

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN REKOMBİNANT NANO-ANTİKOR YAPILARINDAN
KANSER TANISI VE TEDAVİSİNE YÖNELİK ETKEN MADDE
GELİŞTİRİLMESİ

NURŞAH ERSEZEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2020

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN REKOMBİNANT NANO-ANTİKOR
YAPILARINDAN KANSER TANISI VE
TEDAVİSİNE YÖNELİK ETKEN MADDE
GELİŞTİRİLMESİ

NURŞAH ERSEZEN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. TAMER YAĞCI
II. DANIŞMANI
PROF. DR. BERRİN ERDAĞ

GEBZE
2020

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**DEVELOPMENT OF AN ACTIVE SUBSTANCE
FROM HUMAN RECOMBINANT NANO-ANTIBODY
CONSTRUCTS FOR THE DIAGNOSIS AND
TREATMENT OF CANCERS**

NURŞAH ERSEZEN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. TAMER YAĞCI

II. THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. BERRİN ERDAĞ

GEBZE

2020



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/06/2020 tarih ve 2020/30 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 07/07/2020 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Nurşah ERSEZEN'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TOKCAER KESKİN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Monoklonal antikorlar (MAbs), yaklaşık olarak ~150 kDa büyüklüğünde olan, hedefledikleri yapılara karşı yüksek bağlanma afinitesi gösteren özdeş antikorlardır. Oldukça etkili yapılar olmalarına karşın büyük boyutları tedaviye yönelik yaklaşımlarda kullanımlarını kısıtlayabilmektedir. Nanobodyler (VHH) devegillerden üretilen, antijene bağlanma özelliğine sahip en küçük antikorlardır ve bütün haldeki antikorlara karşı çeşitli avantajlara sahiptirler. Faj gösterim teknolojisi, bakteriyofaj yüzeyinde sunulan (poli) peptid yapılarından hedefe yönelik seçim yapılmasını sağlayan ve MAb üretiminde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında faj gösterim teknolojisi ile yüksek çeşitliliğe sahip naiv insan ağır zincir değişken bölge (VH) antikor kütüphanesi oluşturulmuştur ve birçok kanserde normalden fazla üretildiği bilinen Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü'ne (EGFR) spesifik yapıların seçilimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, sağlıklı insan periferel kanından izole edilen RNA'dan cDNA sentezi yapıp, bu kalıp üzerinden insan VH antikor genlerine spesifik primerler kullanılarak VH antikor genleri PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Antikor kütüphanesi fajmid vektöre klonlandıktan sonra *Escherichia coli* (*E. coli*) amber supresör TG1 bakterilerine transforme edilmiştir. Enfektif fajların oluşumu sağlandıktan sonra faj eldesi yapıp EGFR'ye afinite gösteren yapılar biyopanning döngüleri ile seçilmiştir. 3 döngü sonrasında seçilen klonların antikor geni içerip içermediği PZR ile kontrol edilmiş, EGFR'ye bağlanma afiniteleri faj-ELISA ile değerlendirilmiştir. ELISA ile seçilen klonların DNA dizileri belirlenmiştir. Dizilenen çoğu klonun IGHV3 gen ailesi ile benzerlik gösterdiği ancak klonlanan bölge içerisinde stop kodonu meydana geldiği görülmüştür. 1 klonunda ise klonlanan bölgede stop kodon olmadığı belirlenmiştir ancak literatürdeki antikor genleriyle benzerliği tespit edilememiştir. Bu sebeplerle protein yapılarının çözünürlük üretimleri mümkün olamamıştır ve deneyler bu aşamada durdurulmuştur. İlerleyen çalışmalarda, klonlanan bölgeler içerisinde meydana gelen stop kodonlarının sebeplerinin araştırılması ve klonların EGFR'ye bağlanma potansiyellerinin farklı yollarla doğrulanması öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Monoklonal Antikorlar, Nano-Antikorlar, Faj Gösterim Teknolojisi, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü.

SUMMARY

Monoclonal antibodies (MAbs) are identical antibodies approximately ~150 kDa sizes and possess high binding affinity to their targets. Despite their effectiveness, their huge sizes restrict their use in some cases. Nanobodies (VHH) are the smallest antibodies possess antigen-binding ability originated from camelids and have various advantages over whole antibody constructs. Phage display technology is a method provides selection of desired fragments from (poly) peptide structures displayed on the bacteriophage surface and generally used in MAb development. In this study, high diversity naive human heavy chain variable region (VH) antibody library was constructed with phage display technology and then selection of specific structures against Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), which is overexpressed in many cancers, was performed. For this purpose, RNA isolation was done from healthy human peripheral blood and cDNA was synthesized. From this template, VH antibody genes were amplified by PCR using primers specific to human VH antibody genes. Antibody library was cloned into the phagemid vector and transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) amber suppressor TG1 strain. After the formation of infective phages, phages were rescued and selection against EGFR was performed with biopanning cycles. After 3 rounds of biopanning, clones were controlled by PCR whether the presence of antibody gene. Binding affinities to EGFR were determined by phage-ELISA. Then DNA sequences were determined. Similarities with IGHV3 gene family was observed in most clones, however stop codon was detected in cloned regions. Also in 1 clone there was not any stop codon in cloned region however the similarity with immunoglobulin genes could not be detected. For these reasons, soluble expressions of proteins were not possible and experiments were stopped. In further studies, the reasons of stop codons in cloned regions must be analyzed and binding potential against EGFR must be verified by different ways.

Key Words: Monoclonal Antibodies (Mabs), Nano-antibodies, Phage Display Technology, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).

TEŞEKKÜR

Öncelikle, yüksek lisans eğitimimde öğrencileri olmaktan onur duyduğum, her konuda desteklerini esirgemeyen danışmanlarım Prof. Dr. Tamer YAĞCI ve Prof. Dr. Berrin ERDAĞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yürütülmesine imkan sunan TÜBİTAK MAM GMBE Müdürü Prof. Dr. Şaban TEKİN'e ve bu tez deneysel çalışmalarımın bir kısmının KAMAG 1007 113G100 nolu proje kapsamında desteklenmesine ve burs imkanı sunan Tübitak Kamu Araştırmaları Destek Grubu (KAMAG) Koordinatörü Mustafa AY'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını ortaya çıkaran ve ilerlemesi için gerekli tüm alt yapıyı sağlayan, eğitimim boyunca her zaman yeni bilgiler edinmemi sağlayarak bilgilerini esirgemeyen, TÜBİTAK MAM GMBE İmmünogenetik Laboratuvarı kurucusu Prof. Dr. Berrin ERDAĞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim İmmünogenetik Laboratuvarı üyeleri Aydın BAHAR, Dr. Koray BALCIOĞLU, Dr. Aylin ÖZDEMİR, Dr. Hilal YAZICI, Dr. Ümit ÖZTÜRK, Melis DENİZCİ, Dr. Müge SERHATLI, Dr. Filiz KAYA ve arkadaşlarım Elif AKTAR ile Feyzanur ERDEMİR'e yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Tez jüri üyelerim Prof. Dr. Tamer YAĞCI, Prof. Dr. Uygur Halis TAZEBAY ve Dr. Öğretim Üyesi Zeynep TOKCAER KESKİN'e değerlendirmeleri ve değerli görüşleri için teşekkür ederim.

Bu süreçte her zaman yanımda olan en yakın dostlarım Dilara UZUNER, Fadime DONBALOĞLU, Büşra Nur ÇİÇEK, Buse ÇINAR, Betül ERTURAL ve İlkay ÜNAL'a teşekkür ederim. Son olarak hayatım boyunca her zaman beni destekleyen, bu alanda ilerlememde büyük katkısı olan babam Melih ERSEZEN, annem Hülya ERSEZEN, kardeşim Mustafa Arif ERSEZEN ve aile büyüklerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. MONOKLONAL ANTİKORLAR	3
2.1. Antikor Yapısı	3
2.2. Rekombinant Antikorların Tarihçesi	5
2.3. Rekombinant MAb Üretim Teknikleri	7
2.4. Monoklonal Antikor Tipleri	8
2.5. Monoklonal Antikor Formatları	10
2.6. Monoklonal Antikorların Etki Mekanizmaları	11
2.7. Monoklonal Antikor Üretim Sistemleri	12
3. NANO-ANTİKORLAR	14
3.1. Nanobody'lerin Uygulama Alanları	17
3.1.1. Nanobody'lerin Tedavide Kullanımı	17
3.1.2. Kanser Tedavisinde Nanobody'ler	17
3.1.3. Nanobody'lerin Biyo Görüntüleme ve Tanıda Kullanımı	19
3.1.4. Nanobody'lerin Araştırma Alanında Kullanımı	19
3.2. Nanobody Formatları	20
4. FAJ GÖSTERİM TEKNOLOJİSİ	22
4.1. Faj Gösterim Vektörleri	23
4.2. M13 Bakteriyofajı	24
4.2.1. M13 Enfeksiyon Mekanizması	25
4.3. Faj Gösterim Sistemleri	25

4.4. Faj Gösterim Teknolojisi ile Antikor Üretimi	27
5. KANSERDE MONOKLONAL ANTİKORLAR	31
5.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü	31
6. GEREÇ ve YÖNTEMLER	34
6.1. Gereçler	34
6.1.1. Kullanılan Kitler	34
6.1.2. Kullanılan Enzim, Antikor ve Antijenler	34
6.1.3. Kullanılan Kimyasallar	34
6.1.4. Kullanılan Çözeltiler	35
6.1.5. Kullanılan Primer Dizileri ve Vektör	36
6.1.5.1. Primer Dizileri	36
6.1.5.2. Kullanılan Vektör	38
6.1.6. Kullanılan Bakteri ve Bakteriyofajlar	39
6.1.7. Kullanılan Bakteri Kültür Malzemeleri	39
6.1.8. DNA Belirteçleri, Yükleme Tamponları	40
6.1.9. Kullanılan Cihazlar	40
6.2. Yöntemler	41
6.2.1. Kandan Total RNA İzolasyonu	41
6.2.2. cDNA Sentezi	41
6.2.3. İnsan Ağır Zincir VH Antikor Genlerinin Oluşturulması	42
6.2.4. Antikor Genlerine RE Kesim Bölgelerinin Eklenmesi	44
6.2.5. PZR Örneklerinin Birleştirilmesi ve Pürifikasyonu	44
6.2.6. Restriksiyon Enzim Kesimi	45
6.2.7. Ligasyon	46
6.2.8. Bakteri Kültürü ve Büyütülme Koşulları	46
6.2.9. Bakteri Stoklarının Hazırlanması	46
6.2.10. Kompetan Hücre Hazırlanması	46
6.2.11. Transformasyon	47
6.2.12. Koloni PZR	47
6.2.13. Enfektif Faj Eldesi	48
6.2.14. Faj Titrasyonu	49
6.2.15. Biyopanning	49
6.2.16. Faj-ELISA	50

6.2.17. Plazmid İzolasyonu	51
6.2.18. DNA Dizileme	52
6.2.19. DNA Parmak İzi Analizi	53
7. SONUÇLAR	54
7.1. Antikor Kütüphanesinin Oluşturulması	54
7.1.1. İnsan VH Antikor Genlerinin Oluşturulması	54
7.1.2. Antikor Kütüphanesinin Vektöre Klonlanması ve Bakterilere Transformasyonu	57
7.2. Enfektif Faj Eldesi ve Biyopanning Döngüleri	59
7.3. Klonların EGFR'ye Bağlanması'nın İncelenmesi	61
7.4. DNA Dizileme Analizi	62
7.5. DNA Parmak İzi Analizi	66
8. TARTIŞMA	68
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	79
EKLER	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
μ l	: Mikrolitre
ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
bç	: Baz çifti
CDR	: Complementary determining region
CH	: Ağır zincir sabit bölge
CL	: Hafif zincir sabit bölge
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	: Fragment antigen binding
Fc	: Fragment crystallizable
FR	: Framework
g	: Gram
HAMA	: Human anti-mouse antibody
HCAbs	: Ağır zincir antikorları
Ig	: İmmüoglobulin
kDa	: Kilo dalton
LB	: Luria-Bertani
M	: Molar
MAb	: Monoklonal antikor
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
PBS	: Phosphate-Buffered Saline

PEG	:	Poli etilen glikol
pfu	:	Plak oluşturan birim
pmol	:	Pikomol
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik asit
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
sdAbs	:	Tek domainli antikorlar
TAE	:	Tris Base, Acetic Acid, EDTA
2xTY	:	Yeast Extract-Tryptone
U	:	Enzim ünitesi
V	:	Volt
VH	:	Ağır zincir değişken bölge
VHH	:	Nanobody
VL	:	Hafif zincir değişken bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1:	İmmüoglobulin G yapısının şematik gösterimi. 4
2.2:	a) FR ve CDR bölgeleri, b) Antijen ve antikor etkileşiminin şematik olarak gösterimleri. 5
2.3:	Antikorların kökenlerine göre sınıflandırılması. 9
2.4:	Çeşitli antikor formatlarının şematik gösterimi. 11
2.5:	Antikorların anti-tümör mekanizmaları. 12
3.1:	Konvensiyonel antikorlar, HCAb yapıları ve bu yapılardan oluşturulan antikor parçalarının şematize gösterimi. 15
3.2:	Farklı VHH formatlarının gösterimi. 20
4.1:	M13 bakteriyofajının şematik gösterimi. 24
4.2:	(poli) peptidlerin bakteriyofaj yüzeyinde sunulma çeşitleri. 27
4.3:	Faj gösterim teknolojisiyle antikor geliştirme süreci. 30
5.1:	EGFR'nin ligand ile aktivasyonu. 32
6.1:	pDuck vektör haritası. 38
7.1:	a) 900, b) 901, c) 902 ve d) 903 geri primerleri ile ileri primer kombinasyonlarının PZR görüntüleri. 54
7.2:	a) 6900, b) 6901, c) 6902 ve d) 6903 geri primerleri ile ileri primer kombinasyonlarının PZR görüntüleri. 56
7.3:	a) 6900, b) 6901, c) 6902 ve d) 6903 kütüphanelerinin TG1 bakterilerine transformasyonu sonrası koloni PZR görüntüleri. 58
7.4:	B.E. VH TG1 miks kütüphanesinin çizgi ekim yöntemi sonrası görüntüsü. 59
7.5:	3. Biyopanning döngüsü sonrası a) 1 µL örnek ve b) 1/10 seyreltilmiş örneklerin plate görüntüleri. 60
7.6:	3. Biyopanning döngüsü sonrası koloni PZR. 61
7.7:	3. Biyopanning sonrası faj klonlarının ELISA değerleri. 62
7.8:	K17 klonuna ait DNA dizisi. 64
7.9:	Mevcut K17 dizisinden baz silinmesiyle oluşturulan muhtemel antikor geni. 65
7.10:	K20 klonuna ait DNA dizisi. 66

