortamdaki RNA'ların degrade olmasını sağlar (88). Böylece PZR ürünleri hem protein hem de RNA'dan arındırılmış olur. Hedef bölgeyi pET28A vektör içerisine yerleştirmeden önce en başta primeri ön ve arkalarına tasarlanmış enzim tanıma bölgeleri Nhe I ve HindIII enzimleri ile kesilmiştir. Şekil 5.6'da gösterildiği gibi hem PZR purifikasyon ürünü hem de kesilmiş PZR ürün %2'lik jelde yürütülmüştür. Büyük oranda ürünler saflaştırılmıştır.



Şekil 5.6. Saflaştırılan ASCT2 PZR ürünü ve enzimle kesimi ürünleri (DNA ladder, ASCT2 PZR ürünü, ASCT2 enzim kesim ürünü)

Enzim kesimi sadece ASCT2 PZR ürününe değil pET28A plazmiti içinde yapılmıştır. Bu ürünler Nanodrop cihazında ölçüldüğünde Çizelge 5.1-3'teki gibi değerler elde edilmiştir.

**Çizelge 5.3.** PZR ürünü ve plazmitin enzim kesimi sonrası Nanodrop Sonuçları

Ürün	Konsantrasyon	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
ASCT2 PZR	19.2 ng/ul	2.04	1.87
pET28A	6.70	2.06	1.90

### 5.1.5. ASCT2 ve pET28A vektör dizileri

#### 5.1.5.1. pET28A Vektör Dizisi

pET28A vektörünün nükleotit dizisi toplam 5358 bç içerir. Bu dizi [http://sil.biochem.uiowa.edu/vectors/pET/pET-28a\\_seq.html](http://sil.biochem.uiowa.edu/vectors/pET/pET-28a_seq.html) web sitesinden alınmıştır.

#### 5.1.5.2. ASCT2 Nükleotit Dizisi

ASCT2 geni 2127 nükleotiitten oluşur. 1-1589 bç arası kodlanan diziyi oluşturmaktadır. Bu dizi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> web sitesinden alınmıştır.

```

1  cagcggcggg gcccaccgcc aacggggggc tggcgctggc ctccatcgag gaccaaggcg
61  cggcagcagg cggctactgc ggttcccggg accaggtgcg ccgctgcctt cgagccaacc
121 tgcttgctgct gctgacagtg gtggccgtgg tggccggcgt ggcgctggga ctgggggtgt
181 cgggggcccgg ggggtgcgctg gcgttggggc cggagcgctt gagcgccttc gtcttcccgg
241 gcgagctgct gctgcgtctg ctgcggatga tcctcttgcc gctgggtggtg tgcagcttga
301 tcggcggcgc cgccagcctg gaccccgggc cgctcggccg tctgggcgcc tgggcgctgc
361 tctttttcct ggtcaccacg ctgctggcgt cggcgctcgg agtgggcttg gcgctggctc
421 tgcagccggg cggccttcc gccgccatca acgctccgt gggagccgag ggcagtgccg
481 aaaatgcccc cagcaaggag gtgctcgatt cgttcctgga tcttgcgaga aatatcttcc
541 cttccaacct ggtgtcagca gcctttcgt catactctac cacctatgaa gagaggaata
601 tcaccggaac cagggtgaag gtgcccgagg ggcaggagggt ggaggggatg aacatcctgg
661 gcttggtagt gtttgccatc gtctttgggt tggcgctgag gaagctgggg cctgaagggg
721 agctgcttat ccgcttcttc aactccttca atgaggccac catggttctg gtctcctgga
781 tcatgtggta cggccctgtg ggcacatgt tcctgggtggc tggcaagatc gtggagatgg
841 aggatgtggg tttactctt gcccgcttg gcaagtacat tctgtgctgc ctgctgggtc
901 acgccatcca tgggctcctg gtactgcccc tcctctactt cctcttcacc cgcaaaaacc
961 cctaccgctt cctgtggggc atcgtgacgc cgctggccac tgcctttggg acctcttcca
1021 gttccgccac gctgccgctg atgatgaagt gcgtggagga gaataatggc gtggccaagc
1081 acatcagccg tttcatcctg cccatcggcg ccaccgtaaa catggacggt gccgcgctct
1141 tccagtgcgt ggccgcagtg ttcattgcac agctcagcca gcagtccttg gacttcgtaa
1201 agatcatcac catcctggtc acggccacag cgtccagcgt gggggcagcg ggcacccctg
1261 ctggaggtgt cctcactctg gccatcatcc tcgaagcagt caacctccc gtcgaccata
1321 tctccttgat cctggctgtg gactggctag tcgaccggtc ctgtaccgtc ctcaatgtag
1381 aagggtgacgc tctgggggca ggacttctcc aaaattacgt ggaccgtacg gagtcgagaa
1441 gcacagagcc tgagttgata caagtgaaga gtgagctgcc cctggatccg ctgccactcc
1501 cactgagga aggaaacccc ctctcaaac actatcgggg gcccgcaggg gatgccacgg
1561 tcgcctctga gaaggaaatca gtcagtataa cccggggagg gaccttccct gccctgctgg
1621 ggggtgctct tggacactgg attatgagga atggataaat ggatgagcta gggctctggg
1681 ggtctgcctg cacactctgg gatgcctggc tgctggagta catgtgttca caagggttac
1741 tcctcaaaac cccagttct cactcatgtc cccaactcaa ggctagaaaa cagcaagatg
1801 gagaaataat gttctgctgc gtccccaccg tgacctgcc ggcctcccct gtctcagggg
1861 gcaggtcaca ggtcaccatg gggatgtgtg tgtgcacgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg
1921 tgtgtgtgtc ctgtgacctc ctgtccccat ggtacgtccc accctgtccc cagatcccct
1981 attccctcca caataacaga aacactccca gggactctgg ggagaggctg aggacaaata
2041 cctgctgtca ctccagagga ctttttttt agcaataaaa ttgagtgtca actatttaaa
2101 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

Şekil 5.7. ASCT2 gen dizisi

### 5.1.5.3. ASCT2 Amino Asit Dizisi

ASCT2 proteini 540 amino asitten oluşur. Şekil 5.8’de amino asit dizisi verilmiştir, sarı bölge proteinin ekstrasellüler kısmını ifade eder. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q15758> web sitesinden dizi alınmıştır.

## Sequence Feature

Entry & Position(s)	Q15758[154-224]
Description	Neutral amino acid transporter B(0), Homo sapiens
Feature key	Topological domain
Feature identifier	

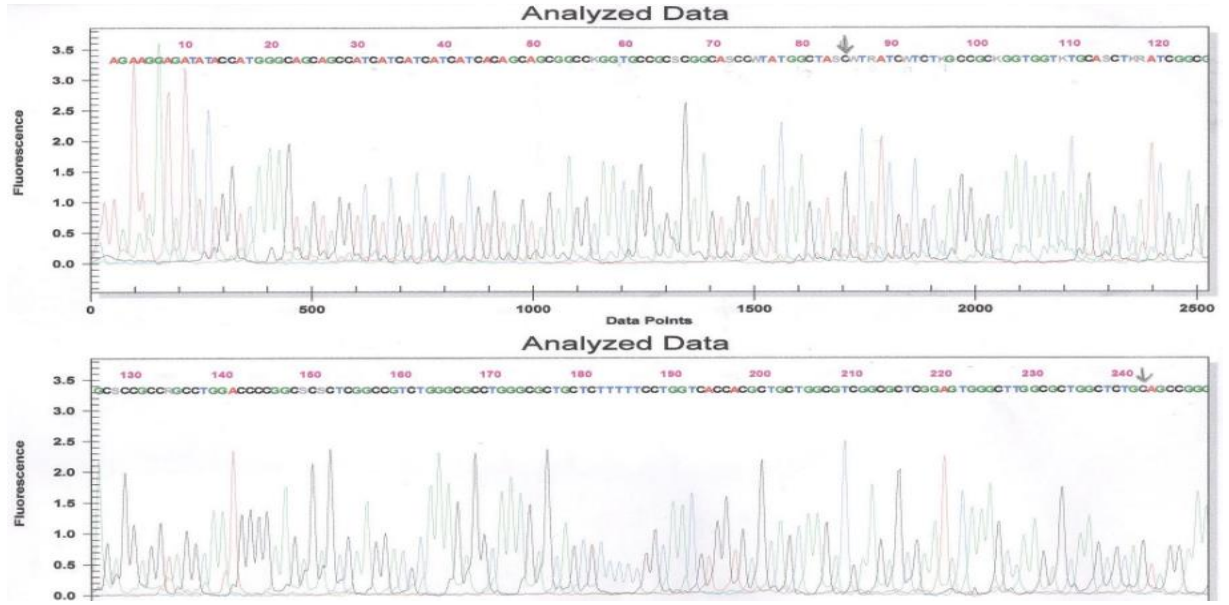
10	20	30	40	50
MVADPPRDSK	GLAAAEPTAN	GGLALASIED	QGAAAGGYCG	SRDQVRRCLR
60	70	80	90	100
ANLLVLLTVV	AVVAGVALGL	GVSGAGGALA	LGPERLSAFV	FPGELLRL
110	120	130	140	150
RMIIPLWVC	SLIGGAASLD	PGALGRLGAW	ALLFFLVTTL	LASALGVGLA
160	170	180	190	200
LALQPGAASA	AINASVGAAG	SAENAPSKEV	LDSFLDLARN	IFPSNLVSAA
210	220	230	240	250
FRSYSTTYEE	RNITGTRVKV	PVGQVEVEGMN	ILGLVVFAIV	FGVALRKLGP
260	270	280	290	300
EGELLIRFFN	SFNEATMVLV	SWIMWYAPVG	IMFLVAGKIV	EMEDVGLLFA
310	320	330	340	350
RLGKYILCCL	LGHAIHGLLV	LPLIYFLFTR	KNPYRFLWGI	VTPLATAFGT
360	370	380	390	400
SSSSATLPLM	MKCVEENNGV	AKHISRFILP	IGATVNMDGA	ALFQCVAAVF
410	420	430	440	450
IAQLSQQLD	FVKIITILVT	ATASSVGAAG	IPAGGVLTLA	IILEAVNLPV
460	470	480	490	500
DHISLILAVD	WLVDRSCTLV	NVEGDALGAG	LLQNYVDRTE	SRSTEPELIQ
510	520	530	540	
VKSELPLDPL	PVPTEEGNPL	LKHYRGPAGD	ATVASEKESV	M

Şekil 5.8. ASCT2 amino asit dizisi (sarı ile işaretli kısım ekstrasellüler bölge)

### 5.1.5.4. ASCT2 Ekstrasellüler Alt Yapı (Domain)'in Nükleotit Dizisi

Çoğaltılacak bölge için tasarlanmış primerlerin uç kısımlarına restriksiyon enzimlerinin keseceği tanıma bölgeleri eklenmiştir. Hedef dizinin 576 bç'den oluşmaktadır (Şekil 5.9.).