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
4.1: Faj gösterim teknolojisiyle oluşturulmuş FDA onaylı antikorlardan bazıları.	23
6.1: İnsan VH antikor genlerine spesifik ileri primerlerin listesi.	36
6.2: İnsan VH antikor genlerine spesifik geri primerlerin listesi.	36
6.3: Restriksiyon enzimi bölgesi eklenmiş VH ileri primerlerinin listesi.	37
6.4: Restriksiyon enzimi bölgesi eklenmiş VH geri primerlerinin listesi.	37
6.5: Vektöre spesifik ileri (459) ve geri (458) primerlerin listesi.	38
6.6: RNA-primer-dNTP miksi.	41
6.7: cDNA sentez miksi.	42
6.8: PZR reaksiyon miksi.	43
6.9: PZR döngüsü.	43
6.10: RE bölgesi eklemek için PZR miksi.	44
6.11: SfiI kesim reaksiyonu.	45
6.12: NotI kesim reaksiyonu.	45
6.13: Ligasyon koşulları.	46
6.14: Koloni PZR reaksiyon miksi.	48
6.15: Koloni PZR döngüleri.	48
6.16: Sekans PZR reaksiyonu.	52
6.17: Sekans PZR döngüleri.	52
6.18: BstNI kesim reaksiyonu.	53
7.1: Biyopanning faj verimleri.	60
7.2: Klonlara ait oluşan okuma çerçeveleri.	63

1. GİRİŞ

Monoklonal antikorlar hedefledikleri yapılara bağlanarak hedefin bloklanmasını veya çeşitli mekanizmalarla elimine edilmesini sağlayan etkili moleküllerdir. Hedef aldıkları yapılara karşı sahip oldukları yüksek afiniteli bağlanma potansiyeli dolayısıyla etkinin sağlıklı hücreler yerine sadece hedef alınan hastalıklı hücrelerde görülmesini sağlarlar, bu sayede düşük yan etki gösterirler. Bu sebeple kanser gibi birçok hastalıkta avantaj sağlamaktadırlar. İlk olarak geliştirilen fare kökenli antikorların insanlarda immün reaksiyona sebebiyet verdiği görülmüştür. Bu sebeple zaman içerisinde oluşturulan antikorların fare kökeni azaltılarak insansılaştırılması hatta tamamen insan kökenli antikorların geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Antikor mühendisliğinde yaşanan gelişmeler, monoklonal antikorların farklı formatlarda üretilebilmesini sağlamıştır. Nanobodyler, kamelidlerde (devegillerde) var olan ağır zincir antikorlarının antijen tanımadan sorumlu olan en küçük ve fonksiyonel birimidir. Oldukça küçük boyutlu olmalarına ek olarak, yüksek stabilite ve çözünürlüğe sahip olmaları ve mikrobiyal sistemlerde kolayca üretilebilmeleri dolayısıyla avantajlara sahiptirler. Monoklonal antikor geliştirmede yararlanılan faj gösterim teknolojisi, oluşturulan bir antikor kütüphanesinden istenilen hedefe karşı spesifikite gösteren yapıların seçimini ve üretimini sağlamaktadır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Bu tez çalışmasında, faj gösterim teknolojisiyle naiv insan VH antikor kütüphanesi oluşturulması ve bu kütüphane içerisinde EGFR'ye spesifik olan yapıların seçilerek kanser tedavisinde kullanılmak üzere anti-EGFR nano-antikoru geliştirilmesi hedeflenmiştir. EGFR'ye karşı geliştirilen birçok IgG formatında antikor olmasına ve birçok kamelid kökenli VHH nanobody çalışmaları olmasına karşın bu tez çalışması ile geliştirilmesi planlanan insan nano-antikor yapılarıyla insan nano-antikorlarının kanser tanı ve tedavisindeki potansiyellerinin araştırılması ve diğer antikor formatlarıyla karşılaştırmalı analizlerinin gerçekleştirilebilmesi istenmiştir. Ayrıca bu çalışmada immünizasyon olmaksızın oluşturulması planlanan antikor kütüphanesinin naiv olması dolayısıyla bu kütüphanenin ileride birçok farklı

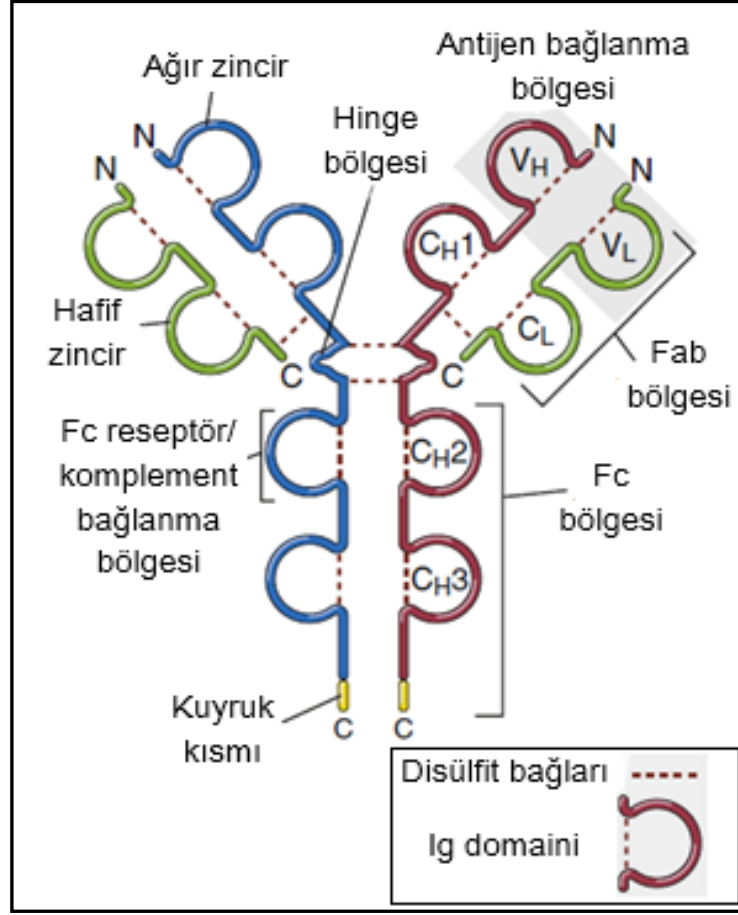
hedefe karşı antikor geliştirilmesinde de kullanılabilmesi istenmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda, naiv insan VH antikor kütüphanesi oluşturulmuş, EGFR'ye spesifik olan muhtemel klonların seçilimi faj gösterim teknolojisiyle sağlanmıştır. Ancak DNA dizileri belirlenen klonlarda literatürdeki antikor genleriyle benzerlik gösterilmesine karşın klonlanan bölge içerisinde stop kodonu olduğu tespit edilmiştir. İlerleyen çalışmalarda, klonlanan bölgeler içerisinde oluşan stop kodonlarının sebeplerinin aydınlatılması ve farklı klonların analiz edilerek DNA yapılarının belirlenmesi planlanmaktadır.

2. MONOKLONAL ANTİKORLAR

2.1. Antikor Yapısı

Antikorlar, yabancı maddelere karşı bir yanıt olarak bağışıklık (immün) sistemi hücreleri tarafından oluşturulan ve antijen olarak adlandırılan spesifik yapıları tanıyıp bağlanma özelliğine sahip proteinlerdir [1]. B lenfositleri tarafından oluşturulan bu moleküller, membrana bağlı veya salgılanan antikorlar olmak üzere iki formda bulunabilirler. Membrana bağlı antikorlar antijen reseptörü görevindeyken; salgılanan antikorlar toksin veya patojen gibi yabancı yapıların elimine edilmesinde görev almaktadır [2].

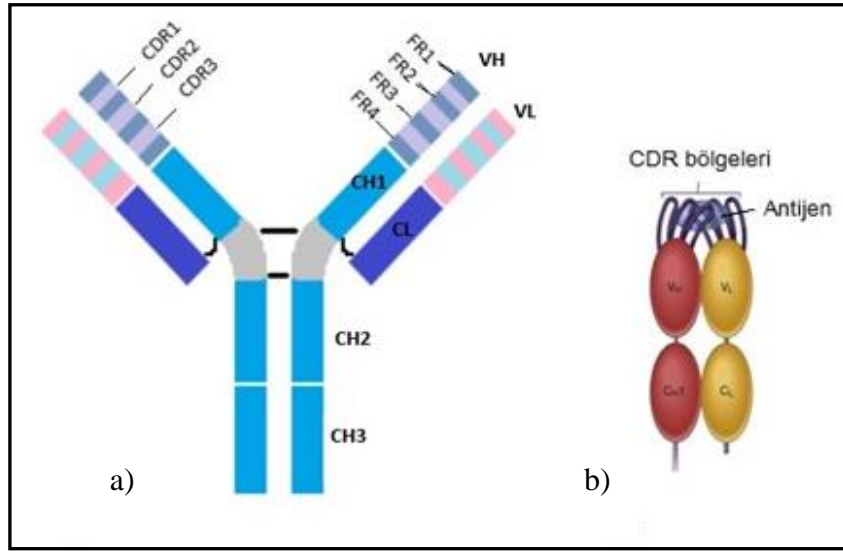
Antikorlar sahip oldukları yapı ve özelliklere göre izotip olarak adlandırılan farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bu sınıflar IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM olarak adlandırılmaktadır. Bunlar içerisinde memelilerde en yaygın olan izotip formu "Y" şeklinde olan immüoglobulin G (IgG) yapılarıdır [1,3]. IgG yapısı, her biri ağır ve hafif zincir içeren, disülfid bağlar ile bağlanmış iki simetrik yapıdan oluşur. Ağır zincir ile hafif zincirin bir arada tutulmasını disülfid bağ sağlamaktadır. Ağır ve hafif zincirler, Ig birimi olarak adlandırılan globüler yapıdaki tekrarlanan homolog birimlerden oluşmaktadır. Ağır zincir, VH (Variable Heavy) olarak adlandırılan değişken bölge ve CH (Constant Heavy) olarak adlandırılan 3 adet sabit bölgeden oluşmaktadır. Hafif zincir ise bir adet VL (Variable Light) değişken bölgesinden ve bir adet CL (Constant Light) sabit bölgesinden oluşmaktadır. Antikoron amino-terminal kısmında bulunan ağır ve hafif zincirlerin değişken kısımları antijen bağlanma bölgelerini oluşturur. Hafif zincirin tamamı, ağır zincirin değişken bölgesi ve CH1 kısmıyla birlikte Fab (Fragment antigen binding) kısmını oluşturmaktadır. Ağır zincirin CH2 ve CH3 kısımları ise Fc (Fragment crystallizable) reseptörü içeren immün sistem hücreleri ile etkileşerek efektör fonksiyonların gerçekleşmesinden sorumlu olan Fc bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Antikoron CH1 ile CH2 kısımlarını bağlayan ve antikora esneklik kazandıran bölge hinge olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge proteolitik parçalanmaya yatkındır ve bu durumda Fab kısmı ile Fc kısmının birbirinden ayrılması sağlanabilmektedir [2]. İmmüoglobulin G antikoruna ait yapı Şekil 2.1'de gösterilmektedir [2].



Şekil 2.1: İmmüoglobulin G yapısının şematik gösterimi.

Antikorlar, yabancı materyaldeki 6-8 aminoasitten oluşan epitop olarak isimlendirilen antijenik determinantları tanımaktadır. Dolayısıyla her bir antikor spesifik bir epitopu tanıma özelliğine sahiptir. Bu yapılar lineer formda olabileceği gibi 3 boyutlu halde katlanmış yapıda da olabilmektedir [1]. Antijeni tanımadan sorumlu bölgeler, ağır ve hafif zincirlerin değişken bölgelerinde bulunan çok değişken bölgelerdir (hypervariable regions). Antikor dizileri arasında en fazla farklılık gösteren kısımlar bu bölgelerdir. Spesifik antijen ile çok değişken bölgeler arasındaki komplementerlik sonucunda antijen ve antikor bağlanması gerçekleşmektedir. Bu sebeple, çok değişken bölgeler CDR bölgeleri (Complementarity Determining Regions) olarak da adlandırılır. Ağır ve hafif zincirlere ait VH ve VL değişken bölgelerinde CDR1, CDR2 ve CDR3 olmak üzere 3 farklı çok değişken kısım bulunmaktadır. Bu bölgelerden antijen ile teması en fazla olan bölge CDR3 bölgesidir ve CDR bölgeleri içerisinde en fazla değişkenlik gösteren kısımdır. Ayrıca bazı durumlarda antijene bağlanmada bazı CDR bölgeleri etkileşime girmeyebilirken; framework bölgeleri (FR) de antijene bağlanmada görev

alabilmektedir. Framework bölgeleri değişken bölgede yer alan, CDR bölgelerine bitişik olarak bulunan ve korunmuş dizilerden oluşan bölgelerdir. Sabit bölgeler gibi framework bölgeleri de, antikorların farklı türlerde farklılık göstermesini sağlayan bölgelerdir [2]. Antikor yapısında FR ve CDR bölgeleri ve antikor-antijen etkileşimi Şekil 2.2'de gösterilmektedir [2].



Şekil 2.2: a) FR ve CDR bölgeleri, b) Antijen ve antikor etkileşiminin şematik olarak gösterimleri.

2.2. Rekombinant Antikorların Tarihi

1890 yılında Emil Von Behring ve Shibasaburo Kitasato'nun, toksinlere maruz kalan hayvanların kanındaki antikorları keşfi ile bu moleküllerin medikal ve endüstriyel amaçlarla kullanılması fikri ortaya çıkmış ve zaman içerisinde antikor mühendisliği teknolojisi büyük bir araştırma konusu haline gelmiştir [4].

İmmün sistem herhangi bir antijen tarafından uyarıldığında, farklı B hücreleri tarafından o antijen üzerindeki farklı epitoplara tanıyan, farklı bir dizilime ve yapıya sahip, birbirinden farklı birçok antikor üretilmektedir. Bu durumda oluşturulan antikorlar poliklonal antikor olarak adlandırılmaktadır. Sadece tek bir B hücre klonu tarafından oluşturulan, tek bir epitopa özgü olan ve her biri aynı bağlanma özgüllüğü gösteren özdeş antikorlar ise monoklonal antikor olarak tanımlanmaktadır [1,4].

Poliklonal antikorlar, tavşan, koyun, at gibi bir donörün hedef antijen ile immünize edilip belirli bir süre sonra hayvanın serumunun toplanmasıyla elde

edilmektedir. Bu şekilde elde edilen antiserumun, 19. yy.da difteri gibi hastalıkların tedavisinde başarı sağladığı görülmüştür. Ancak poliklonal antikörlerin üretiminde verimin düşük olması, donör organizmanın yeterli üretime elverişli olamaması, farklı üretim lotlarının farklı hassasiyet göstermesi ve donörün çeşitli sebeplerle ölmesi gibi durumlar antikör üretiminde sürekliliğin sağlanmasına engel olmuştur. Ayrıca, antikör kaynağının hayvansal olması tedavi edilen bireyde o antikörlerin yabancı olarak tanınmasına dolayısıyla serum hastalığı durumunun gelişmesine yol açabilmektedir. Bu şekilde poliklonal antikörler ölümcül bir hastalık durumuna karşı hızlı bir tedavi sağlarken, tekrarlanan bir uygulama hastada daha kötü komplikasyonların gelişmesine hatta anafilaktik şoka sebebiyet verebilmektedir. Bu sebepler poliklonal antikörlerin tedavide kullanımını kısıtlarken, bu antikörlerin bir antijene ait birçok epitopu tanınması, stabilitelerinin yüksek olması ve degradasyon riskinin düşük olması dolayısıyla birçok tanı testlerinde ve ELISA, Western blot gibi laboratuvar tekniklerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [5].

Antikörlerin tedavide kullanımı amacıyla antikör üreten hücrelerin *in vitro* olarak büyütülmesi üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla yapılan ilk çalışmalarda antikör salgılayan B hücrelerinin kaynak organizmadan izole edildiğinde kültür ortamında birkaç gün içerisinde ölmesi antikörlerin laboratuvar koşullarında üretilmesinde büyük bir sorun haline gelmiştir [4].

1975 yılında Georges Köhler ve Cesar Milstein'in, belirli spesifisiteye sahip antikör salgılayan hücrelerin sürekli olarak kültür edilmesini ortaya koyması, rekombinant monoklonal antikör çalışmalarının başlamasına olanak vermiştir [4]. Hibridoma teknolojisi olarak adlandırılan bu yöntemde immünize edilmiş bir fareden alınan ve normal kültür ortamında sınırlı ömre sahip spesifik B hücre klonları, sınırsız bir büyüme özelliğine sahip miyeloma hücrelerine füzyon edilerek ölümsüzleştirilmiştir. Bu sayede sürekli olarak antikör salgılayan ve kültür edilebilen hibridoma hücreleri oluşturulmuştur [6].

İmmün sistem tarafından etkili bir koruma ajanı olarak üretilen bu yapıların laboratuvar ortamında üretilmesinin ardından, monoklonal antikörlerin teşhis ve tedavi amaçlı potansiyelleri, üretim süreçlerinin iyileştirilmesi ve geliştirilmesi konusunda çalışmalar hızla artmıştır. Monoklonal antikörler tanıdıkları hedef yapılara karşı yüksek spesifisite ve afinite göstermeleri, bunun yanında yan etkilerinin az olması sebebiyle tanı, tedavi ve biyo görüntüleme gibi çeşitli amaçlarla

kullanılabilmektedirler [1,7]. Günümüzde monoklonal etken maddeli ilaçlar çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır [8].

2.3. Rekombinant MAb Üretim Teknikleri

Monoklonal antikorların laboratuvar ortamında üretimi ilk kez 1975 yılında Milstein ve Köhler'in ortaya koyduğu hibridoma tekniğiyle mümkün olmuştur. Bu teknik, immünize bir donörden alınan lenfositlerin fare miyeloma hücreleriyle çeşitli yöntemlerle birleştirilmesiyle, spesifik bir hedefe karşı antikor üreten ve sürekli olarak kültür edilebilen hibrid hücreler oluşturulmasına dayalı bir yöntemdir. Bu yöntemde antikor üreten hibrid hücreler oluşturulduktan sonra istenen hedefe karşı yüksek afiniteye sahip klonların seçilimi gerçekleştirilir ve bu hibridoma klonun kültür edilmesiyle hedefe spesifik antikorlar oluşturulur [5]. Bu yolla mürin monoklonal antikorları başarıyla elde edilebilirken; bu antikorların kemirgen ve insan immün sistemlerindeki farklılıklar dolayısıyla insanlarda sitotoksikite ve hatta ölümcül reaksiyonlar gelişmesine sebebiyet verdiği görülmüştür [1,8]. Bu sebeple hibridoma teknolojisinin, insan antikorunu üretmek için geliştirmesine yönelik çalışmalara başlanmıştır. İlk olarak, mutant fare miyeloma hücreleri ile insan B lenfositleri füzyon edilmiş, bu yolla elde edilen fare-insan hibridomalarının kısa bir süre antikor üretimini gerçekleştirdiği ancak daha sonra insan kromozomunun elimine edilmesiyle antikor salgılanmasının durduğu gösterilmiştir. Bu sebeple, hibrid hücre oluşturmada fare miyeloma hücreleri yerine insan miyeloma hücrelerinin kullanılmasına çalışılmıştır. Ancak bu durumda da hibrid hücre oluşturmada kullanılacak stabil insan miyeloma hücrelerinin olmaması, başka alternatif çözüm arayışına sebep olmuştur. Bu amaçla yapılan çalışmalarda başarı elde edilen yöntemlerden bir tanesi insan ve fare miyeloma hücrelerinin hibridiyle elde edilen heteromiyelomaların kullanılmasıdır [9]. Diğer bir yöntem ise, insan antikorunu üreten hücrelerin bir herpes virüsü olan Epstein-Barr virüsü (EBV) ile enfeksiyonu yoluyla immortalize edilmesidir. Ancak burada da, elde edilen klonların stabilitesinin düşük olduğu ve belirli bir süre sonra antikor üretiminin durabildiği görülmüştür [10,11].

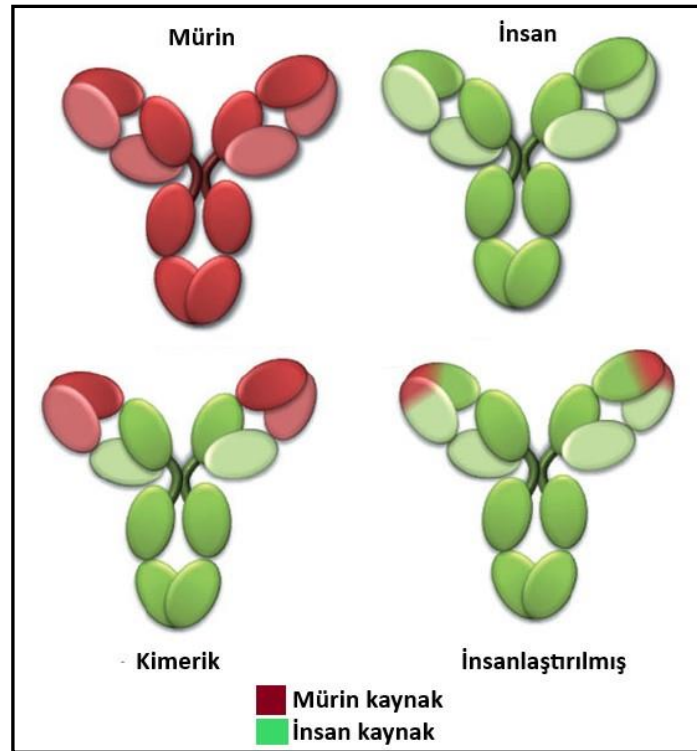
Genetik manipülasyon tekniklerinin gelişmesi insan antikorunu geliştirilmesinde yaşanan sıkıntıların çözülmesine olanak sağlamıştır. 1985 yılında George Smith

tarafından geliştirilen faj gösterim teknolojisi, insan antikorlarının geliştirilmesi konusunda büyük bir avantaj sağlamıştır. Bir *in vitro* seçim temeline dayanan faj gösterim teknolojisi, filamentöz bakteriyofajın kılıf proteinine füzyon edilmiş antikor parçalarından, belirli bir hedefe karşı spesifite gösteren klonların seçilimi ve çoğaltılmasını sağlamaktadır. (*Faj gösterim teknolojisi detaylarıyla birlikte Bölüm 4'te açıklanmaktadır.*) Buna ek olarak monoklonal antikor geliştirmede kullanılan diğer bir yöntem ise insan monoklonal antikorunu üreten transgenik farelerin oluşturulmasıdır. Transgenik fareler ile insan antikorunu üretimi farklı şekillerde yapılabilmektedir. Bu yollardan bir tanesinde, ilk önce fare immüoglobulin genleri genetik müdahale ile susturulur. Bunun sonucunda fare antikorunu üremeyen fareler üretilir. Diğer bir fare ise insan immüoglobulin genleri ile modifiye edilir. Bu sayede farenin hem fare hem insan antikorları üretmesi sağlanır. Daha sonra bu iki tip farenin yavru oluşturulmasıyla, fare antikorunu üremeyen ve insan antikorunu üreten transgenik fare soyları elde edilir [12,13].

2.4. Monoklonal Antikor Tipleri

Monoklonal antikorlar kökenlerine göre sınıflandırıldığında; mürin (fare), kimerik, insanlaştırılmış ve insan antikorları olmak üzere dört sınıfa ayrılmaktadır [8]. Mürin kaynaklı antikorların insan tedavisinde kullanımında genellikle insanda istenmeyen immün reaksiyonlar gözlenmektedir. Bunun sebebi, fare antikorunun içerdiği ve insan immün sisteminin yabancı olarak algıladığı faresel yapılardır. Bu sebeple, mürin antikorlarının tedavi amacıyla sürekli olarak insana uygulanması sonucunda, HAMA (human anti-mouse antibody) olarak adlandırılan, fare antikoruna karşı insan antikorları oluşmakta ve bu durum alerjik reaksiyonlara hatta anafilaktik şoka sebebiyet verebilmektedir. Bu yolla üretilen ve başarısızlığa uğrayan terapötik antikorlar sonrasında mürin antikorlarının, antijen tanıma spesifitesini değiştirmeksizin çeşitli genetik müdahaleler ile iyileştirilmesi fikri ortaya çıkmıştır [8]. Bu amaçla insan antikorunun sabit bölgesini ve antijen tanımadan sorumlu fare antikorunun değişken kısmının kombinasyonu olan kimerik antikorlar oluşturulmuştur. Bu antikor yapılarının yaklaşık olarak %65'inin insan antikoruna özelliğine sahip olması ve Fc kısmının tamamen insan kökenli olması gelişebilecek immünojenite riskini azaltmaktadır. Zaman içerisinde antikor mühendisliğinin

gelişmesi, mürin yapıların daha da azaltılarak yaklaşık olarak %90 insan kökenli insanlaştırılmış antikorların oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Bu tip antikorlar, bütün bir insan antikorundaki çok değişken bölgelerin mürin çok değişken bölgesi ile değiştirilmesi yoluyla elde edilmektedir. CDR grafting denilen yöntemle oluşturulan bu antikorlarda immünojenisite riski kimerik antikorlara kıyasla daha da azaltılmıştır. Ancak bu tip antikorların bazılarında, mürin antikoruna kıyasla antijene bağlanmanın azalabildiği gösterilmiştir. Bu sorunu gidermek amacıyla CDR bölgeleri üzerinde yapılan çeşitli mutagenizasyonlar ile antijene bağlanmanın iyileştirilmesi gibi optimizasyonlar yapılabilmektedir. Günümüzde piyasada mevcut olan kimerik ve insanlaştırılmış birçok monoklonal antikor bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak Infliximab ve Rituximab kimerik yapıda antikorlar iken; Alemtuzumab ve Daclizumab insanlaştırılmış formattadır. Bu antikor tiplerine alternatif olarak bütünüyle insan monoklonal antikoru oluşturulması yenilikçi yaklaşımlar ile mümkün olabilmüş ve bu sayede monoklonal antikorların klinik başarısında artış mümkün olmuştur. Adalimumab tamamen insan kökenli olan kullanımı onaylanmış ilk monoklonal antikordur [8,14]. Antikorların kökenlerine göre sınıflandırılmasına ait gösterim Şekil 2.3'te gösterilmiştir [14].

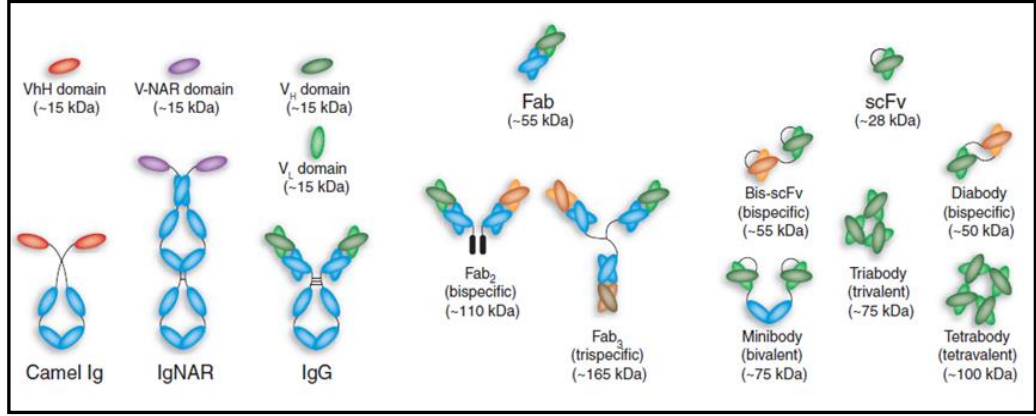


Şekil 2.3: Antikorların kökenlerine göre sınıflandırılması.

2.5. Monoklonal Antikor Formatları

Antikor mühendisliğinin gelişmesi zaman içerisinde bütün bir IgG yapısının yerine bu yapıdan daha avantajlı olabilecek farklı formatların oluşturulabileceği ve çeşitli amaçlarla kullanılabilmesi fikrini ortaya çıkarmıştır. İlk olarak Sally Ward ve arkadaşlarının 1989 yılında gerçekleştirdiği çalışmalar, bütün bir antikor yapısı yerine sadece VH fragmanları kullanıldığında spesifik bir hedefe karşı aynı bağlanma özelliklerinin korunduğunu göstermiş ve bu durum tek domainli antikorların (sdAbs) başlangıcı olmuştur [15]. Daha sonra yapılan çalışmalarda deve türlerinde var olan antikor yapılarının büyük çoğunluğunu VL yapısı içermeyen ağır zincir antikorlarının (HCAs) oluşturduğunun keşfedilmesi, VL yapısı olmaksızın sadece VH yapısının fonksiyonel olarak antijen bağlama özelliği gösterdiğini kanıtlamıştır [16].

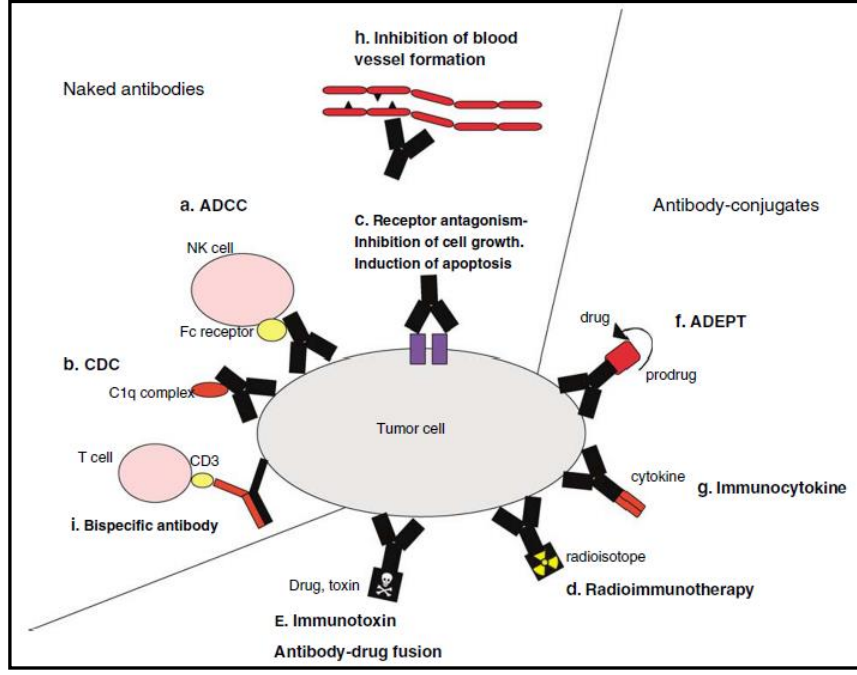
Bu amaçlarla, monoklonal antikorları daha küçük yapılara ayırarak scFv, Fab, diabody, minibody, tek domainli antikorlar gibi farklı antikor formatları oluşturulmuş ve bu yapıların çeşitli alanlarda umut vadettiği görülmüştür. Bu yapılar hedefe bağlanmada MAb yapılarındaki gibi yüksek spesifite ve aviditeye sahipken; MAB'lara kıyasla üretimleri daha kolay ve ekonomik olabilmektedir. Küçük boyutlu antikorlar teşhis ve tedavide de çeşitli avantajlara sahiptirler. Bu yapılar multivalent, multispesifik yapılar halinde oluşturulabilmekte veya radyonüklid, enzim, toksin, virüs veya lipozom gibi terapötik maddelerle birleştirilerek terapötik etkinin güçlendirilmesi amacıyla kullanılabilirler [17]. Bunlara örnek olarak; enzim ile birleştirilmesiyle prodrug terapide; toksinlerle birleştirilmesiyle kanser tedavisinde, virüslerle birleştirilerek gen terapisinde, katyonik yüklerle birleştirilerek DNA taşınımında, lipozomlarla birleştirilerek gen terapinin güçlendirilmesinde veya hedef moleküllerin gerçek zamanlı tespiti için biyosensörlerle birleştirilerek kullanılabilirler. Bütün IgG yapısı ve modifiye edilmiş bazı antikor formatlarının şematik gösterimleri Şekil 2.4'te verilmiştir [17]. Bu formatlara her gün yenileri eklenebilmektedir. Örnek olarak, VH antikor parçasının Fc antikor bölgesiyle füzyonu mümkündür ve yapılan bir çalışma bu yolla elde edilen VH-Fc antikorunun; Fc bölgesinin özelliklerinin de eklenmesiyle hem efektör fonksiyonları uyardığını hem de VH antikoruna kıyasla yarı ömrünün uzadığını göstermektedir [18].