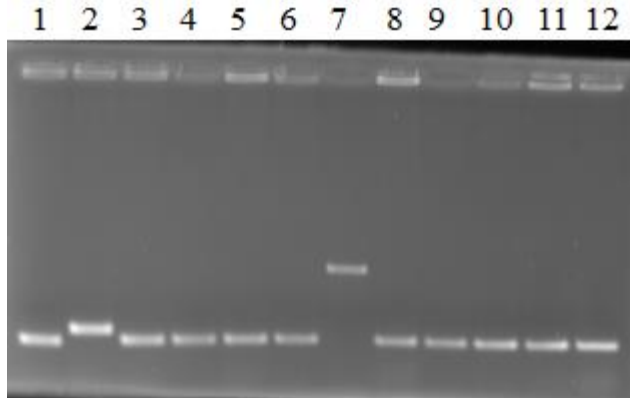




Şekil 5.11. Sekans genel görüntüsü

### 5.1.6. Koloni PZR

JM109 *E.coli* transformasyon sonucu, T7 primerleri kullanılarak JM109 *E.coli* hücrelerine aktarılmış kolonilerin hangilerinin plazmiti içeri alıp almadığı PZR yöntemi ile kontrol edilmiştir. 12 koloniden bir koloni hedef constructı içine almıştır. PZR ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 5.12.'de gösterilmiştir.



Şekil 5.12. Koloni PZR (1-12 örnekleri transformasyon gerçekleşmiş JM109 *E.coli* plate üzerinden seçilen kolonileridir.)

### 5.1.7. Alkalen Lizis ile ASCT2 Plazmit Eldesi ve Jelde Yürütülmesi

Koloni PZR sonucu belirlenen koloni seçilmiş ve fazla miktarda ASCT2 ekstrasellüler gen dizisini içeren plazmitin eldesi için alkalen lizis protokolü takip edilmiştir. Hazırlanmış bu



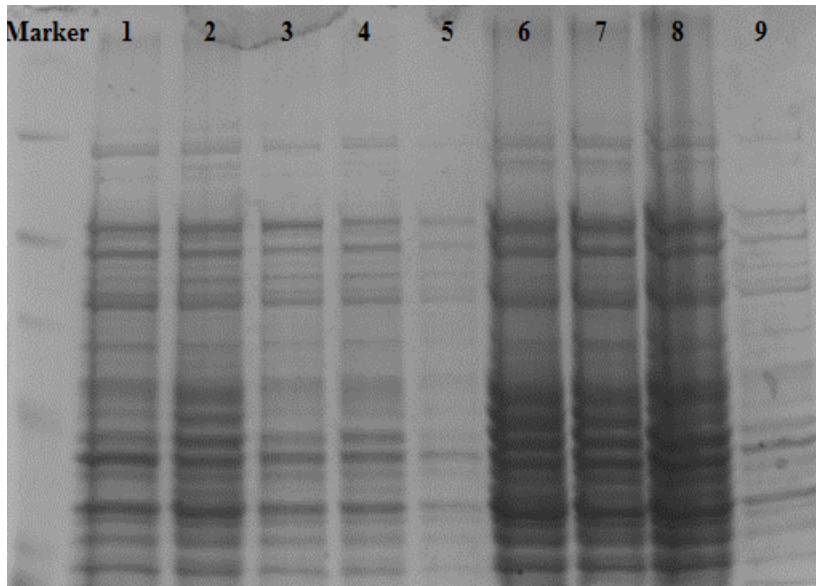
plazmitler BL-21 *E.coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda LB Kan+ agar plate üzerindeki koloniler, LB Kan+ içerisinde 37°C'de overnight büyütülmüştür ve total protein eldesi gerçekleştirilmiş ve SDS jelde yürütülmüştür. Şekil 5.13.'te ASCT2 plazmiti %0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür.



Şekil 5.13. Alkalen lizis protokolü sonucunda ASCT2 plazmiti

#### 5.1.8. Protein Purifikasyon Ürünlerinin SDS-PAGE Sisteminde Gözlenmesi

Başarılı bir şekilde ASCT2 plazmitinin BL-21 hücrelerine transformasyonu gerçekleşmiştir. Oluşan kolonilerden 9 tanesi seçilip IPTG indüklemesi yapılmıştır. Bu kolonilerden hangisinin daha iyi bir protein ifadenmesine sahip olduğu anlamak için SDS-PAGE sisteminde yürütülmüştür. İfade edilecek proteinin ağırlığı 24 kDA olacağı bilindiği üzere kolonilerden o ağırlıktaki proteinleri en çok hangisinde ise o koloni ile devam edilmiştir.



**Şekil 5.14.** Kolonleri IPTG ile indükleyerek elde edilen protein lizatları (1-9 transforme olmuş farklı kolonilerdir)

6 numaralı koloninin toplam protein konsantrasyonunun daha yoğun olması ve hedef protein ağırlığının da (24 kDA) gözlenmesi sonucu diğer deneylere o koloni ile devam edilmiştir. Kolonilerin ana stokları önceden olduğu için 6. koloni seçilmiştir ve gece boyu IPTG ile kültüre edilmiştir. BL-21 hücrelerine lizis işlemi yapıldıktan sonra proteinleri elde edilmiştir.

### 5.1.9. Ekstrasellüler ASCT2'nin Moleküler Ağırlığının Hesaplanması

ASCT2 proteinin bir kısmının ifade edildiği modelin moleküler ağırlığını hesaplamak için EMBOSS isimli biyoinformatik tool'un Pepstat alt programı kullanılmıştır. Aşağıda PepStat programı çalıştırıldığında ortaya çıkan tablolar verilmiştir. Programa aşağıdaki amino asit dizisi girildiğinde ASCT2 proteininin moleküler ağırlığı yaklaşık 24 kDA olarak hesaplanmıştır.

### Çizelge 5.4. ASCT2 ekstrasellür kısmının dizisi

ASCT2 Ekstrasüller Dizi
QPGAASAAINASVGAAGSAENAPSKEVLDSFLDLARNIFPSNLVSAAF RSYSTTYEERNITGTRVKVPVGQ

### Çizelge 5.5. Pepstat programı sonucu

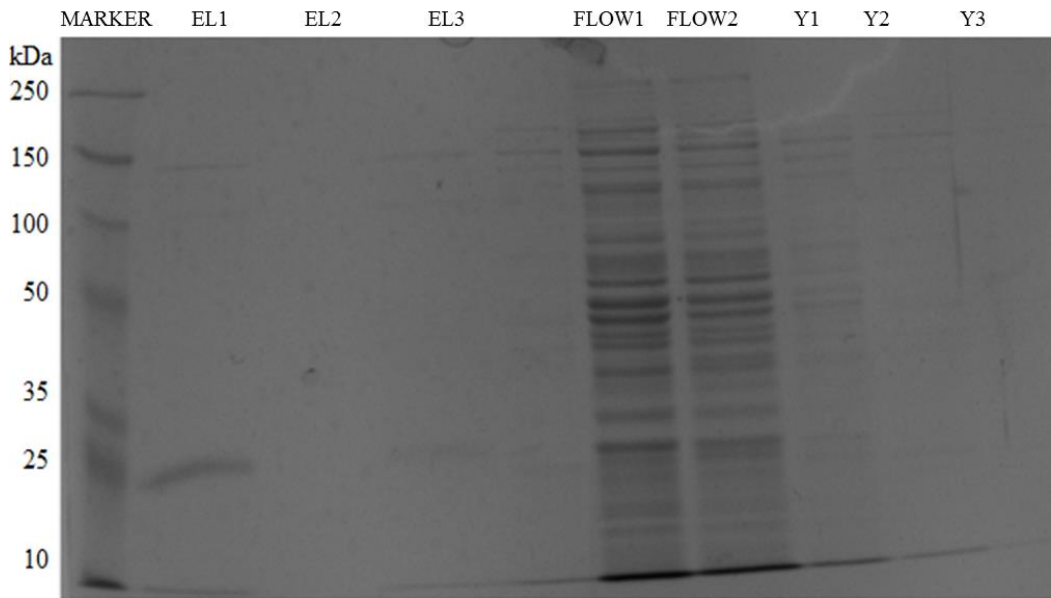
228 Amino Asitin PEPSTATS Sonucu
Moleküler ağırlık= 24120.09      Rezidüler = 228
Ortalama Rezidü Ağırlığı= 105.790      Yük = 4.5
İzoelektirik nokta = 7.2190
A280 Molar Extinction Katsayılar= 20970 (indirgenmiş) 20970 (sistin köprüleri)
A280 Extinction Katsayılar 1mg/ml = 0.869 (indirgenmiş) 0.869 (sistin köprüleri)
İnküzyon cisimciklerinde ifadenememe olasılıksızlığı= 0.756



### 5.1.10. Protein Purifikasyonu

Özel hazırlanmış nikel-NTA kolon nitrilotriasetik asit (NTA) şelasyon kısmı ile türetilmiş agaroz boncuklardan ve nikel iyonlarının ( $Ni^{2+}$ ) yüklendiği bir sistemden oluşmaktadır. Hareketsiz metal afinitine kromatografisi (IMAC) yönteminin rekombinant His-tag protein saflaştırma için kullanılmasının nedeni olağanüstü bağlanma kapasitesi ve performans gerçekleştirmesidir.

Rekombinant ASCT2 proteinin saflaştırılması için yukarıda bahsedilen kolonilerden bir tanesi seçilmiştir (6. koloni). Bu koloni LB kan besiyeri içinde kültüre edilmiştir. Her yarım saatte bir OD değeri ölçülmüştür ve OD değeri 0.4'e ulaştığında kültüre 1 mM IPTG eklenmiştir. Gece boyu oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Hücrelere lizis yapıldıktan sonra Thermo Scientific His Pur Ni-NTA kolonu kullanılarak kitten çıkan protokolü takip ederek saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Desalting işlemi de gerçekleştirildikten sonra poliakrilamid jelde yürütülmüştür (Şekil 5.15. ).



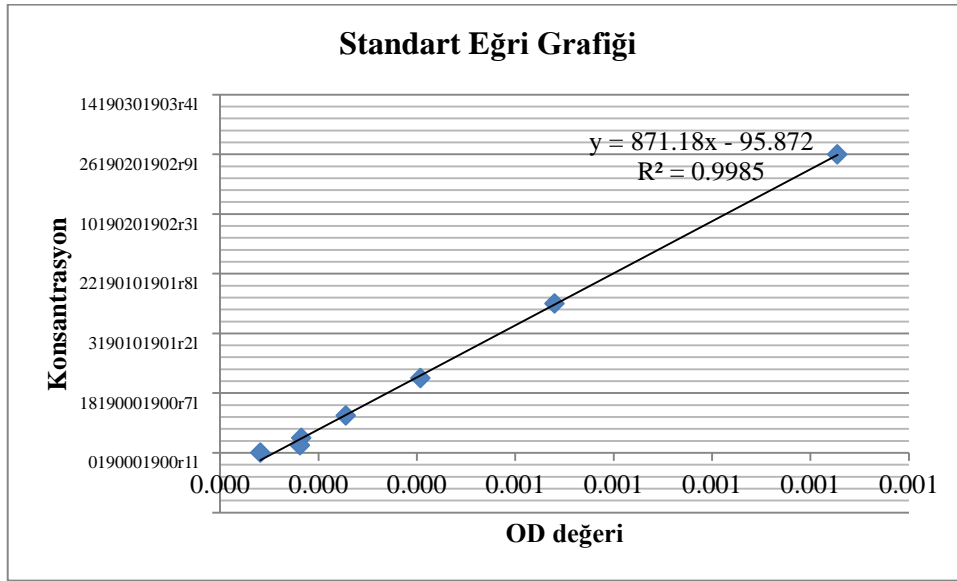
**Şekil 5.15.** Kolon ile saflaştırılan rekombinant proteini (Elüsyon-EL1, EL2, EL3; Flow through -Flow1, Flow2; yıkama- Y1,Y2,Y3)

Jelde ikinci kuyucukta rekombinant proteinin saf olarak elde edildiği görülmektedir. Miktarını hesaplamak için BCA testi yapılmıştır (Çizelge 5.6.).

**Çizelge 5.6.** BCA testi için hazırlanan standartların OD değerleri

Standart OD ölçümleri		Standard Ortalama	Konsantrasyon $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1.227	1.283	1.255	1000
0.682	0.677	0.680	500
0.411	0.404	0.408	250
0.256	0.256	0.256	125
0.174	0.156	0.165	50
0.197	0.129	0.163	25
0.074	0.089	0.082	0

Ölçülen bu standart verileri kullanılarak Excel dosyasında Standart Eğri grafiği  $f(x) = ax + b$  şeklinde çizdirilmiştir (Şekil 5.16.).



**Şekil 5.16.** Standart eğri grafiği (BCA sonucunda elde edilen değerler ile excell'de çizilmiştir.)

Üç defa ayrı zamanlarda rekombinant olarak üretilen protein saflaştırılmıştır. İki ay boyunca immunize edilen iki fareye 10-30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ASCT2 antijen olarak verilmiştir. Hayvanların antijene karşı yeterince immunize olduğunu anlamak için kuyruklarından alınan 100  $\mu\text{l}$  kan 1000 rpm'de 10 dakikasantrifüj edilerek serum kısmı alınmıştır. İmmunize edilmiş hayvanın serumununantikorca zengin olduğu bilinmektedir. Bu yüzden bu serum BL21-bakteri lizati, HepG2 hücre lizati, fare karaciğer dokusu ve insan yağ

dokusu ve rekombinant olarak üretilmiş ASCT2 proteinin üzerinde western blot tekniği ile antikorun hedef bölgeye bağlanması incelenmiştir.

**Çizelge 5.7.** Rekombinant proteinlerin miktarı

Rekombinant	Miktar (µg/ml)
ASCT2 protein 1	25
ASCT2 protein 2	40
ASCT2 protein 3	80

## 5.2. Antikor Tabanlı Bulgular

### 5.2.1. Antikor Titrasyonu

ELISA metodu kullanarak hayvanın immunnize edilip edilmediği, immunizasyonun ne kadar başarılı olduğu anlaşılmaya çalışılmıştır. Laboratuvarımızda yapılan ASCT2 poliklonal antikor serum ve ascites sıvı örneklerinin ELISA sonucu Çizelge 5.2-1'de gösterilmiştir. ELISA sonucunda 1/1.000.000 dilüsyonda ASCT2 poliklonal antikor serumunun 1/1.000.000 dilüsyona kadar çalıştığı gösterilmiştir.