Şekil 2.4: Çeşitli antikor formatlarının şematik gösterimi.

2.6. Monoklonal Antikorların Etki Mekanizmaları

Antikorlar doğaları gereği çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Bu fonksiyonlardan kaynaklanan etkileri ise nötralizasyon, ADCC (Antikor Bağımlı Hücre Sitotoksitesi) aktivasyonu, CDC (Komplement Bağımlı Sitotoksite) aktivasyonu yollarıyla olabilmektedir. Nötralizasyon edici antikorlar, hedefledikleri ligand ya da reseptör yapısını bloklayarak o yapının fonksiyonunu engellerler. Bunun sonucunda da o yapıların rol aldığı sinyal yolağı baskılanmış olur. İkinci etki mekanizmasında ise, antikorlar bir hedefe bağlandıktan sonra, Fc kısımlarını tanıyan reseptöre sahip bir immün efektör hücreyle etkileşime geçerler. Bu etkileşim sonucu, efektör hücre fonksiyonuyla hedef hücrenin lizizi gerçekleştirilir. Bu durum ADCC olarak adlandırılmaktadır [7,19]. Benzer diğer bir etki mekanizması ise CDC olarak adlandırılan komplement sisteminin aktifleştirilmesi yoludur. Burada, antikorun hedefe bağlandıktan sonra komplement sisteme ait C1 proteini bu yapıya bağlanır, komplement sisteminin aktif hale gelmesiyle diğer komplement proteinleri çağırılır ve hücrenin lizizi için gerekli işlemler başlar[20]. Bu etki mekanizmalarına ek olarak antikorlar radyoizotoplar, toksinler, ilaçlar, immünoenzimler veya sitokin gibi çeşitli moleküllerle konjuge edilerek taşıyıcı ajan olarak da faaliyet gösterebilmektedirler. Bu sayede terapötik etkinin kanser hücrelerine hedeflendirilmesini yani hedeflendirilmiş tedaviyi sağlarlar [7,20]. Antikorların tümör hücrelerine olan etkileri Şekil 2.5'te gösterilmektedir [20].



Şekil 2.5: Antikorların anti-tümör mekanizmaları.

2.7. Monoklonal Antikor Üretim Sistemleri

Monoklonal antikorlar; bakteriler, mayalar, memeli hücreleri ve transgenik organizmalar gibi pek çok sistemle üretilmektedir. Üretimde hangi sistemin kullanılacağı, oluşturulacak antikorun gerektirdiği özelliklere göre belirlenmektedir. Örnek olarak, eğer oluşturulacak antikor yapısı glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar gerektirmiyorsa bakteride üretimleri kolayca gerçekleştirilebilmektedir. Bu yolla Fab, VH, scFv, bispesifik antikorlar gibi glikozilasyon içermeyen küçük yapıları başarıyla üretilmektedir. Buna ek olarak basit yapıları organizmalar, düşük maliyetli ve diğer sistemlere kıyasla üretimin kolay olması dolayısıyla post-translasyonel modifikasyonların fonksiyonel olmadığı durumlarda kullanılabilirler. Ancak üretilen yapı bütün bir IgG yapısı ise birçok modifikasyon gerektireceği için üretiminde daha gelişmiş yapıları ökaryotik bir organizma kullanılmalıdır [10,21]. Ancak post-translasyonel modifikasyonları sağlamak için maya, mantar, bitki gibi daha gelişmiş organizmalar kullanılsa da, bu organizmalar ile elde edilen antikorlarda memeli hücrelerinden farklı olan ve normal insan antikorundan bulunmayan farklı modifikasyonlar gerçekleştirilebilmektedir. Örnek olarak, mayalarda üretilen antikorlarda mannoz yoğunluğunun çok fazla olduğu görülmektedir ve bu durumun antikorun efektör

fonksiyonlarını engellediği belirlenmiştir. Buna benzer başka bir durum ise böcek hücreleri ve bitki gibi organizmaların kullanılmasında gerçekleşir. Bu durumda üretilen antikorlar memeli hücreleriyle üretilenlerden farklı karbonhidrat yapılarına sahiptir. Antikor üretiminde diğer bir önemli konu, antikorda olması gereken katlanma yapısı ve üretilen antikorun salgılanmasıdır. Memeli dışındaki organizmalarda üretilen antikorlarda katlanma ve saflaştırmada da problemler görölmektedir. Bu nedenle, maliyetinin oldukça yüksek, üretiminin diğer sistemlere kıyasla zor ve birçok optimizasyon gerektirmesine rağmen en iyi üretim yolu memeli hücreleriyle antikor üretilmesidir. Günümüzde piyasada mevcut olan terapötik antikorların yaklaşık olarak %95'i memeli hücreleriyle üretilmektedir. Memeli hücrelerinde üretimde fare hücreleri ile kalite bir üretim gerçekleştirilebilmesi dolayısıyla bu hücre hatları sıklıkla kullanılabilir. Bu amaçla CHO (Chinese Hamster Ovary) ve NS0 gibi fare hücre hatları yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bu durumda da, farede gerçekleşen glikozilasyon ile insan hücreleri arasında küçük farklılıklar görölebilmekte ve bu durum ilacın aktivitesini etkileyebilmektedir. Bu sorunları aşmak amacıyla iyileştirilmiş hücre hatları ve ekspresyon sistemleri geliştirilmektedir. Sonuç olarak, üretimde kullanılan tüm sistemlerin sağladığı avantajların yanında dezavantajları da bulunabilmekte ve günümüzde bu konularda iyileştirmeler yapılması üzerindeki çalışmalar devam etmektedir [21,22].

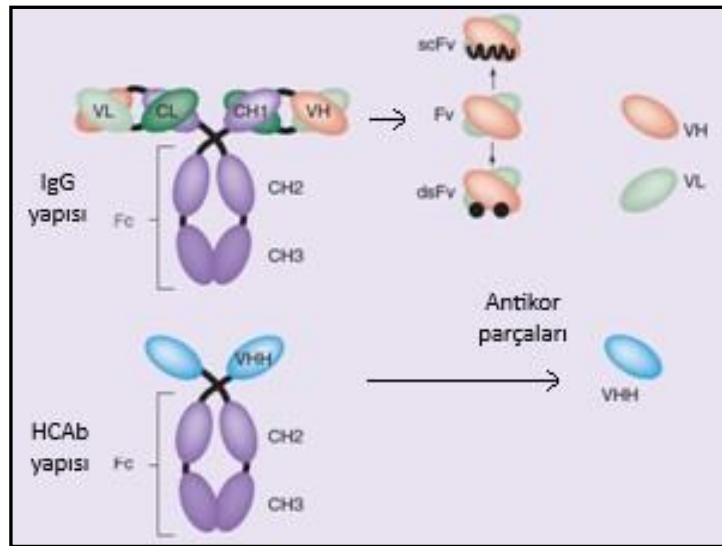
3. NANO-ANTİKORLAR

1964 yılında Utsumi ve ekibinin bütün bir antikor yapısını parçalayarak birimlerini incelemesiyle VH yapılarının tek başına antijene bağlanma özelliğini koruduğu ortaya koyulmuştur [23]. 1989 yılında Sally Ward ve ekibinin, immünize farenin dalak genomik DNA'sı üzerinden oluşturduğu VH antikor genlerini *E. coli*'de eksprese edip saflaştırması, VH birimlerinin tek başına etkili bir antijen bağlanma profili gösterdiğini kanıtlamıştır [15]. Bu çalışmayla elde edilen VH antikorlarının, aynı antijene spesifik olan bütün haldeki antikora benzer şekilde bağlanma afinitesine sahip olduğunun keşfedilmesi ve bütün haldeki antikor yapılarından oldukça küçük bir boyuta sahip olması, bu antikorların çeşitli avantajlar sağlayacağı düşüncesini ortaya çıkarmış ve tek birimli antikor olarak adlandırılan yapıların başlangıcını oluşturmuştur.

1993 yılında Hamers-Casterman ve ekibinin gerçekleştirdiği çalışmayla, devegiller (kamelid) familyasında hafif zincir içermeyen, sadece ağır zincirden oluşan fonksiyonel antikorların rastlantısal olarak keşfedilmesi bu konu üzerindeki çalışmaların artmasına olanak sağlamıştır [16]. Ardından devegillerdeki ağır zincir antikorlarına benzer şekilde köpek balıklarında da sadece ağır zincirden oluşan Ig-NAR (New Antigen Receptor) antikorları keşfedilmiştir [24]. Devegillerde keşfedilen, yaklaşık olarak 95 kDa büyüklüğündeki HCAs ağır zincir antikorları olarak adlandırılmıştır. HCAs antikorları, devegillerde bulunan antikorların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır ve yapılan çalışmalar bu antikorların hafif zincir CL bölgesi için bağlanma yeri olan CH1 bölgesini içermediğini göstermiştir [16,25]. Çoğu memelide, ağır zincir ve hafif zincir translasyonu olduktan sonra bir araya gelmeleri endoplazmik retikulumda gerçekleşmektedir. Bu süreçte öncelikle oluşturulan ağır zincire heavy chain binding proteini (Bip) bağlanır ve bu protein, ağır zincirdeki CH1 bölgesiyle hafif zincirin bağlanmasını sağladıktan sonra yapıdan ayrılır. Hafif zincirin olmaması durumundaysa, ağır zincir-Bip kompleksi E2-ubikitin ligaz ile birleşir ve degrade edilmek üzere proteazoma götürülür. Develerde IgG2 ve IgG3 sınıfı antikorların CH1 bölgesinde varolan bir tek baz değişikliği mutasyonundan dolayı CH1 kısmı oluşamamakta, Bip antikora bağlanamamakta ve dolayısıyla hafif zincir içermeyen olgun HCAs antikorları doğal olarak oluşmaktadır [26]. Deve familyalarında doğal olarak oluşan ve fonksiyonel olan bu

antikorlar, insan ve farelerde normal koşullarda oluşamamakta, sadece ağır zincir hastalığı olarak adlandırılan bir bozukluk sonucunda oluşabilmektedir. Ancak bu durumda oluşan antikorların fonksiyonel olmadığı ve elimine edildiği bilinmektedir [16,25].

Devegillerde keşfedilen bu ağır zincir antikorlarının VHH olarak adlandırılan, antijen tanımadan sorumlu olan değişken bölgesi, spesifik antijene bağlanma için gerekli potansiyele sahip en küçük antijen bağlanma birimidir. Yaklaşık olarak 12-15 kDa büyüklüğünde, 4 nm uzunluğunda ve 2.5 nm çapında olan VHH yapıları boyutları dolayısıyla Ablynx firması tarafından Nanobody® olarak adlandırılmış ve kabul görmüştür [27,28]. Konvansiyonel antikorlar, ağır zincir antikorları ve bu yapılardan oluşturulan antikor formatlarının görselleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir [29].



Şekil 3.1: Konvansiyonel antikorlar, HCAb yapıları ve bu yapılardan oluşturulan antikor parçalarının şematize gösterimi.

Develerdeki VHH yapıları ile fare/insan VH yapılarının dizileri karşılaştırıldığında ise, bazı belirgin farklılıklarla birlikte iki formatın da benzer bir yapıda olduğu; 4 korunmuş framework bölgesini ve 3 farklı çok değişken CDR bölgesini içerdiğini göstermiştir. Yapılan analizler, mürin veya insan VH yapısında VL ile etkileşimde görevli olan FR2 bölgesinin daha çok hidrofobik özellikte olan aminoasitler içerirken; VHH FR2 bölgesinin hidrofilik aminoasitler içerdiğini göstermiştir. Bu durum, fare ve insan VH yapılarının VL ile birlikte olmaması durumunda daha fazla yapışkan olacağı anlamına gelmektedir. Bu aminoasitlerin

VHH yapısına benzer bir şekilde modifiye edilmesi sonucu çözünürlüğün artması bu durumu kanıtlamaktadır [3]. Diğer bir belirgin farklılık ise deve VHH yapısının CDR3 bölgesinin insan ve fare CDR3 bölgelerine kıyasla daha uzun olmasıdır. Bu durum VHH yapılarının konveks bir antijen tanıma bölgesi oluşturmasını sağlamakla birlikte esneklik sağlar ve konvansiyonel antikorların ulaşmasının zor olduğu bölgelerdeki epitoplara tanınmasını destekler. VHH ve VH yapılarında antijen tanıma bölgelerinde görülen bu farklılıklar dolayısıyla VHH ve VH yapılarının farklı şekillerdeki antijenleri tanımasını mümkün olmaktadır [28,30]. Buna ek olarak, VHH ile insan VH3 immünooglobulin ailesi arasında %80'in üzerinde benzerlik görülmüştür. Bu durum, VHH'lerin insanda kullanımının düşük immünojenisite riski gösterebileceğini desteklemektedir [27,28,31]. Bunun yanında, VHH'leri terapötik alanda daha güvenilir hale getirmek amacıyla, framework bölgelerinde değişiklikler yapılarak insanlaştırma çalışmaları yapılabilmektedir. Bu amaçla özellikle kamelid ve insan VH yapılarında farklılık gösteren FR2 bölgesinde değişiklikler yapılarak; çözünürlük, stabilite ve afinite özellikleri değişmeksizin nanobody yapıları oluşturmaya çalışılmaktadır [32]. VHH antikorları oldukça küçük olmaları sebebiyle, konvansiyonel IgG antikorlarının nüfuz edemediği bölgelere etki edebilmektedir. Ayrıca, VHH yapılarının etkili antijen bağlanma bölgelerine sahip olması ve yüksek antijen bağlama kapasitesi göstermelerine ek olarak, bu yapıların daha dayanıklı moleküller olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar konvansiyonel antikorlara kıyasla, bu yapıların +4°C ve -20°C koşullarında daha uzun raf ömüne sahip olduğunu, 60-80°C gibi yüksek sıcaklıklara, düşük/yüksek pH koşullarına, kimyasal denatüranlara ve proteazlara daha dayanıklı olduğunu, hatta denatüre olmaları durumunda tekrar orijinal formlarına katlanma yapabildiklerini göstermiştir. Bunlara ek olarak, VHH'lerin monomerik yapıdan oluşmaları için konvansiyonel antikorlara kıyasla daha stabil olduğu ve içerdikleri hidrofilik amino asitlerden dolayı suda çözünürlüklerinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Ayrıca VHH yapılarının oldukça küçük yapılar olması ve post-translasyonel modifikasyon içermemeleri üretimlerinin bakteri gibi basit yapılı mikroorganizmalarda düşük maliyetle yapılabilmesine olanak vermektedir. Bu amaçla laboratuvar ortamında antikor repertuarları oluşturularak, faj gösterim gibi tekniklerle hedefe spesifik yapıların seçimi yapılmaktadır. Sonrasında karakterize edilen nanobody yapılarının üretimi mikrobiyal ekspresyon sistemleriyle gerçekleştirilebilmektedir [24,27,28,31].