**Çizelge 5.8.** Serum (solda) ve ascites sıvısı (sağda) örneklerinin antikor titrasyon değerleri

2 µg/ml	4 µg/ml	Dilüsyon katsayıları
3,329	3,357	1:100
3,344	3,336	1:1.000
3,218	3,245	1:10.000
2,072	1,959	1:50.000
2,046	2,065	1:100.000
0,292	0,213	1/1.000.000
0,081	0,059	blank

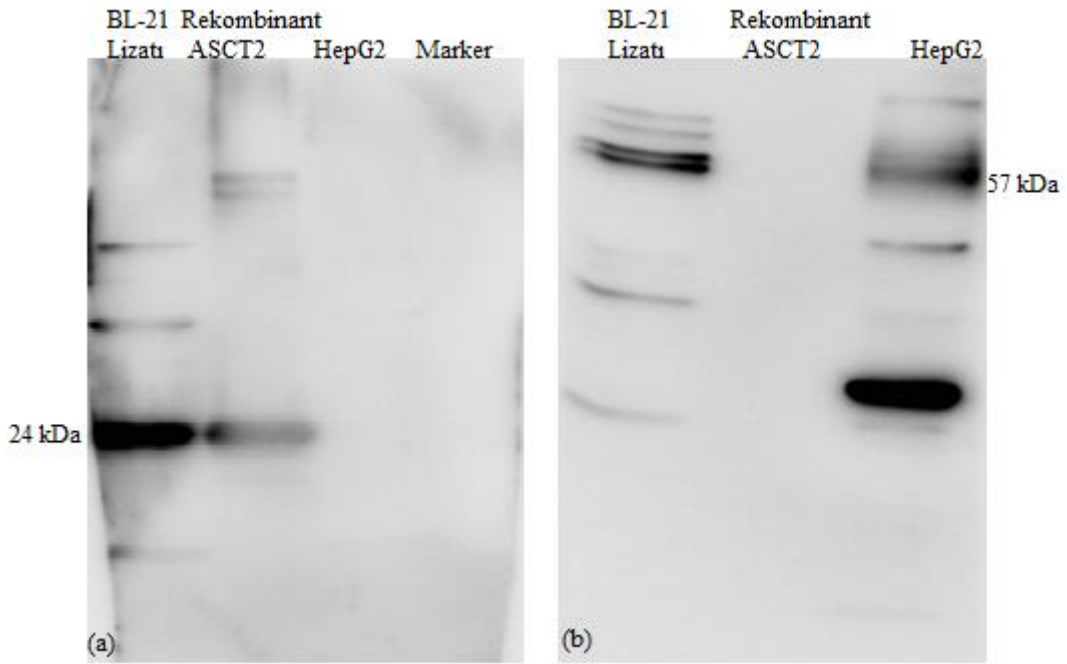
2 µg/ml	4 µg/ml	Dilüsyon katsayıları
2.884	2.616	1:100
2.758	2.564	1:1.000
2.195	2.179	1:10.000
1.900	2.072	1:50.000
1.049	1.483	1:100.000
0,199	0,240	1:1.000.000
0.065	0.060	blank

### 5.2.2. Ascites Sıvısının ve Serumun Test Edilmesi

Farenin yaklaşık iki ay immunizasyonundan sonra karın içinde sıvı birikmiştir. Biriken bu sıvı ascites sıvısı olarak bilinmektedir. Fareden alınan ascites sıvısı ve kuyruk veninden alınan serum ile HepG2 hücre lizatı, BL21-bakteri lizatı, HepG2 hücre lizatı, fare karaciğer

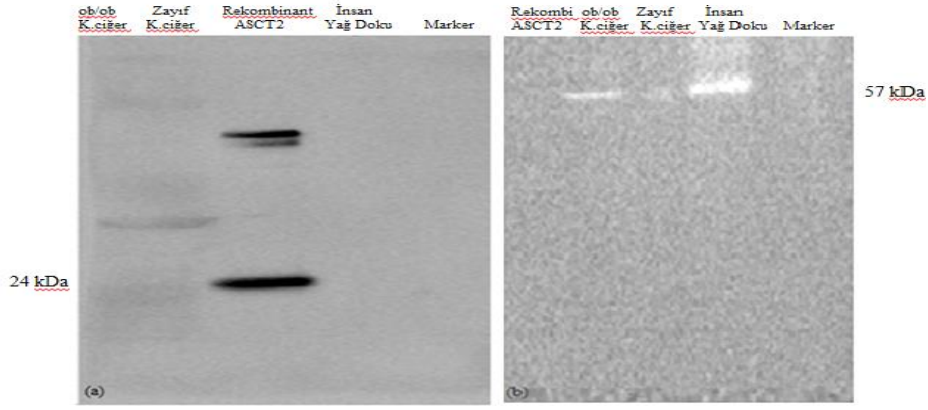
dokusu ve insan yağ dokusu ve rekombinant olarak üretilmiş ASCT2 proteini kullanılarak western blot yapılmıştır. Hedeflenen antikörün doğru antijene bağlanıp bağlanmadığı test edilmiştir.

Beklenen sonuç, antikörün yukarıda bahsedilen rekombinant protein ve bakteri lizati hariç tüm örneklerde 57 kDa ağırlığındaki protein tanmasıdır. Çünkü hücrede ve dokuda ASCT2 proteini 57 kDa ağırlığındadır. BL21 hücre lizati ASCT2 plazmitini içerdiği için sadece ekstrasellüler kısmın ifadenmesi ile oluşan proteinin antikör tarafından tanması gerekmektedir. Rekombinat ASCT2 proteini aynı şekilde ekstrasellüler kısmın protein olduğu için antikörün 24 kDa ağırlığındaki protein tanması gerekmektedir.



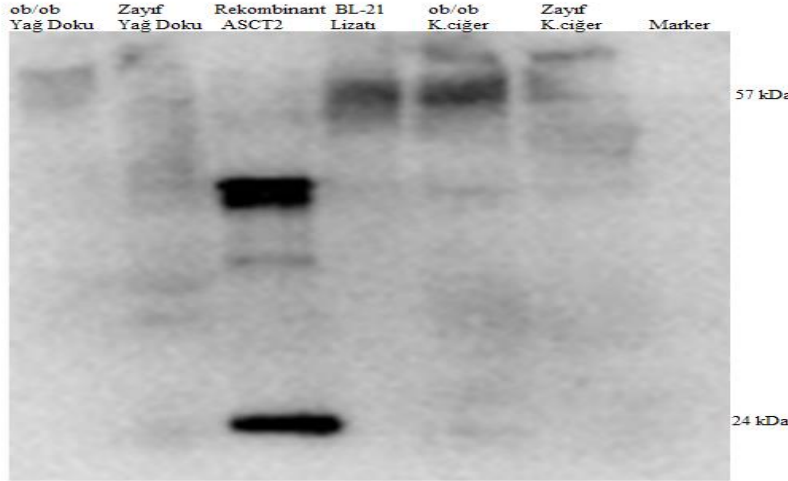
**Şekil 5.17.** (a) Ascites sıvısı ve (b) ticari poliklonal antikör ile hücre lizatları üzerinde yapılan western görüntüleri

Ticari antikör ile ascites sıvısının western sonuçları kıyaslandığında ticari antikör 57 kDa'lık proteini tanırken ascites ile yapılan western (b) görüntüsünde HepG2 hücre lizatında herhangi bir bant tanınmamıştır.



**Şekil 5.18.** Ascites sıvısı (a) ve (b) ticari poliklonal antikor ile doku örnekleri üzerinde yapılan western görüntüleri

Şekil 5.18’te görüldüğü üzere ascites western görüntüsünde hiçbir doku örneği tanınmamışken ticari antikor, ob/ob-normal fare karaciğer dokusu ve insan yağ dokusunu tanımıştır. Farenden alınan ascites sıvısında kendi antijenimize karşı antikor oluşturulmuş olmasına rağmen hücre ve doku örneklerindeki ASCT2 proteinini ascites sıvısındaki antikorlar tanımamıştır.

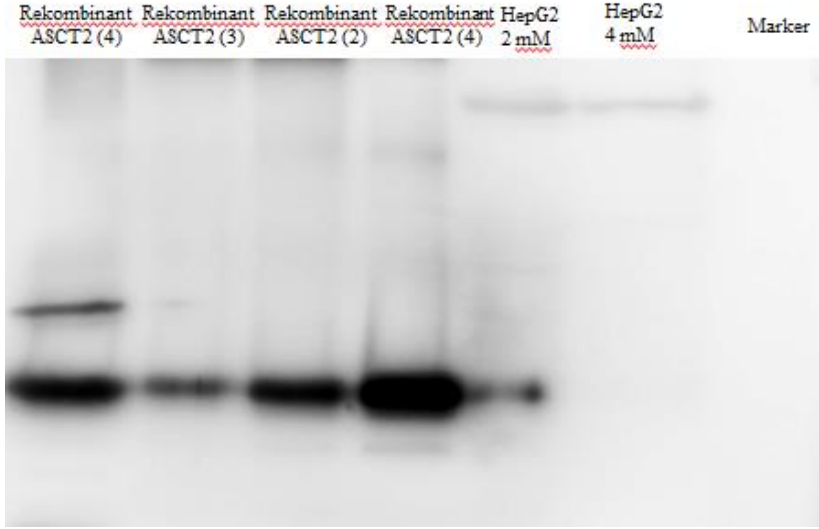


**Şekil 5.19.** Serum örneği ile yapılan western blot görüntüsü

Şekil 5.19’da görüldüğü üzere serum örneği hem rekombinant proteini tanımıştır (24kDa) hem de normal/obez farenin karaciğer ve yağ dokusunda ASCT2 proteinini (57kDa) tanımıştır. Yağ dokudan elde edilen lizattan çok az miktarda protein yüklendiği için bağlanma verimliliği oldukça düşük gözlenmiştir. Üretilen antijen insan genomu üzerinden tasarlanmış olsa da antikorun farede homoloji gösterdiği görülmektedir.