3.1. Nanobody'lerin Uygulama Alanları

VHH Nanobody (Nb) yapıları konvansiyonel monoklonal antikorların sahip oldukları problemleri aşmaları dolayısıyla bilimsel araştırma, teşhis, tedavi, endüstri alanlarında umut vadetmektedir ve bu yapıların geliştirilmesi konusundaki çalışmalar hızla devam etmektedir. Bunun yanında Nanobodylerin etkilerini arttırmak ve mevcut sıkıntılarını gidermek amacıyla çeşitli yapılarla konjugasyonları üzerine yoğun bir şekilde çalışmalar yapılmaktadır.

3.1.1. Nanobodylerin Tedavide Kullanımı

Nanobodyler çeşitli molekülleri nötralize edici, reseptör-ligand antogonisti veya ilaç taşıyıcı moleküller olarak hedeflenmiş tedavide kullanılabilirler [26]. Konvansiyonel antikorlara kıyasla sahip oldukları üstünlükler dolayısıyla kanser, oto-immün, inflamasyon, enfeksiyon ve nörolojik hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımları değerlendirilmektedir [24,27]. Nanobodylerin ulaşılması zor olan epitop bölgelerine ulaşabilir olmaları ve hedef yapıyı bloke etmede gösterdikleri başarı, bu yapıları Fc parçaları olmamasına rağmen IgG antikorlarına karşı üstünlük kazandırmaktadır. Buna ek olarak Nanobodylerin konvansiyonel Mab'lara kıyasla sahip oldukları küçük boyut, kan-beyin bariyerini geçmelerine de olanak sağlamaktadır. Bu sebeple bu moleküllerin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de avantaj sağlayacağı düşünülmekte ve bu konuda çalışmalar sürmektedir [24,26]. Bunun yanında, birçok firma tarafından geliştirilmiş monomerik, multimerik veya multispesifik formlarda birçok nanobodynin prelinik veya klinik çalışmaları devam etmektedir. Caplacizumab, bir kan hastalığı olan trombotik trombositopenik purpura tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş, *E. coli*'de üretilmiş ve kullanımı 2019 yılında FDA ve EMA tarafından onaylanmış ilk insanlaştırılmış bivalent nanobodydir [28,33].

3.1.2. Kanser Tedavisinde Nanobodyler

Monoklonal antikorların spesifik olarak kanser hücrelerini hedefleyebilmeleri ve bu sayede sağlıklı hücrelere zarar vermemeleri kanser tedavisinde büyük avantaj

sağlamıştır. Bunun yanında büyük moleküller olmaları, kan dolaşımında uzun süre (4-5 gün) durabilmeleri bazı kısıtlamalara sebep olurken, nanobody gibi küçük antikor formatlarının geliştirilmesi daha etkin ve başarılı bir tedavi için umut vericidir [28].

Kanserde önemli rol oynayan sinyal yollarında görevli ligand veya reseptör gibi yapılara karşı geliştirilen nanobodyler, bu yapıları bloklayarak fonksiyonunu engeller. Bu sayede kanser tedavisinde başarı sağlayan nanobodylere, Fc parçasının füzyon edilerek efektör fonksiyonların tetiklenmesi de mümkündür. Bu sayede hem hedef yapının bloklanması sağlanarak hem de efektör fonksiyonlar ile kanser hücrelerinin öldürülmesi sağlanabilmektedir [27,28]. Nanobodylerin kanser tedavisinde spesifik yapının hedeflenmesi ve bloklanması oldukça etkili olmalarına karşın, kan dolaşımından böbrekler yoluyla elimine edilmesi en büyük ve çözülmesi gereken problemlerinden biridir [28].

Nanobodylerin etkilerini arttırmak ve iyileştirmek amacıyla çeşitli moleküller ile konjugasyonları yapılmaktadır. Nanobodylerin ilaç ve ilaç yüklü lipozom veya misel gibi nanopartiküllerle birleştirilmesiyle, ilacın doğrudan hedef bölgeye gitmesi sağlanabilmektedir. Buna benzer bir şekilde nanobodylerin (pro)enzim, toksin gibi yapılarla konjugasyonu da yapılabilmektedir. Böylelikle nanobody yapısı kanser hücrelerinin hedeflenmesini sağlarken; taşımış olduğu ilaç vb. moleküllerin etkilerinin sistemik dolaşım yerine hedef bölgede gerçekleşmesi sağlanır ve sağlıklı hücrelere zarar verilmeksizin terapötik etki sadece kanser hücrelerinde meydana gelir [24,28,34].

Nanobodylerin multimerik formlarda veya multispesifik formlarda üretilmesi de tedavideki başarıyı arttırabilmektedir. Yapılan bir çalışmada EGa1 isimli anti-EGFR nanobodylerinin EGFR'yi bloklamada etkili olduğu görülürken, bu yapıların lipozom yüzeyine konjuge edilmiş multimerik formlarının monomerik yapıya kıyasla reseptörü bloklamada daha etkili olduğu ve bunun yanında EGFR'nin %90'dan fazlasının parçalanmasını sağlayarak tümör hücrelerinin proliferasyonunu büyük miktarda engellediğini göstermiştir [35]. Daha sonra bu yapılar EGFR'ye ek olarak, kanser hücrelerinin büyümesinde etkili başka bir molekül olan IGF-1R reseptörüne karşı hedeflenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, AG538 IGF-1R inhibitörleri anti-EGFR nanobody-lipozom yapısına enkapsüle edilmiştir. Bu sayede ikili hedefleme ile tek hedefli yapılara kıyasla kanser hücrelerinin proliferasyonunda etkinliğin artırılması sağlanmıştır [36].

3.1.3. Nanobodylerin Biyo görüntüleme ve Tanıda Kullanımı

Konvansiyonel Mab'lar hastalık tanısı amacıyla biyo görüntüleme ajanları olarak kullanılabilmelerine karşın 150 kDa boyutları, sağlıklı dokularda non-spesifik olarak birikim yapabilmeleri, kandan uzaklaştırılmalarının yavaş olması ve Fc parçalarına sahip olmaları gibi bazı özellikleri nedeniyle tedavide kısıtlara yol açmaktadır. Ayrıca MAb yapıları katı tümörlere nüfuz etmede zayıflık göstermektedir [29]. Nanobodyler ise bu sıkıntıları aşabilmektedir. Yapılan çalışmalar nanobodylerin yüksek spesifisite ile hedef doku ve hücrelere ulaşırken; kan dolaşımında tek başlarına düşük yarı ömre sahip olduklarını göstermiştir. Bu sayede konvansiyonel antikolar ile ulaşılması zor olan bölgelere ulaşım sağlanabilirken, yüksek spesifisite ve dolaşımda yarı ömürlerinin kısa olması *in vivo* görüntüleme kullanımları açısından avantaj sağlamaktadır [28]. Bu sayede nanobodyler hastalık teşhisinde spesifik biyobelirteçlerin tespiti amacıyla kullanılabilme potansiyeline sahiptirler [37]. Nanobodyler PET gibi moleküler görüntüleme uygulamalarında kullanılması için çeşitli radyoizotoplarla işaretlenmeleri gerekmektedir. Bu çalışmalara örnek olarak, ⁶⁸Ga-NOTA anti-HER2 nanobody yapılarının meme kanseri hastalarında beyin metaztazının tespiti amacıyla kullanım potansiyeli değerlendirilmekte, şuan fazII klinik çalışmaları devam etmektedir [28,38]. Bu yapıların tanı ve tedavide kullanımlarını kısıtlayan bir durum ise böbreklerde birikim yapması ve boyutlarının küçük olması dolayısıyla hedef antijenle karşılaşmadan eliminasyonlarının gerçekleşebilmesidir. Buna ek olarak böbreklerde birikiminin toksisiteye de sebep olabildiği görülmektedir. Bu durumda etkili bir kullanım için, nanobody uygulamasının tekrarı gerekmektedir. Buna alternatif olarak ise nanobodyler multimerik formda oluşturularak, albumin gibi uzun ömürlü serum proteinleriyle füzyon haline getirilerek veya PEG gibi kimyasallarla birleştirilerek; renal eliminasyonları engellenebilmekte veya dolaşımdaki yarı ömürlerinin arttırılabilmesi sağlanabilmektedir [27,28,37].

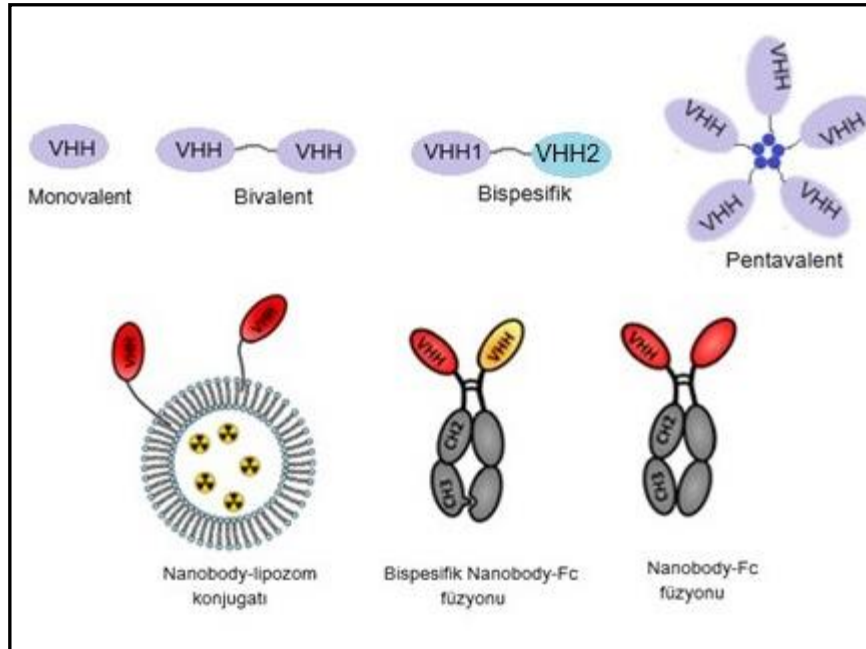
3.1.4. Nanobodylerin Araştırma Alanında Kullanımı

Nanobodyler oldukça stabil moleküller olmaları ve organik çözücülere dayanıklı olmaları, bu maddelerin immünoafinite kromatografisi gibi laboratuvar

tekniklerinde kullanıma dair potansiyel ortaya koymaktadır [31]. Nanobodylerin floresan proteinlerle füzyon edilmesiyle chromobodyler oluşturulabilmekte ve bu sayede hücre içi yapıların görüntülenmesi sağlanmaktadır [28,31]. Günümüzde birçok firma tarafından geliştirilen rekombinant VHH yapıları moleküler görüntüleme, ELISA, Western blot, SPR, immünopresipitasyon ve immünfloresan gibi tekniklerde kullanılmak üzere üretilmektedir.

3.2. Nanobody Formatları

Nanobody yapılarının daha kullanışlı hale getirilmesi amacıyla monomerik olan nanobodyler, polivalent yani birçok birimden oluşan formatlara dönüştürülebilirler. Bunun yanında, tek bir hedefi tanımak yerine birden fazla hedefe karşı geliştirilen yapıların birleştirilmesiyle multi spesifik yapılar oluşturulabilmektedir. Bu yapıların şematize hali Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Bu sayede hem birden fazla molekül hedeflenerek afinite iyileştirmesi yapılabilmekte hem de stabilite ve çözünürlük gibi özelliklerin tek birimli VHH'lere kıyasla iyileştirilmesi sağlanabilmektedir [24,39].



Şekil 3.2: Farklı VHH formatlarının gösterimi.

Bunun yanında VHH'ler için bir diğer araştırma alanı ise, VHH yapılarının intrabody olarak üretilmesidir. Intrabodyler antikor kodlayan dizinin belirli bir sinyal peptid ile birlikte olarak vektöre klonlanması ve hücreye transfeksiyonu sonrası hücre içinde üretilen antikorlardır. Yapılan çalışmalar *in vitro* ve *in vivo* modellerde intrabodyler ile hücre içi yapıların hedeflenmesiyle istenen fonksiyonların durdurulabildiğini göstermektedir. İleride intrabody VHH yapılarının gen terapi ile *in vivoda* kullanılabilir olması VHH yapıları ile birçok hastalığa karşı oldukça etkili moleküllerin elde edilmesini sağlayabilecektir [31,40].

4. FAJ GÖSTERİM TEKNOLOJİSİ

Faj gösterim teknolojisi, (poli) peptid yapılarının filamentöz bakteriyofaj yüzeyinde sunulmasını sağlayan bir tekniktir. Faj fenotipinin doğrudan enkapsüle haldeki faj genotipine bağlı olmasına dayanan bu teknik ilk olarak 1985 yılında George P. Smith'in, yabancı DNA fragmanlarını filamentöz bakteriyofajın pIII kılıf proteinini kodlayan gen III bölgesine füzyon etmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Bu sayede enfektif virion oluşumu engellenmeksizin, yabancı DNA'nın kodladığı (poli) peptid yapısı filamentöz fajın yüzeyinde sunulmaktadır [41].

Gen III bölgesi filamentöz fajın minör kılıf proteini pIII'ü kodlayan gen bölgesidir. pIII proteininin amino terminal bölgesi enfeksiyon sırasında bakterilerin F-pilusuna bağlanmayı sağlarken; karboksi terminal bölgesi virion içerisinde bulunup morfogenezde görev almaktadır. G. Smith yaptığı çalışmada pIII proteininin amino ve karboksi terminal bölgeleri arasına yabancı bir DNA klonlamış ve klonladığı bu DNA parçasının virüsün enfektivitesini ve pIII proteininin fonksiyonunu bozmaksızın, faj yüzeyinde immünolojik olarak aktif halde eksprese edildiğini göstermiştir [41]. Faj gösterim teknolojisinin temelini oluşturan bu çalışma, faj yüzeyinde peptid veya polipeptid yapılarının sunulması ile immünizasyon gerekmeksizin antikor geliştirilmesine olanak sağlamıştır [42].

Faj gösterim teknolojisiyle, antikor genlerini kodlayan (poli) peptid yapılarının kapsid yapısında sunulmasının ardından, spesifik bir hedefe karşı seçilimi ve çoğaltılmasıyla, yüksek afinite ve aviditeye sahip, belirli bir hedef moleküle spesifik yapıların seçilimi sağlanabilmektedir [43].