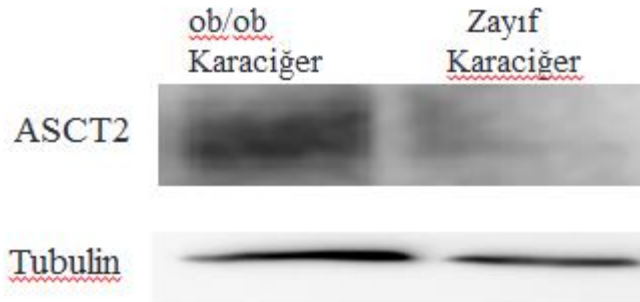
### 5.2.3. İkinci Kez Fare İmmünizasyonunun Antikor Bulguları

İmmünize edilmiş üç farenin aniden ölmesi sebebiyle yeterli miktarda serum ve kan toplanamamıştır. Bu yüzden yeni bir dişi Balb/C fare tekrar immünize edilmiştir. Bu farenin kuyruk veninden alınan serum ve karın içinden alınan sıvı ile tekrar western yapılmıştır.

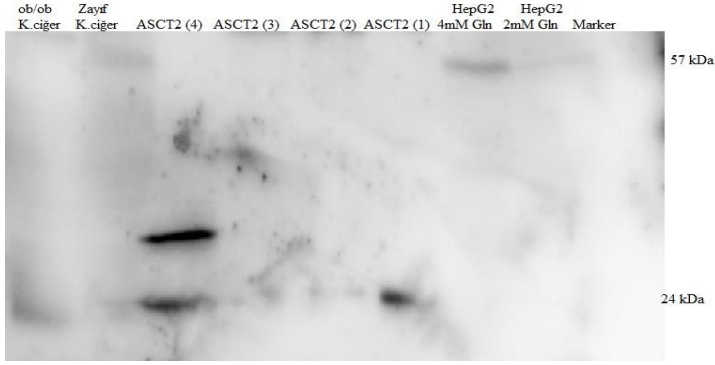


**Şekil 5.20.** HepG2 lizatları ve rekombinant ASCT2 proteinleri üzerinde serum içindeki poliklonal antikorun test edilmesi (serum, ikinci kez immünize edilmiş farenin kuyruk veninden alınmıştır.)

Bir önceki immünizasyon sonucu alınan serum ile yapılan western bantlarına benzer bir şekilde antikorun bağlanması Şekil 5.21’de gözlenmektedir.

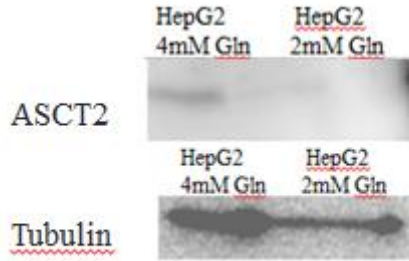


**Şekil 5.21.** Obez ve zayıf farelerden alınmış karaciğer örnekleri üzerinde serum içindeki poliklonal antikorun test edilmesi



**Şekil 5.22.** Ascites sıvısı ile yapılan western blot görüntüsü (serum, ikinci kez immunize edilmiş farenin kuyruk veninden alınmıştır.)

İkinci defa immunize edilmiş fareden alınan ascites sıvısı ile yapılan western blot görüntüsü Şekil 5.22.'deki gösterilmektedir. Ascites sıvısındaki antikolar hem HepG2 lizatlarında, hem karaciğer dokusunda hem de rekombinant proteinde ASCT2 molekülünü tanımıştır.



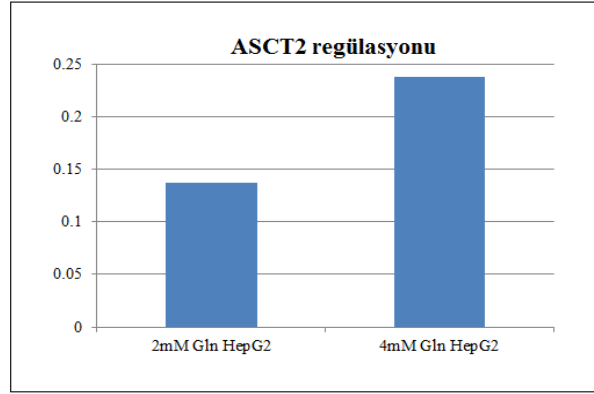
**Şekil 5.23.** Tubulin antikor kullanıldığında elde edilen western blot görüntüsü

Tubulin memeli hücrelerinde ve dokularında ifade edilen bir proteindir. Bu antikorun kullanılmasının amacı kuyu başına eşit konsantrasyonlarda protein yüklenebildiğini görmek ve ASCT2 molekülünde regülasyonu tespit etmektir.

#### 5.2.4. ASCT2 regülasyonu

HepG2 hücrelerine kültür ortamında farklı konsantrasyonlarda (2-4 mM) glutamin verildiğinde ASCT2 molekülünün ifadenmesinin düzenlenmesine bakılmıştır. Şekil 5.24'te yarı kuantitatif analiz için ImageJ programı kullanılmıştır. Program, membran görüntüsü üzerindeki her bir bandın yan kısımlara taşmadan eşit mesafede kutu içerisine alınarak analiz edilmesi sonucunda bir excell tablosu çıkarır (Çizelge 5.9.). Bu tablodan ortalama isimli sütunun altında yazan beta tubulin değeri, 2 mM Gln için çıkan değere

bölünür. Diğer örnek için de aynı işlem yapılır. Bu sayede normalizasyon yapılmış olur. Çıkan değerler ile sütun grafiği çizilir.



**Şekil 5.24.** Yarı kuantitatif analiz (glutamin regülasyonu)

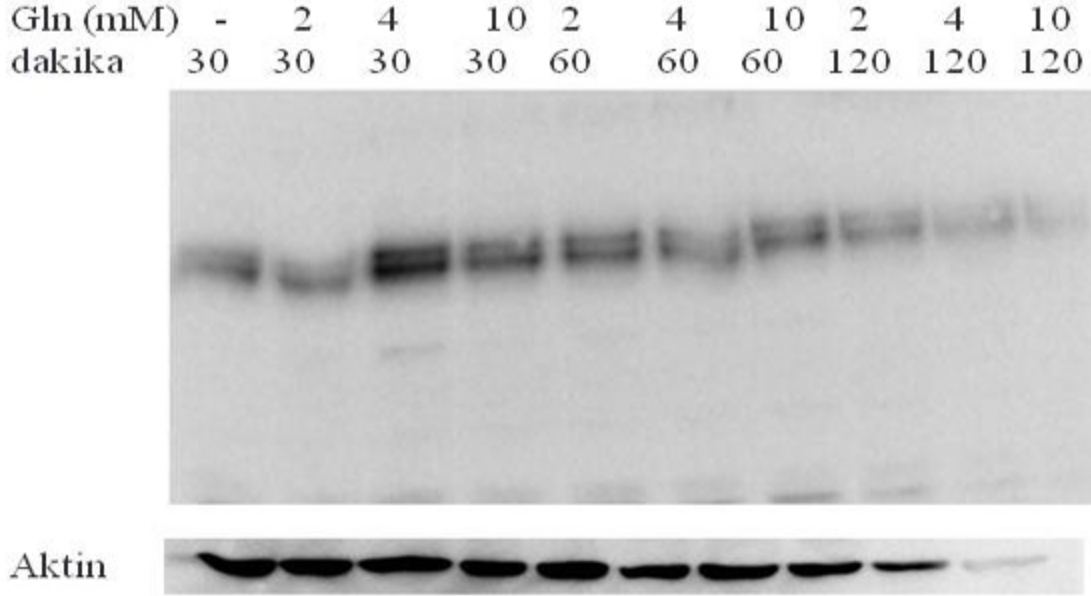
**Çizelge 5.9.** ImageJ programı sonucu elde edilen excel dosyası

Örnek	HepG2	Alan	Ortalama	Min	Max
1	2 mM Gln	4400	19.894	9	43
2	4 mM Gln	4400	30.057	14	56
1	Aktin	4400	144.821	1	193
2	Aktin	4400	126.35	1	188

Normal koşullarda HepG2 hücreleri 2 mM glutamin varlığında kültürde yaşarlar iken, besiyerindeki glutamin konsantrasyonu iki katına çıkarıldığında glutaminin hücre içine daha fazla miktarda girmesini isteyeceklerdir. Bu durumda ise glutaminin hücre içine alınmasında görevli olan taşıyıcı molekül ASCT2 ifadenmesinde artış olması beklenmektedir. Deneye başlamadan önce tüm platelerdeki hücrelerden serumlu besiyerleri çekilmiş, hücreler 9 saat serum starvasiyonuna alındıktan sonra deneye başlanmıştır. Zamana ve glutamin konsantrasyonuna bağlı olarak HepG2 hücreleri kültüre edilmiş ve protein izolasyonu gerçekleştirildikten sonra western blot yapılmıştır. 2mM glutaminli besiyerinde zamana bağlı değişim kontrol grubu olarak alınabilir. 4mM glutamin kültüründe ASCT2 ifadenmesinde 30-60. Dakikalarda bir artış görülmektedir. 120. dakikada ise ASCT2 ifadenmesinde azalış söz konusudur. 10mM glutaminli besiyerinde benzer şekilde 30- 60. dakikalarda ASCT2 ifadenmesinde artış görülür. Ancak 10 mM glutaminin 120. dakikasında ASCT2 ifadenmesi çok çok azalmıştır. Bu deney

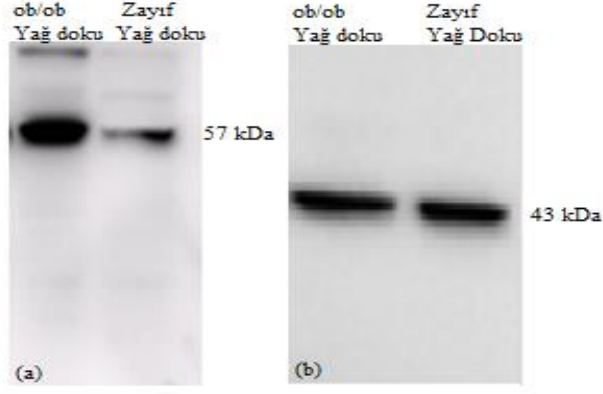


düzenine benzer ama hücrelerden serum çekilerek yapılan deney düzeninde benzer sonuçlar alınmıştır.



**Şekil 5.25.** Glutamin konsantrasyonu ve zamana bağlı ASCT2 ifadelenmesi

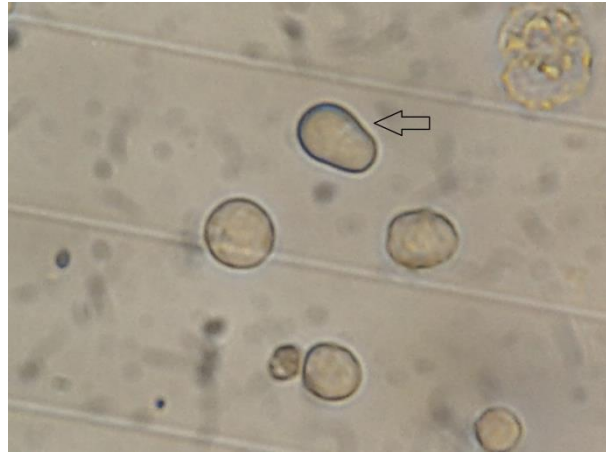
Glutamin metabolizması ile ilgili yapılacak deneylere ön çalışma olarak zayıf ve obez farenin karaciğerden sonra yağ dokudaki ekspresyon düzeyine western blot ile bakılmıştır. Stokta bulunan hem normal fareden hem de obez fareden alınmış yağ dokular kullanılmıştır. Primer antikor olarak poliklonal ASCT2 antikor ve beta tubulin antikor kullanılmıştır. Kuyucukları eşit miktarda total protein yüklenilmeye çalışılmıştır. Obez farelerin yağ dokusunda ASCT2 proteinin (57 kDa) daha fazla ifade edildiği western görüntüsünde görülmektedir (Şekil 5.26. (a)).



**Şekil 5.26.** Yağ dokuda ASCT2'nin regülasyonu (a: poliklonal ASCT2 antikoruna b: beta aktin kullanılmıştır.)

### 5.2.5. Hibridoma oluşumu

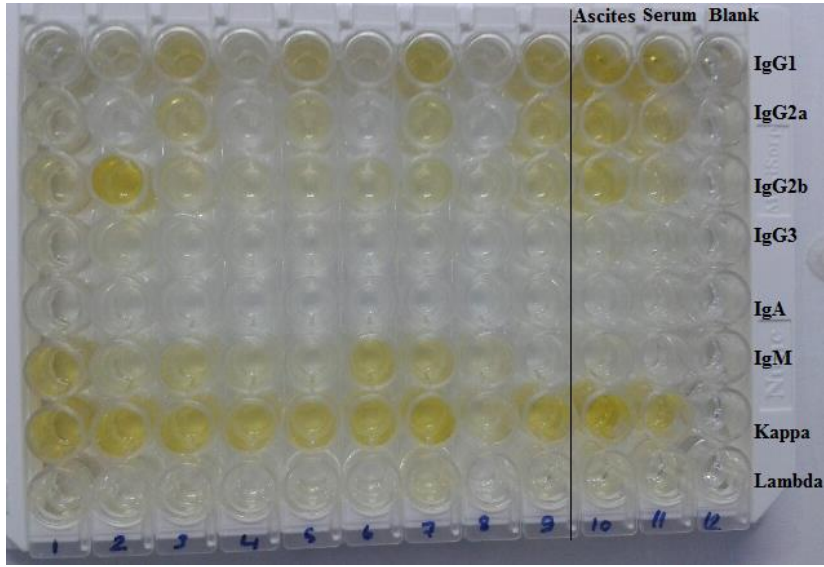
Monoklonal antikor üretmek için elimizdeki son immunize edilmiş farenin dalağı alınarak, füzyon gerçekleştirilmiştir ancak hibridoma hücreleri yaşamadığı için monoklonal antikor üretim işlemine devam edilememiştir. Şekil 5.27'de füzyon işlemi sonrası myelom ve B hücrelerinin membranlarının birleştiği görülmektedir. Füzyon olmuş hücrelerin 7-10 gün içinde klon oluşturması beklenmekteydi ancak klonlar oluşmadığı deneylere devam edilememiştir.



**Şekil 5.27.** Füzyon olmuş hücre

### 5.2.6. Antikor İzotiplendirmesi

Hayvandan alınan serum ve ascites sıvısı örneklerinde immunoglobulin proteinlerden hangi sınıfı ve alt sınıflarının üretildiğini anlamak için izotiplendirme deneyi ELISA sistemine dayalı olarak yapıldı. Şekil 5.28.'deki plate üzerinde 10. ve 11. kolon hizasındaki örnekler ascites sıvısı ve serum örnekleridir. Protokol sonundaki içerisinden çıkan stop solüsyonu eklendiğinde mavi renk sarı renge dönmektedir ve reaksiyon durmaktadır. Bu aşamadan sonra spektrofotometrede 450 nm'de okumalar yapılmıştır (Çizelge 5.10. ). Protokole göre 0.2 değerinin üzerinde çıkan değerler pozitif kabul edilecektir.



Şekil 5.28. Antikor izotiplendirme deneyi sonucu plate görünümü

Çizelge 5.10. Antikor izotiplendirmesi sonucu spektrofotometrede ölçülen değerler

Ig types	Ascites	Serum
IgG1	1,261	0,926
IgG2a	0,774	0,540
IgG2b	0,744	0,343
IgG2	0,285	0,144
IgA	0,212	0,112
IgM	0,261	0,115
Kappa	1,632	0,778
Lambda	0,150	0,126

## 6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Farklı canlıların immün sistemlerinin kullanılması ile oluşturulan antikorlar biyoteknolojik bir ürün olarak bilinmektedir. Rekombinant protein olarak elde edilen veya bir canlıdan saflaştırılan proteinler başka canlılar için antijen özelliği gösterebilir. Bu çalışmada da üretilen insan ASCT2 rekombinant protein Balb/C fareler için immunojen özelliği göstermektedir. Konak,immunojene maruz bırakıldığında immün sistem hücreleri tetiklenmektedirler (makrofaj, T hücreleri, B hücreleri gibi). B lenfositlerinin oluşturduğu antikorlar antijen üzerindeki farklı epitoplara tanır. Bu yüzden oluşan B lenfositlerinin her bir klonu farklı antikorları çok sayıda üreteceklerdir. Bu antikorlar poliklonal antikor olarak isimlendirilir (71). Oluşan bu antikorlar kan dolaşımında bulunurlar. Fareden bir defada yaklaşık 200 µl kadarkan alınabilir. Bu miktar oldukça az olduğu için çok miktarda antikor elde edilemesi mümkün değildir. Bu sebepten dolayı poliklonal antikor üretiminde alternatif başka bir yöntem de hayvanın karın içinde oluşan ascites sıvısının toplanması poliklonal üretimi için kritiktir (1).

Bu çalışmada immunojenik ASCT2 proteininin ekstrasellüler kısmının rekombinant protein olarak üretilmesi ve insan ASCT2 proteinine karşı antikor geliştirilmesi amaç edinilmiştir. ASCT2 proteininin farklı doku gruplarında regülasyonunun belirlenmesi ileride glutamin metabolizması ile ilgili yapılması planlanan deneylerin ön çalışması olmuştur.