Diğer bir deyişle, immün sistemin *in vitro* ortamda taklit edilmesi olarak düşünülebilecek faj gösterim teknolojisi ile immün sistemin B hücrelerinin yüzeyinde sunulan her biri farklı özellikteki antikorların bakteriyofaj yüzeyinde sunulması ve yine immün sisteme benzer şekilde belirli bir hedefe bağlanan fajların seçilimi sağlanabilmektedir. Sonrasında, istenen hedefe spesifik antikorların çözünür olarak üretimi gerçekleştirilir. Faj gösterim teknolojisiyle antikorlara ek olarak, peptid dizileri veya protein yapılarının da faj yüzeyinde sunulmasıyla spesifik yapıların seçilimi ve üretimi mümkün olmaktadır [44].

Faj gösterim teknolojisi, antikor üretimine ek olarak; protein-ligand etkileşimleri, reseptör bağlanma bölgeleri ve proteinlerin ligandlarına bağlanma

afinitelerinin iyileştirme ve modifiye edilmesinde oldukça önem arz etmektedir. Bu yöntemle mevcut antikorların afinitelerinin iyileştirilmesi de sağlanabilmektedir [45]. Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere faj gösterim tekniğiyle geliştirilmiş onaylı birçok antikor piyasada mevcuttur [46,47]. Bunlardan bazıları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Faj gösterim teknolojisiyle oluşturulmuş FDA onaylı antikorlardan bazıları.

Antikor adı	Ticari adı	Hedefi	Formatı
Adalimumab	Humira	TNF α	İnsan IgG1
Belimumab	Benlysta	BCAF	İnsan IgG1
Ramucirumab	Cyramza	VEGFR2	İnsan IgG1
Necitumumab	Portrazza	EGFR	İnsan IgG1
Atezolizumab	Tecentriq	PD-L1	Hümanize IgG1
Avelumab	Bavencio	PD-L1	İnsan IgG1
Guselkumab	Tremfya	IL-23	İnsan IgG1
Emapalumab	Gamifant	IFN γ	İnsan IgG1
Moxetumumab pasudodox	Lumoxiti	CD22	Fare IgG1 dsFv
Ranibizumab	Lucentis	VEGF-A	Hümanize IgG1 Fab

4.1. Faj Gösterim Vektörleri

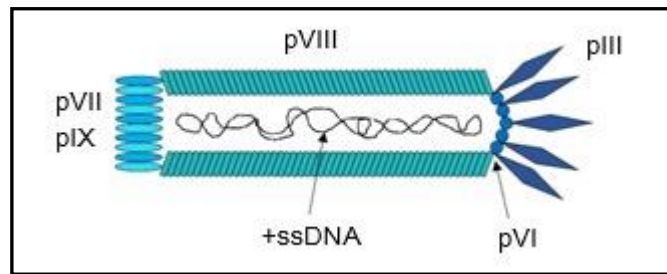
Fajlar, bakterileri enfekte eden ve onların replikasyon mekanizmasını kullanarak kendi replikasyonlarını sağlayan virüslerdir. Rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan vektörlerin çoğunluğunu oluştururlar. Bu yapılar konakçı organizmayı enfekte ederek, kendi replikasyonlarını konakçı organizmanın replikasyon mekanizmalarını kullanarak gerçekleştirirler. Bu sayede vektöre eklenmiş yabancı yapıların faj yüzeyinde çoğaltılması mümkün olmaktadır. Genel vektörlerle kıyaslandığında faj gösterim teknolojisinde kullanılan ekspresyon vektörleri yabancı yapının faj yüzeyinde çoğaltılmasına ek olarak, o yapıya karşılık peptidin/proteinin çözünük üretilmesine olanak sağlarlar. Klasik ekspresyon yönteminden farklı olarak, faj gösterim teknolojisinde üretimi sağlanacak yapı virüsün bir tip kılıf proteinine genetik olarak birleştirilir. Böylece enfektif virion

oluşup hücre dışına çıktığında, yabancı protein ve virüs kılıf proteini füzyon protein şeklinde virüsün yüzeyinde sunulmuş olur. Faj gösterim teknolojisi bu mantıkla, her biri farklı bir DNA yapısına sahip dolayısıyla yüzeyinde farklı bir (poli) peptid yapısı sunan bir faj antikor kütüphanesi içerisinde spesifik bir hedefe karşı olan antikor/peptid/protein yapılarının afiniteye göre seçilmesine olanak sağlar [48].

Faj gösterim teknolojisinde f1, fd ve M13 *E. coli* filamentöz bakteriyofajları, sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bunlara alternatif olarak, T7, T4 ve Lambda faj gösterim teknolojileri de uygulanabilmektedir. T4 faj gösterim teknolojisi ikili gösterim sağlayan bir sistemdir ve cDNA ekspresyonunda uygulanabilmektedir. Lambda faj gösterim sistemi ise M13 sistemlerine kıyasla daha büyük yapıdaki proteinlerin sunulmasını sağlamaktadır [45]. M13 filamentöz fajlarının avantajı ise konakçı bakteriyi kendi çoğalmalarını gerçekleştirmek için kullanırken; lizise uğratmamalarıdır. Buna karşın, T4 ve T7 fajları litik fajlardır [49,50].

4.2. M13 Bakteriyofajı

M13 bakteriyofajı, Ff fajlar grubuna ait olan, 900 nm uzunluğa ve 6.5 nm genişliğe sahip, filamentöz formda bir bakteriyofajdır. Bu tip bakteriyofajların bakteriyeye tutunması fajın kılıf proteininin bakterinin F pilus ucuna bağlanmasıyla sağlanmaktadır. Dolayısıyla, Ff fajlar sadece F pilusa sahip olan *E. coli* suşlarını enfekte etmektedirler. M13 bakteriyofajı 6407 bazdan oluşan tek iplikçikli DNA (ssDNA) yapısına sahiptir ve 11 farklı proteini kodlayan 9 genden oluşmaktadır. Bu proteinlerden pIII, pVI, pVII, pVIII ve pIX isimli 5 tanesi fajın kılıf proteinleriyken; pI, pII, pIV, pV, pX ve pXI isimli 6 tanesi fajın replikasyonu, birleştirilmesi ve ekstrüzyonunda görevlidir [51]. M13 bakteriyofajının şematize görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmektedir [51].



Şekil 4.1: M13 bakteriyofajının şematik gösterimi.

4.2.1. M13 Enfeksiyon Mekanizması

Enfeksiyon süreci temel olarak *E. coli* erkek bakterisinin F-pilusunun birleşmesi (assembly) ve ayrılması (disassembly) döngüleri sayesinde olmaktadır. Enfeksiyon, fajın G3P kılıf protein N2 biriminin, bakterinin F-pilusuna tutunmasıyla başlar. Daha sonra F-pilusun ayrılması (disassembly) sürecinde faj, bakteri yüzeyine yaklaşmış olur ve G3P proteininin N1 domaini, bakteri yüzeyindeki TolA reseptörüne bağlanır ve yardımcı reseptör olarak görev alır. TolA proteini, TolQ ve TolR proteinleriyle birlikte faj kılıfının depolimerize olmasını başlatmasıyla, faj ssDNA'sı bakteri içerisine transfer edilir. İçeriye alınan DNA, bakterinin DNA sentez mekanizmasıyla çoğaltılarak komplementer DNA'sı oluşturulur. Bu sayede oluşturulan supercoiled yapılı çift iplikçikli (dsDNA) M13 DNA'sı replikatif form (RF) olarak adlandırılır ve bu yapı kalıp olarak kullanılarak yeni RF yapılarının, tek iplikçikli faj DNA'larının sentezi ve faj proteinlerinin transkripsiyonu gerçekleştirilir [51]. Oluşturulan ssDNA'lar hücre membranından dışarıya atılır ve faj kılıf proteinlerinin edinilmesiyle virion halinde paketlenirler [48].

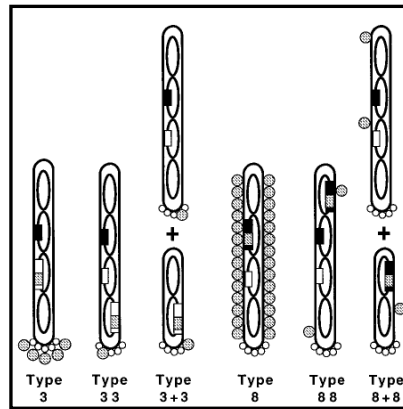
4.3. Faj Gösterim Sistemleri

Faj gösterim tekniğinde kullanılacak vektör sistemleri; tip 3, tip 3+3, tip 33, tip 8, tip 8+8, tip 88 gibi şekillerde sınıflandırılmaktadır. Örnek olarak, tip 3 veya tip 8 gösterimleri tek bir faj genomu içermektedir. Dolayısıyla, klonlanan yabancı diziler tüm p3 veya p8 proteinlerine füzyon olarak üretilir. Yani tek bir virionda birden fazla yabancı poli (peptid) üretilir ve bu sayede polivalent gösterim gerçekleştirilir [48,52]. Tip 33 veya tip 88 gösterimlerinde ise; genom iki farklı pIII veya pVIII proteinini kodlamaktadır. Bunlardan birincisi yabancı DNA'nın füzyon edileceği pIII/pVIII iken; diğeri yabancı tipdir. Bu sayede oluşan virion hem yabancı tip hem de rekombinant tip pIII/pVIII içerir [48,53]. Bu sistemlerde faj vektörleri kullanılırken; tip 3+3 veya tip 8+8 formatlarında ise klonlama fajmid vektöre yapılmakta ve virion oluşumu için yardımcı fajdan yararlanılmaktadır. Bu sistemde, pIII veya pVIII proteinlerini kodlayan genler iki farklı genomda bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, yabancı DNA'nın füzyon edildiği pIII/pVIII içeren fajmid vektör, diğeri ise yabancı tip kılıf proteinlerinin geldiği yardımcı faj genomudur [48]. Fajmid vektörler,

plazmid replikasyon orijini ve seçici antibiyotik direnç geni ile birlikte filamentöz bakteriyofajın replikasyon orijinini ve ssDNA paketleme sinyalinin içeren ama virion oluşumu için gerekli diğer etmenleri içermeyen yapılardır. Bu sebeple virion oluşumu için virüsün yapısal proteinlerini içeren ancak deforme bir replikasyon orijinine sahip olan yardımcı faja ihtiyaç duyarlar. İçerdikleri replikasyon orijini sayesinde bakterilerde replikasyonları sağlanırken; konak hücrenin yardımcı faj ile enfeksiyonu sonrasında, yardımcı faj aracılığıyla virion formuna paketlenmektedir. Paketleme sırasında, fajmiden üretilen yabancı protein-kılıf protein füzyonları ile yardımcı fajdan üretilen kılıf proteinlerinin virion yapısına katılması yarışmalı olarak gerçekleşir. Bu sayede üretilen fajların büyük çoğunluğunun yabancı proteini monovalent olarak sunması sağlanabilmektedir [48,51–53]. Diğer bir deyişle, faj vektörleri polivalent gösterim dolayısıyla düşük afiniteli çok fazla sayıda yapının elde edilmesini sağlar; fajmid vektörlerle sağlanan monovalent gösterim yüksek afiniteli klonların seçilimine olanak sağlamaktadır [43,51]. Buna ek olarak, fajmid vektörlerinin faj vektörlerine kıyasla transformasyon verimlerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir [54]. Fajmid vektörlerin faj vektörlerinden farklı olarak sağladığı bir diğer avantaj ise, *in vivo* immün sistem mekanizmasının taklit edilmesini sağlamasıdır. Antikor geni fajmid vektöre klonlanırken, antikor geni ile virüs kılıf proteinini pIII arasına yerleştirilen bir stop kodonu sayesinde antikorun faj yüzeyinde sunulması veya besiyeri ortamına salınması, fajmidin süpresör veya non-süpresör bakteri suşlarına transformasyonu sağlanmaktadır. Bu sayede de *in vivo* da olduğu gibi, antikorun B hücresi yüzeyinde sunulması veya plazma hücreleri tarafından salgılanması durumu *in vitro* olarak taklit edilmiş olur [43]. Fajmid vektörlerde klonlamanın yapılacağı bölge olan çoklu klonlama bölgesi (MCS: Multiple cloning site), virüsün kılıf protein geninin önünde bulunmaktadır. Bu iki bölge arasında saflaştırmada kullanılmak üzere bir işaretçi bölge ve bunun bitiminde kılıf protein geninin hemen öncesinde bir TAG amber stop kodonu bulunmaktadır. Eğer fajmid vektör TG1 gibi supE süpresör bakteri soylarında büyütülürse, amber stop kodon durma sinyali olarak algılanmaz ve bunun yerine glutamin amino asiti kodlanır. Bu sayede sentezin devam etmesiyle (poli) peptid dizisi fajın kılıf proteinine füzyon olarak üretilir ve faj yüzeyinde sunulur. Yani bu sayede poli peptid yapısı, B yüzey antikorlarında olduğu gibi reseptör görevi görür. Eğer fajmid, HB2151 gibi sup⁻süpresör olmayan bakteri soylarında büyütülürse, klonlanan dizi ile kılıf proteini arasındaki amber stop kodonu dur sinyali

olarak algılanır ve klonlanan dizi fajdan ayrı şekilde çözünür olarak üretilir. Bu sayede de plazma hücrelerinden antikor salgılanması durumu taklit edilmiş olur. Bu şekilde çözünür olarak üretilen yapıların bakteri kültüründen saflaştırılması da fajmid vektörde bulunan işaretleyiciler (histidin işaretleyiciler vb.) sayesinde yapılabilmektedir [55].

pIII, pVI, pVIII proteinleri (poli) peptid kodlayan gen parçalarının füzyonu için uygun olduğu belirlenen proteinlerdir. Ancak, çoğunlukla pIII ve pVIII proteinleri kullanılmaktadır. Kılıf proteinlerinden kapsid protein pVIII, 2700 kopya sayısına sahip olan bir major kılıf proteinidir ve faj kromozomunun çevresinde bir zarf oluşturmaktadır. pIII ise enfeksiyonda görev alan bir minör kılıf proteinidir ve 3-5 adet kopya sayısına sahiptir [51]. pVIII proteini yüksek kopya sayısına sahip olması dolayısıyla büyük fragmanların sunulmasını sağlayamamaktadır. Klonlanacak olan yapının büyük olması durumunda faj kılıf yapısı engellendiği için; faj oluşumu meydana gelememektedir. Bu durum sonucunda virion oluşumu sağlanamazken; küçük peptid dizilerinin sunulması için kullanılabilir. Buna rağmen çoğu çalışma, daha düşük kopya sayısı içermesi sebebiyle pIII ile gerçekleştirilmektedir [52,53]. Farklı gösterim tipleri Şekil 4.2'de gösterilmektedir [48].



Şekil 4.2: (poli) peptidlerin bakteriyofaj yüzeyinde sunulma çeşitleri.

4.4. Faj Gösterim Teknolojisi ile Antikor Üretimi

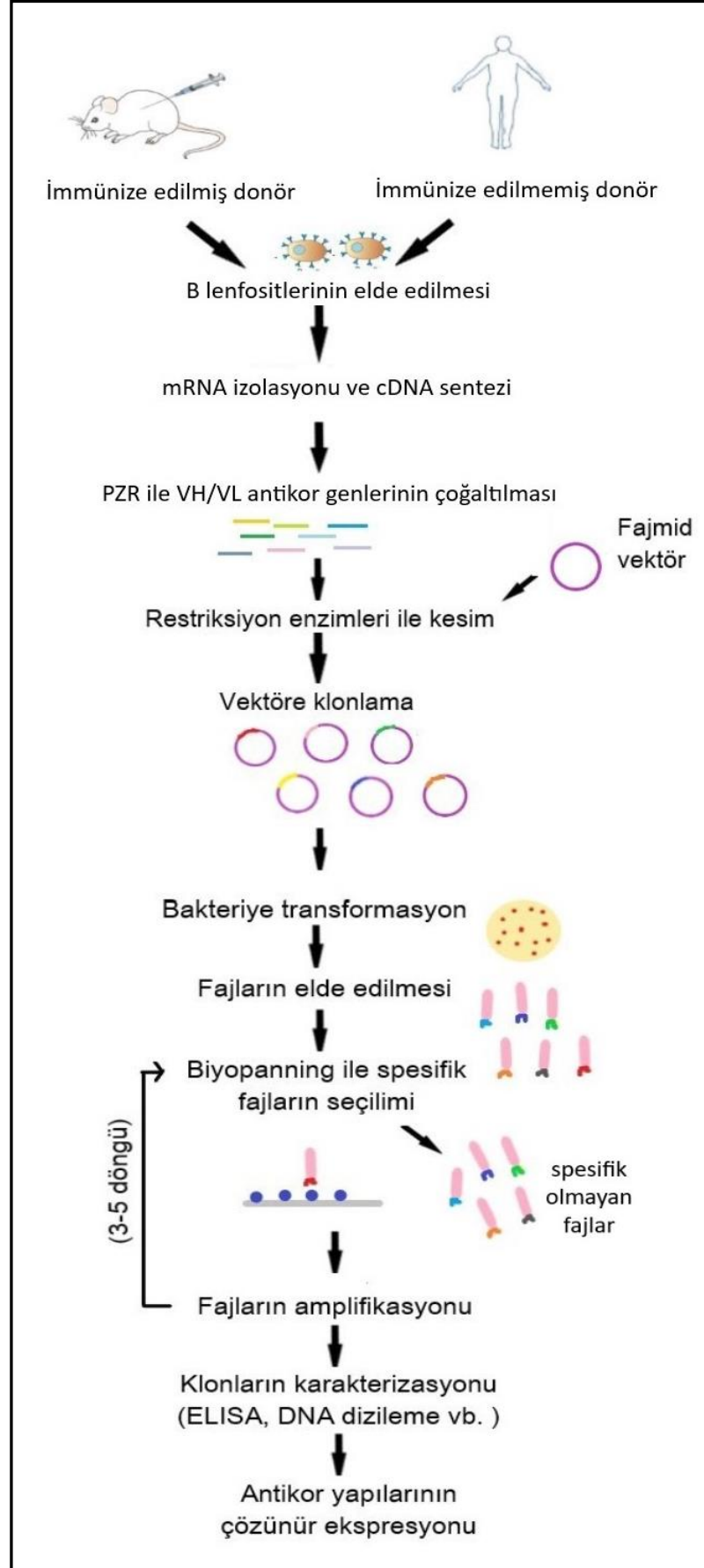
Faj gösterim teknolojisiyle antikor üretiminde öncelikle antikor kütüphanelerinin oluşturulması gerekmektedir. Antikor kütüphaneleri immün, naiv, sentetik veya semi-sentetik olmak üzere dört farklı şekilde olabilmektedir. İmmün kütüphaneler belirli bir hedefe karşı oluşturulurken; naiv, sentetik ve semi-sentetik

kütüphaneler çok amaçlı kütüphanelerdir ve farklı hedef yapılara karşı antikor geliştirilmesinde kullanılabilirler [49,56]. İmmün ve naiv kütüphaneler doğal kaynaklı antikor dizilerinden oluşurlar. Sentetik ve yarı sentetik kütüphaneler ise bilgisayar ortamında dizayn edilmiş dizileri içerirler. Sentetik kütüphaneler antikor çeşitliliği oluşturmak amacıyla tamamen bilgisayar ortamında oluşturulan dizileri içerirken; yarı sentetik kütüphanelerde ise yapay ortamda oluşturulan çeşitlilik ile doğal çeşitliliği içeren diziler birleştirilmektedir [57,58].

İmmün kütüphanelerde antikor genlerinin kaynağı hedef antijen ile immünize edilmiş fare vb. bir donörden elde edilen B lenfositler; naiv kütüphanelerde ise kaynak immünize edilmemiş bir donörden elde edilen B lenfositleridir. İmmün ve naiv kütüphaneler arasındaki farklılıklara bakıldığında, immün kütüphaneler spesifik bir hedefe karşı yüksek afiniteli antikorları içerirken; immünizasyonun zahmetli ve maliyetli olması, donör için risk oluşturabilmesi ve farklı hedeflere karşı antikor üretmek istenmesinde yeni bir kütüphane oluşturulması gerekmesi gibi sorunlara sahiptir. Ayrıca antikor kökeninin hayvansal bir organizma olması dolayısıyla immün reaksiyon riski vardır [49]. Naiv kütüphanelerin en büyük avantajı antikor genlerinin kaynağının insan B hücreleri olması dolayısıyla immünojenisite riskinin çok düşük olmasıdır. Bunun yanında naiv kütüphaneler teorik olarak kaynakta mevcut olan tüm antikorları içerdiği için çeşitliliği yüksektir ve bu kütüphanelerle birçok farklı antikorun geliştirilmesi mümkündür [46,51,56].

İmmün ve naiv kütüphanelerin oluşturulması için, donörden elde edilen B lenfositlerinden mRNA izole edilir. mRNA'nın kaliteli olması antikor repertuarının oluşturulması için önemlidir. Daha sonra RT-PZR yöntemiyle cDNA sentezi gerçekleştirilir. Bu sayede elde edilen cDNA, farklı antijenleri tanıyan, 10^9 - 10^{11} farklı lenfosit klonundan gelen tüm antikor dizilerini içermektedir [49]. Daha sonra, antikor genlerine (VH, VL) spesifik primerler ile cDNA kalıbı üzerinden PZR reaksiyonları gerçekleştirilmesiyle farklı dizilere sahip antikor repertuarı elde edilir. Oluşturulacak antikor formatı scFv gibi bir yapıysa VH ve VL genleri bağlayıcı dizilerle birleştirilir. Vektöre klonlama için gerekli restriksiyon enzim kesimleri gerçekleştirildikten sonra faj veya fajmid vektörlerine klonlanarak antikor kütüphanesi oluşturulur. Bu şekilde oluşturulan antikor kütüphaneleri yaklaşık olarak 10^{11} farklı antikor varyantı içermektedir. Antikor kütüphanesi oluşturulduktan sonra konakçı bakteriye transforme edilir ve faj üretimi sağlandıktan sonra fajlar bakteri kültüründen elde edilir [49,56,59-61]. Elde edilen faj popülasyonu yaklaşık olarak

10^{11} farklı yapıyı içerir. Bu çeşitlilik içerisinde bir hedefe karşı seçim yapılması işlemi biyopanning döngüleri gerçekleştirilir. Biyopanning için hedef antijen bir yüzeye immobilize edildikten sonra faj popülasyonu ile inkübe edilerek hedef yapıyı tanıyan spesifik fajların bağlanması sağlanır. Daha sonra spesifik olmayan fajların uzaklaştırılması için yıkama işlemleri gerçekleştirilir. Kalan spesifik fajlar elde edilerek tekrar çoğaltılır ve yüksek bağlanma afiniteli fajların elde edilmesi için biyopanning döngülerine 3-5 tur kadar devam edilir. Son biyopanning turunda elde edilen klonların antijene bağlanması ELISA ile test edilerek, bağlanma sinyali yüksek olan klonların DNA dizilimleri belirlenir. Bu sayede gerekirse antikor dizileri üzerinde stabiliteyi ve bağlanmayı arttırıcı modifikasyonlar yapılabilir. Karakterizasyonu gerçekleştirilen antikor yapılarının çözümleri mikrobiyal ekspresyon sistemlerinde gerçekleştirilebilir [49,56,57,62]. Faj gösterim teknolojisiyle immünize/naiv bir donörden antikor geliştirilmesine ait aşamalar Şekil 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3: Faj gösterim teknolojisiyle antikor geliştirme süreci.

5. KANSERDE MONOKLONAL ANTİKORLAR

Geleneksel kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları, kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücelere de zarar vermekte ve hasta üzerinde birçok yan etkiye sebep olabilmektedir. Buna karşın monoklonal antikorlar kanser hücrelerinde gözlenen farklılıkları hedef alarak; sağlıklı hücreler yerine sadece kanser hücrelerine etki etmektedirler. Monoklonal antikorlar, çoğunlukla kanser hücrelerinde aşırı anlatımı bulunan protein ve reseptör gibi yapıları hedef alarak inaktive eder ve bu sayede kanser hücrelerinin büyümesini engelleyerek anti-kanser etki göstermiş olurlar. Monoklonal antikorlar, hücre dışındaki molekülleri hedef alabileceği gibi; hücre içindeki moleküllere karşı da oluşturulabilmektedir [63,64].

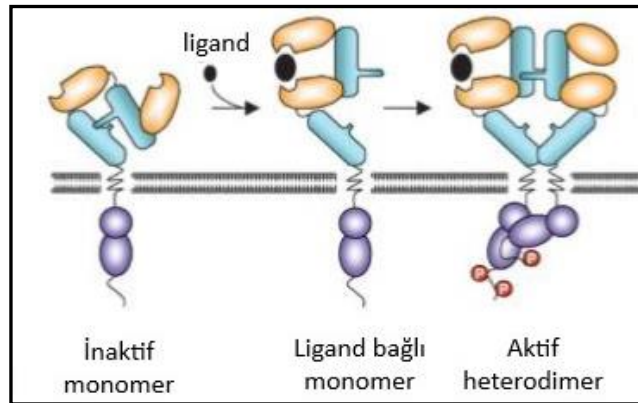
Dünya genelinde en önemli ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan kanserle mücadelede Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü gibi çeşitli hedeflere karşı geliştirilmiş antikorlar tanı ve tedavi amaçlı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [65].

5.1. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR, HER1, ErbB1), ErbB tirozin kinaz reseptörleri ailesine ait bir transmembran glikoproteinidir [66,67]. 170 kDa büyüklüğünde olan bu reseptör, EGF ailesine ait peptid büyüme faktörlerinin bağlanmasıyla aktive olmaktadır [67,68]. En temel spesifik ligandı Epidermal Büyüme Faktörü (EGF: Epidermal Growth Factor) olmakla birlikte, farklı ligandlarla da aktive olabilmektedir [69].

EGFR, ligandın bağlanacağı ekstraselüler ektodomain bölgesi, hidrofobik özellikte bir transmembran bölgesi, tirozin kinaz aktivitesini gerçekleştiren intraselüler kısım ve bu kısmın sonunda tirozin içeren karboksi terminal bölgesine sahiptir [67–69]. Ekstraselüler bölge hücre dışından gelen sinyalin alındığı kısımdır ve dört domainden oluşmaktadır. Ekstraselüler kısımda bulunan domain I ve domain III bölgeleri lösin aminoasiti bakımından zengindir ve ligand bağlanması için önem arz etmektedirler; bunun yanında domain II ve domain IV bölgeleri ise sistein aminoasiti açısından zengin bölgelerdir [67,68]. Ligandın ektodomaine bağlanması reseptörler arasında etkileşime neden olur ve bunun sonucunda homo/hetero

dimerizasyon gerçekleşerek reseptörler aktive olur. Dimerizasyon, hücre içindeki tirozin kinaz domaininde konformasyonel değişikliğe sebep olur ve tirozin kinaz aktivitesiyle C terminal bölgesindeki tirozin birimlerinin fosforilasyonu (reseptör oto-fosforilasyonu) gerçekleşir. Fosforillenmiş tirozin birimleri hücre içi sinyal proteinleri için bağlanma bölgesi oluşturmaktadır ve bu sinyal moleküllerinin aktive edilmesiyle proliferasyon, canlılık, farklılaşma, migrasyon, anjiyogenez, gen ekspresyonu, apoptoz inhibisyonu, adezyon ve metastazda önemli olan RAS/RAF/MEK/MAPK/ERK, PLC γ 1/PKC, PI(3)kinaz/Akt, Src ve JAK/STAT yolları ve başka birçok transkripsiyon faktörleri, EGFR aracılığıyla aktive edilmiş olur [67–70]. EGFR'nin bir diğer aktivasyonu ise, ligand bağlanmaksızın başka tirozin kinazlar tarafından fosforillenmesiyle gerçekleşmektedir. Bu durum transaktivasyon olarak adlandırılmaktadır [67]. EGFR'nin ligand bağımlı aktivasyonuna ait gösterim Şekil 5.1'de verilmektedir [69].



Şekil 5.1: EGFR'nin ligand ile aktivasyonu.

Yapılan çalışmalar EGFR'nin birçok kanser türünde mutasyona uğradığını veya normalden fazla eksprese edildiğini göstermiştir. Bu sebeple, kanser tedavisi ve tanısı açısından büyük öneme sahiptir [70]. Baş-boyun, kolon, meme, pankreas, mesane, over ve servikal kanserler başta olmak üzere birçok kanser türünde EGFR'nin over ekspresyonunun, prognozu engellediği bilinmekte ve baş boyun kanserlerinin %90'ından fazlasında EGFR'nin overeksprese edildiği belirtilmektedir [68].

İlk olarak *in vitro* ortamda büyütülen kanser hücrelerinde EGFR'ye spesifik antikörlerin kullanılması ile kanser hücrelerinin proliferasyonun durdurulabildiğinin gösterilmesi, kanser tedavisi için EGFR'ye spesifik antikörlerin geliştirilmesine

başlangıç oluşturmuştur [71]. EGFR'nin overeksprese edildiği çeşitli hastalıklarda tedavi amacıyla çeşitli yollarla EGFR hedeflenmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla EGFR'yi hedef alan monoklonal antikolar, tirozin kinaz inhibitörleri, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) inhibitörleri ve antisens gen terapileri geliştirilmesi üzerine çalışılmaktadır. Cetuximab ve Panitumumab EGFR hedefli kanser tedavilerinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış ve yaygın bir şekilde kullanılan monoklonal antikolardır [68,71]. Buna benzer şekilde Nimotuzumab çeşitli ülkelerce onaylanan EGFR hedefli monoklonal antikolardan biridir [68].

Kanser hücrelerinin anti-EGFR terapilerine karşı direnç geliştirmesi de mümkündür. Bu durumda EGFR baskılansa bile, diğer ErbB ailesi reseptörleri tümör proliferasyonunu destekleyebilmektedir. Buna ek olarak tedavi edilecek bireyde EGFR'nin mutasyonlu formları da bulunabilir ve bu durum kullanılacak ilacın etki etmemesine neden olabilmektedir [66,72]. Bu konuda terapide kullanılacak ilacın belirlenmesinde güncel genom dizileme yaklaşımları büyük öneme sahip olmakta ve bu sayede tümörün hangi ilaçlara dirençli olacağı belirlenerek tedavi sürecine başlanabilmektedir [68]. Tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla halen fonksiyonları iyileştirilmiş farklı formatlarda anti-EGFR monoklonal antikoları geliştirilmekte ve tirozin kinaz gibi ilaçlarla kombine edilerek çift yönlü hedeflemeler ile tedavi başarısı arttırılmaya çalışılmaktadır [66,72].