İlk olarak dişi Balb/C fareleri çeşitli zaman aralıklarında laboratuvarında üretilen immunojenik insan rekombinant ASCT2 protein aşılanmıştır. Yaklaşık iki ayın sonunda farenin kuyruk veninden alınan serum ve karın içi sıvısı (ascites) primer antikor olarak kullanılmıştır. Fare immunizasyon deneyleri iki defa tekrarlanmıştır. İkinci kez başka bir farenin immunize edilmesinin sebebi ilk immunizasyondaki üç farenin de aniden ölmesidir. İlk immunize edilmiş farelerden alınan serum ve ascites sıvısının primer antikor olarak kullanıldığı western blot'ta HepG2 hücre lizatı ve doku örneklerinde bir reaksiyon gözlenmemiş, özetle üretilen antikor hedef proteini tanımamıştır. Bu antikor sadece üretilen rekombinant proteini tanımıştır (Şekil 5.17.).

İkinci immunizasyon sürecinde bir tane dişi Balb/C fare kullanılmıştır. Yaklaşık 8 hafta sonra serum örneği alınmış ve antikor titrasyonuna bakılmıştır. Antikoron 1:200.000'e kadar titre olmasınayvanın yeterince immunize olması için pozitif kabul edilebilir. Laboratuvarda yapılan ELISA sonucunda serum ve ascites sıvındaki antikorlar 1:1.000.000'a kadar titre olmuştur.Serum ve ascites sıvısı, western blot analizlerinde primer antikor olarak kullanılmıştır. Üretilen bu antikor HepG2 hücre lizatlarını, fare karaciğer ve yağ dokularını ve rekombinant proteini tanımıştır (şekil 5.18., şekil 5.19., şekil 5.20., şekil 5.21., şekil 5.22.). İkinci immunizasyon sonucunda, hedef insan ASCT2 ekstrasellüler proteinine karşı antikor üretimi gerçekteşiği sonucuna varılmıştır. İlkinde hedef poliklonal antikoron üretilememesinin nedeni farenin yeterince immunize olmaması, az miktarda antijen enjekte edilmesi olabilir. Üretilen antikor insan ASCT2 proteinine karşı olmasına rağmen aynı moleküler ağırlıkta yüksek oranda homoloji gösteren fare ASCT2 proteinini de tanımıştır.

Tez süresince ekstrasellüler ASCT2 proteinine karşı monoklonal antikor yapılması düşünölmüş ve fare boost edilerek dalağı alınmıştır. Dalaktan elde edilen splenositlerin yaklaşık  $1 \cdot 10^6$  (normalde ortalama  $5 \cdot 10^7$  hücre) hücre olması bir dezavantaj olsa da myelom hücreler ile deneye devam edilmiş füzyon işleminin yapıldıktan sonra oluşan hücreler yaşatılamamıştır.

ASCT2 proteinin karaciğer kanser hücre hattında ifade edildiği bilinmektedir<sup>36</sup>. Kanserli hücreler şekerden sonra enerji kaynağı olarak glutamini görüröler. Glutamin varlığında bu hücreler hızla glutamini hücre içine almak isterler. Glutaminin hücre içine alınmasında ASCT2 proteini görev aldığı için bu tip hücrelerde ASCT2 ifadelenmesinin yüksek olması beklenir (78). ASCT2 ile ilgili bu bilgilere ek olarak literatürde böbrek, kalın bağırsak, karaciğer, iskelet kası, testis ve adipoz dokuda ASCT2'nin ifade edildiği bilinmektedir (45,49). Üretilen poliklonal ASCT2 antikor insan hepatoma karaciğer hücre hattı (HepG2), obez/normal farelerin karaciğer ve yağ dokularında ASCT2 proteinin regölasyonunun araştırıldığı western blot deneylerinde kullanılmıştır.

Glutaminin kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha fazla hücre içine alındığı ve ASCT2'nin daha fazla ifadelendiği bilinmektedir (81). şekil 5.25.'te zamana bağlı olarak glutaminin farklı konsantrasyonlarda hücrelere verilmesi durumunda ASCT2'nin

regülasyonu araştırılmıştır. Bu deney bir ön çalışma niteliğinde hangi konsantrasyon ve zamanda en iyi regülasyonun olduğu tespit edilmeye çalışılmıştır. İlginç olarak 4mM ve 10mM glutaminli besiyerinde hücreler birinci saatten sonra ASCT2 ekspresyonunu azaltmaktadır. Sonuç olarak 10mM glutamin uygulandığında geri koruma mekanizması olarak hücre ASCT2 membran reseptörünü kapatıyor olabilir. Literatürde ifade edildiği gibi kanserli hücre hattında ASCT2'nin regüle olduğu tespit edilmiştir. Obez farelerin karaciğer ve adipoz dokusunda normale göre ASCT2 proteininin daha fazla ifade edildiği saptanmıştır. Bu sonuç ile glutaminin yağ metabolizmasına katılması için mi hücre içine alındığı sorusunu oluşturmaktadır. Bu çalışma sonucundan yola çıkarak obeziteye bağlı karaciğer ve yağ dokusundaki bozukluklarda ASCT2 molekülünün ifadenemesinin rolünün incelenmesi ilginç olacaktır.

Deneilerimizde kullanılmak üzere elimizde bir miktar ASCT2 poliklonal antikorca zengin ascites ve serum örnekleri bulunmaktadır. Sonuç olarak poliklonal antikor teknolojisi laboratuvarımızda uygulanmış ve hedef antikor üretilmiştir. Ancak ELISA kiti tasarlamak için daha fazla miktarda ve saflaştırılmış antikora ihtiyaç duyulacaktır. Fareye verilecek antijen elimizde bol miktarda olduğu için yeni fare grubu ile immunizasyon çalışmalarına tekrar başlanacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Harlow EaDL. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY.1988.
2. Chan SY. Recombinant protein production. Google Patents; 1996.
3. Bungard C, McGIVAN J. Glutamine availability up-regulates expression of the amino acid transporter protein ASCT2 in HepG2 cells and stimulates the ASCT2 promoter. *Biochem. J.* 2004;382:27-32.
4. Mullis KB. Recombinant DNA Technology and Molecular Cloning. *Scientific American*. 1990;262:36.
5. Carroll W. Introduction to recombinant-DNA technology. *The American journal of clinical nutrition*. 1993;58(2):249S-258S.
6. Watt PC, Sawicki MP, Passaro Jr E. A review of gene transfer techniques. *The American journal of surgery*. 1993;165(3):350-354.
7. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*. 2004;22(11):1393-1398.
8. De Gelder L, Williams JJ, Ponciano JM, Sota M, Top EM. Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. *Genetics*. 2008;178(4):2179-2190.
9. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990;96(1):23-28.
10. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 1999(10):411-421.
11. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2002;35(2):91-105.
12. Emery AE. *An introduction to recombinant DNA*. Taylor & Francis; 1984.
13. <http://www.addgene.org/vector-database/>.
14. Bell CE, Lewis M. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2000;7(3):209-214.
15. Daber R, Stayrook S, Rosenberg A, Lewis M. Structural analysis of lac repressor bound to allosteric effectors. *Journal of molecular biology*. 2007;370(4):609-619.
16. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology*. 2005;115(2):113-128.

17. Kaufman RJ. Overview of vector design for mammalian gene expression. *Molecular biotechnology*. 2000;16(2):151-160.
18. Ish-Horowicz D, Burke J. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research*. 1981;9(13):2989-2898.
19. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2007(6).
20. Chan W-T, Verma CS, Lane DP, Gan SK-E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. *Bioscience reports*. 2013;33(6):931-937.
21. Garrett RA. *The ribosome: structure, function, antibiotics, and cellular interactions*. ASM Press; 2000.
22. Alonso A, Sanchez P, Martinez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*. 2001;3(1):1-9.
23. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(6):423-435.
24. Eron L, Block R. Mechanism of Initiation of Repression of In Vitro Transcription of the Lac Operon of Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971;68(8):1828-1832.
25. Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ. The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens. *Current microbiology*. 1998;36(6):341-347.
26. Miller JH. The lacI gene: its role in lac operon control and its use as a genetic system. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*. 1980;7:31-88.
27. Jacob F, Monod J. On the regulation of gene activity. Paper presented at: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 1961.
28. Hoffmann A, Roeder R. Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic Acids Research*. 1991;19(22):6337.
29. Bornhorst JA, Falke JJ. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*. 2000;326:245-254.
30. Harris EL, Angal S. Protein purification methods. 1989.
31. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology*. 1999;17(10):1030-1032.



32. Cuatrecasas P. Protein purification by affinity chromatography derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. *Journal of Biological Chemistry*. 1970;245(12):3059-3065.
33. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*. 1975;258:598-599.
34. Albers A, Bröer A, Wagner CA, et al. Na<sup>+</sup> transport by the neural glutamine transporter ATA1. *Pflügers Archiv*. 2001;443(1):92-101.
35. Bode BP, Souba WW. Modulation of cellular proliferation alters glutamine transport and metabolism in human hepatoma cells. *Annals of surgery*. 1994;220(4):411.
36. Bode BP, Kaminski DL, Souba WW, Li AP. Glutamine transport in isolated human hepatocytes and transformed liver cells. *Hepatology*. 1995;21(2):511-520.
37. Rasko JE, Battini J-L, Gottschalk RJ, Mazo I, Miller AD. The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(5):2129-2134.
38. Blond J-L, Lavillette D, Cheynet V, et al. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *Journal of virology*. 2000;74(7):3321-3329.
39. Fuchs BC, Finger RE, Onan MC, Bode BP. ASCT2 silencing regulates mammalian target-of-rapamycin growth and survival signaling in human hepatoma cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007;293(1):C55-C63.
40. Nicklin P, Bergman P, Zhang B, et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009;136(3):521.
41. Xi P, Jiang Z, Zheng C, Lin Y, Wu G. Regulation of protein metabolism by glutamine: implications for nutrition and health. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2010;16:578-597.
42. Newsholme P, Procopio J, Lima MMR, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell biochemistry and function*. 2003;21(1):1-9.
43. Marchesini G, Bianchi G, Rossi B, Muggeo M, Bonora E. Effects of hyperglycaemia and hyperinsulinaemia on plasma amino acid levels in obese subjects with normal glucose tolerance. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000;24(5):552-558.
44. Wijekoon EP, Skinner C, Brosnan ME, Brosnan JT. Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2004;82(7):506-514.

45. She P, Van Horn C, Reid T, Hutson SM, Cooney RN, Lynch CJ. Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2007;293(6):E1552-E1563.
46. Marshall S, Garvey W, Traxinger R. New insights into the metabolic regulation of insulin action and insulin resistance: role of glucose and amino acids. *The FASEB journal*. 1991;5(15):3031-3036.
47. Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y. Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(25):14883-14890.
48. Rajagopalan KN, DeBerardinis RJ. Role of glutamine in cancer: therapeutic and imaging implications. *Journal of Nuclear Medicine*. 2011;52(7):1005-1008.
49. Dai Z-L, Li X-L, Xi P-B, Zhang J, Wu G, Zhu W-Y. l-Glutamine regulates amino acid utilization by intestinal bacteria. *Amino acids*. 2013;45(3):501-512.
50. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(5):367-377.
51. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-846.
52. Özcan U, Yilmaz E, Özcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 2006;313(5790):1137-1140.
53. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004;306(5695):457-461.
54. Zeng M, Liang Y, Li H, et al. Plasma metabolic fingerprinting of childhood obesity by GC/MS in conjunction with multivariate statistical analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010;52(2):265-272.
55. Jensen MD, Haymond MW. Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *The American journal of clinical nutrition*. 1991;53(1):172-176.
56. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*. 1927;8(6):519-530.
57. Wu W, Zhao S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2013;45(1):18-26.
58. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*. 2009;324(5930):1029-1033.

59. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(48):18782-18787.
60. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. United States: Philadelphia : Elsevier/Saunders, c2012.; 2012.
61. Fischer DS. Theories of antibody formation: a review. *The Yale journal of biology and medicine*. 1964;37(1):1.
62. <http://doctorjones.co.uk/Immunology/Tutorial/Clonal%20Selection%20Theory.htm>.
63. <http://www.kyowa-kirin.co.jp/antibody/english/basics/isotypes.html>.
64. Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR journal*. 1995;37(3):93-118.
65. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-497.
66. Kirin KH. Therapeutic Antibodies.
67. Pontecorvo G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic cell genetics*. 1975;1(4):397-400.
68. Melton DW, Konecki DS, Brennan J, Caskey CT. Structure, expression, and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(7):2147-2151.
69. Baker E, Sommer H, Foster L, Meyer E, Meyer K. Studies on immunization against plague I. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. *The Journal of Immunology*. 1952;68(2):131-145.
70. Jennings VM. Review of selected adjuvants used in antibody production. *ILAR Journal*. 1995;37(3):119-125.
71. Leenaars P, Hendriksen CF, De Leeuw WA, et al. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. *ATLA-NOTTINGHAM*-. 1999;27:79-102.
72. Broderon JR. A retrospective review of lesions associated with the use of Freund's adjuvant. *Laboratory animal science*. 1989;39(5):400-405.
73. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 2001;19(17):2666-2672.
74. Campbell AM. *Monoclonal Antibody Technology: The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas: The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas*. Elsevier; 2000.

75. Lueking A, Horn M, Eickhoff H, Büssow K, Lehrach H, Walter G. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Analytical biochemistry*. 1999;270(1):103-111.
76. Overkamp D, Mohammed-Ali S, Cartledge C, Landon J. Production of polyclonal antibodies in ascitic fluid of mice: technique and applications. *Journal of immunoassay*. 1988;9(1):51-68.
77. Zhu C, Lee V, Finn A, et al. Origin of immunoglobulin isotype switching. *Current Biology*. 2012;22(10):872-880.
78. Suzannec Klimberg V, McClellan JL. Glutamine, cancer, and its therapy. *The American journal of surgery*. 1996;172(5):418-424.
79. Medina MA. Glutamine and cancer. *The Journal of nutrition*. 2001;131(9):2539S-2542S.
80. DeBerardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*. 2009;29(3):313-324.
81. Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in biochemical sciences*. 2010;35(8):427-433.
82. McGivan JD, Bungard CI. The transport of glutamine into mammalian cells. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2006;12:874-882.
83. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(5):325-337.
84. Wang Q, Beaumont KA, Otte NJ, et al. Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth. *International Journal of Cancer*. 2014.
85. Chiu M, Tardito S, Barilli A, Bianchi MG, Dall'Asta V, Bussolati O. Glutamine stimulates mTORC1 independent of the cell content of essential amino acids. *Amino acids*. 2012;43(6):2561-2567.
86. Newgard CB, An J, Bain JR, et al. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell metabolism*. 2009;9(4):311-326.
87. Shiraishi N, Furuya A, Toki H, Ando H, Suzuki M, Kubota T. Anti-system ASC amino acid transporter 2 (ASCT2) antibody. Google Patents; 2012.
88. Fonteh AN, Reed W, Samet JM. Determination of Phospholipase A2s Expression in Mast Cells by Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Eicosanoid Protocols*: Springer; 1999:91-105.
89. Robert J ALPERN SCH. *Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology & Pathophysiology 1-2*. Vol 1. Fourth ed.

## EKLER

### EK 1: Etik Kurul Formu



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

#### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :04/09/2013  
TOPLANTI NO :2013-15  
DOSYA NO :2013-102  
KARAR NO :2013-15-117

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Erkan Yılmaz'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Araş.Gör.Gülizar Aydoğdu ve Gamze Çağatay'ın katıldığı "Glutamin Transportunun Endoplazmik Retikulum Stresi ve İnsülin Direnci Üzerine Etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıdaki kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare  
Hayvan Sayısı : 6  
Geçerlilik Süresi : 01/02/2014-01/02/2016

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARIMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 - 50 Faks: 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

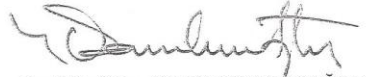
## HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

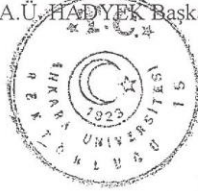
TOPLANTI TARİHİ :04/09/2013  
TOPLANTI NO :2013-15  
DOSYA NO :2013-102  
KARAR NO :2013-15-117

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Erkan Yılmaz'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Araş.Gör.Gülizar Aydoğdu ve Gamze Çağatay'ın katıldığı "Glutamin Transportunun Endoplazmik Retikulum Stresi ve İnsülin Direnci Üzerine Etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıdaki kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare  
Hayvan Sayısı : 6  
Geçerlilik Süresi : 01/02/2014-01/02/2016

ASLININ AYNIDIR  
04/09/2013

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



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Gamze ÇAĞATAY  
**Doğum Yeri** : Sungurlu  
**Doğum Tarihi** : 12.09.1970  
**Medeni Hali** : Bekar  
**Yabancı Dili** : İngilizce

### Eğitim Durumu

**Lise** : Atatürk Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (2003-2007)  
**Lisans** : İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (2007-2012)

### İş Tecrübesi

Kurumu	Görevi	Yılları
Mikrogen Genetik Hastalıklar ve Tanı Merkezi	Moleküler Biyolog	2012 Haziran-2013
Ohio State Üniversitesi	Ziyaretçi Araştırmacı	2011 Haziran-Ekim

### Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Cagatay G, Aydogdu G, Abbasi Avsar, Tuncer A, Yılmaz E. Recombinant Protein of Immunogen Sequence of Human ASCT2 and ASCT2 Polyclonal Antibody Production. III. Molecular Biology Congress, Sept 2014

Aydogdu G, Cagatay G, Yılmaz. The Investigation of Alteration Soluble Endothelial Protein C Receptor (EPCR) Level in Vitro Hyperhomocysteinemia by Sandwich ELISA Method. III. Molecular Biology Congress, Sept 2014