EGFR'nin membrana bağımlı formuna ek olarak, farklı mekanizmalarla nükleus ve mitokondri gibi hücre içi organellere taşınması ve farklı görevlerde rol alması da mümkündür. Bu translokasyonun sebebi, ligand bağlanması olabileceği gibi, radyasyon, EGFR hedefli terapiler veya başka uyarılar da olabilmekte ve translokasyonun tümör terapilerindeki cevabı düzenlediği düşünülmektedir. Nükleer EGFR'nin, tirozin kinaz aktivitesine ek olarak transkripsiyonel regülatör olarak işlev gördüğü bilinirken; mitokondriyel EGFR'nin otofaji ve apoptoz süreçlerini düzenlediği tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalar, EGFR'nin kanser hücrelerinin proliferasyonuna etkisinin yanında, radyo terapi etkisiyle nükleer translokasyona uğrayarak DNA hasarında görev aldığını göstermiştir. Bahsedilen yollarla kanser hücrelerinin sürekliliğinin sağlanmasını ve kanser tedavilerine direnç geliştirmeyi sağlayan bu reseptör üzerinde halen çalışmalar yapılmakta, bilinmeyen mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır [73].

6. GEREÇ ve YÖNTEMLER

6.1. Gereçler

6.1.1. Kullanılan Kitler

Quick-RNA Whole Blood Kiti (Zymo Research, R1201), QIAQuick PCR Pürifikasyon Kiti (Qiagen, 28106), QIAQuick Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen, 28706), ZymoPURE Miniprep Plazmid İzolasyon Kiti (ZymoResearch, D4209), Genome Lab Quick Start DTCS Kiti (Beckman Coulter)

6.1.2. Kullanılan Enzim, Antikor ve Antijenler

GoTaq DNA Polimeraz (Promega, M300F), SfiI (NEB, R0123S), NotI-HF (NEB, R3189S), T4 DNA Ligaz (Thermo Scientific, EL0011), MyTaq DNA Polimeraz (Bioline, BIO-21105), Rekombinant İnsan EGF Reseptörü (Peprotech, 100-15R), Rekombinant Hepatit B Yüzey Antijeni (Adw) (Abcam, Ab91276), HRP-anti M13 monoklonal konjugatı (GE Healthcare, 27-9421-01), BstNI (NEB, R0168S)

6.1.3. Kullanılan Kimyasallar

ABTS (Roche), Bakto Agar (BD), Agaroz (Sigma Aldrich), Bakto Tripton (BD), Bovin Serum Albümin Fraksiyon V (Merck), EDTA (Merck), Glukoz D(+) (Sigma Aldrich), Hidrojen peroksit (ORO), Kalsiyum klorür (Sigma Aldrich), Magnezyum sülfat (Sigma Aldrich), Maya özütü (BD), Poli etilen glikol 6000 (Fluka), Potasyum klorür (Sigma Aldrich), Sitrik asit (Sigma Aldrich), Sodyum asetat (Sigma Aldrich), Sodyum bikarbonat (Sigma Aldrich), Sodyum klorür (Sigma Aldrich), Tris Baz (Sigma Aldrich), Tween-20 (Sigma Aldrich)

6.1.4. Kullanılan Çözeltiler

- 10X PBS Çözeltisi

80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na₂HPO₄, 2.4 g KH₂PO₄ 800 mL distile su içerisinde çözülür. pH 7.4'e ayarlandıktan sonra hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır. 121°C'de 30 dk otoklavlanarak steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

- 1X TPBS Çözeltisi

1X PBS çözeltisi içerisine %0.1 olacak şekilde Tween-20 eklenerek hazırlanır.

- Bloklama Tamponu

1X PBS çözeltisine %1 olacak şekilde Bovin Serum Albümini (BSA) eklenerek hazırlanır.

- %20 Glukoz Çözeltisi

20 g glukoz distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. 0.22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 4°C'de saklanır.

- 100 mg/mL Ampisilin Stoğu

1 g ampisilin 10 mL otoklavlanmış distile su içerisinde çözülür, 0.22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 1 mL'lik alikotlara bölünerek -20°C'de saklanır.

- 50 mg/mL Kanamisin Stoğu

0.5 g kanamisin 10 mL otoklavlanmış distile su içerisinde çözülür, 0.22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 1 mL'lik alikotlara bölünerek -20°C'de saklanır.

- 50 mM CaCl₂ Çözeltisi

0.55 g CaCl₂ distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. 0.22 µm'lik filtreden geçirildikten sonra 4°C'de saklanır.

- 50 mM Sitrik Asit Çözeltisi

0.96 g sitrik asit 80 mL distile su içerisinde çözüldükten sonra pH değeri 4'e ayarlanır. Hacim 100 mL'ye tamamlanır. Çözelti filtre kağıdından geçirildikten sonra 4°C'de saklanır.

- ABTS Substratı

1 mg ABTS tartılır, 4,5 mL 50 mM sitrik asit tamponunda çözülüp, 100 µL %3'lük H₂O₂ eklenerek hazırlanır. Işıktan muhafaza edilerek taze olarak hazırlanmalıdır.

6.1.5. Kullanılan Primer Dizileri Ve Vektör

6.1.5.1. Primer Dizileri

Tablo 6.1: İnsan VH antikor genlerine spesifik ileri primerlerin listesi.

Primer adı	Primer Dizisi 5'-3'
301	5'- CAGATCACCTTGAAGGAGTCT-3'
309	5'- CAGGTCACCTTGAAGGAGTCT-3'
310	5'- CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT-3'
311	5'- GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT-3'
312	5'- GAGGTGCAGCTGGTGGAGACC-3'
313	5'- CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCC-3'
318	5'- CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCG-3'
319	5'- CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCG-3'
320	5'- GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCT-3'
322	5'- GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT-3'
323	5'- CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA-3'
324	5'- CAGATCACCTTGAAGGAGTCT-3'

Tablo 6.2: İnsan VH antikor genlerine spesifik geri primerlerin listesi.

Primer adı	Primer Dizisi 5'-3'
900	5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3'
901	5'-TGAAGAGACGGTGACCATTGT-3'
902	5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3'
903	5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3'

Tablo 6.3: Restriksiyon enzimi bölgesi eklenmiş VH ileri primerlerin listesi.

Primer adı	Primer Dizisi 5'-3'
5301	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGATGCAGCTGGTGCAATCTGG-3'
5309	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGG-3'
5310	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGG-3'
5311	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'
5312	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3'
5313	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGGAGACCGG-3'
5318	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCCGG-3'
5319	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG-3'
5320	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGG-3'
5322	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG-3'
5323	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG-3'
5324	5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG-3'

Tablo 6.4: Restriksiyon enzimi bölgesi eklenmiş VH geri primerlerin listesi.

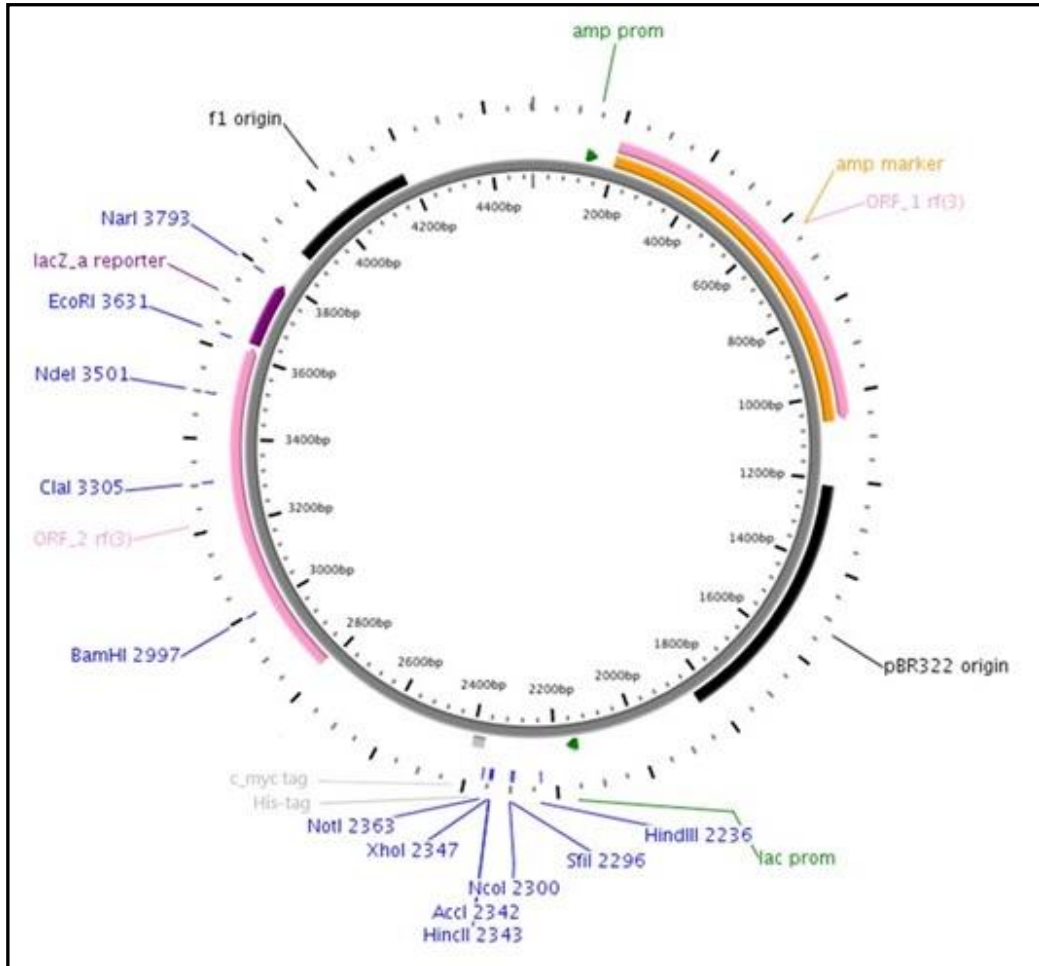
Primer adı	Primer Dizisi 5'-3'
6900	5'GAGTCATTCTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCAGG GTGCC-3'
6901	5'GAGTCATTCTGCGGCCGCTGAAGAGACGGTGACCATT GTCCC-3'
6902	5'GAGTCATTCTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCAGG GTTCC-3'
6903	5'GAGTCATTCTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCAGG GTCCC-3'

Tablo 6.5: Vektöre spesifik ileri (459) ve geri (458) primerlerin listesi.

Primer adı	Primer Dizisi 5'-3'
459	5' TATGACCATGATTACGCCAAGC 3'
458	5' TTTTGTCGTCTTTCCAGACGTT 3'

6.1.5.2. Kullanılan Vektör

Bu çalışmada pDUCK1 fajmid vektörü kullanılmıştır. Bu vektör filamentöz faj pIII geni, ampisilin direnç geni, pelB lider dizisi ve 5X-histidin işaret dizisi içermektedir.



Şekil 6.1: pDuck vektör haritası.

6.1.6. Kullanılan Bakteri-Bakteriyofaj Suşları

- *E. coli* TG1 Suşu

[F' traD36 proABlacIqZ ΔM15] supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rK - mK -)

- M13K07 Yardımcı Fajı

Virüsün tüm yapısal proteinlerini içeren M13 türevli bir bakteriyofajdır. Tek başına paketlenme özelliğine sahip değildir. Kanamisin direnç geni içerir.

6.1.7. Kullanılan Bakteri-Bakteriyofaj Kültür Malzemeleri

- LB Besiyeri Ortamı

10 g bakteriyel tripton (Bacto-Tryptone), 5 g maya özütü (yeast extract), 10 g NaCl distile su ile 1 litreye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 30 dk sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklanır.

- 2xTY Besiyeri Ortamı

16 g bakteriyel tripton (Bacto-Tryptone), 10 g maya özütü (yeast extract), 5 g NaCl distile su ile 1 litreye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 30 dk sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklanır.

- LB Agar Besiyeri

3.75 g Bakto Agar üzerine 250 mL LB besiyeri eklenir. Otoklavda 121°C'de 30 dk sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklanır.

- 2xM9 Besiyeri Ortamı

12 g Na₂HPO₄.2H₂O, 6 g KH₂PO₄, 1 g NaCl, 2 g NH₄Cl distile su ile 1 litreye tamamlanır. Otoklavda 121°C'de 30 dk sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklanır.

- Katı Minimal Besiyeri Ortamı

500 mL 2x M9 ortamı, 500 mL %3 agar, 2 mL 1M MgSO₄, 0.1 mL 1M KCl ayrı halde hazırlanır ve otoklavlanarak sterilize edilir. Soğutulduktan sonra (40°C) biraraya getirilir, içerisine 20 mL %20 glukoz ve 1 mL 10 mg/mL thiamine çözeltileri eklenir. Karıştırıldıktan sonra steril petri kaplarına dökülür.

6.1.8. DNA Belirteçleri, Yükleme Tamponları ve Görüntüleme Substratları

Mass Ruler Low Range DNA Ladder (SM0383, Thermo Scientific), Mass Ruler High Range DNA Ladder (SM0393, Thermo Scientific), 6X DNA Loading Dye (R0611, Thermo Scientific), Red Safe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu 20X (21141, Intron Biotechnology)

6.1.9. Kullanılan Cihazlar

Agaroz Jel Elektroforez Düzenegi (BIO-RAD), Avanti J-26 XPI Soğutmalı Ultra Santrifüj (Beckman Coulter), BSL2 Biyogüvenlik kabini (ESCO), BSL2 Biyogüvenlik Kabini (Faster), Buzdolabı (Bosch), Buz Makinesi (Scotsman), CEQ8800 Otomatik Dizi Analiz Sistemi (Beckman Coulter), Çalkalayıcı İnkübatör (4230, Innova), Derin Dondurucu -20°C (Bosch), Derin dondurucu -80°C (Thermo Scientific), Jel Görüntüleme Sistemi (C600, Azure Biosystem), Isıtmalı blok (Techne), Manyetik Karıştırıcı (Stuart), Mikro Plaka Okuyucu (SynergyHT, BioTek), NanoDrop1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific), pH metre (Hanna Instruments), Soğutmalı Su Banyosu (RE 104, Lauda), Soğutmalı mikrosantrifüj (5415R Eppendorf), Termal Döngü Cihazı (T3000, Biometra), UV/Vis Spektrofotometre (DU-730, Beckman Coulter), Vakum Pompası (Vacuubrand), Vakumlu santrifüj (Christ), Vorteks (Scientific Industries)

6.2. Yöntemler

6.2.1. Kandan Total RNA İzolasyonu

İnsan periferel kan örneği EDTA'lı tüpe alındıktan hemen sonra total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Zymo Research Quick-RNA Whole Blood Kiti kullanılmıştır. İzolasyon kit protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu belirlendikten sonra RNA'lar -80°C'ye kaldırılmıştır.

6.2.2. cDNA Sentezi

Kandan elde edilen total RNA'dan geri transkripsiyon ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla SuperScriptIII First Strand Sentez Sistemi (Thermo Scientific) kullanılmıştır. cDNA sentezi aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6.6: RNA-primer-dNTP miksi.

Bileşen	μL
DEPC-treated water	0
RNA	8
50 ng/ μL random hexamers	1
10 mM dNTPs mix	1

İlk önce Tablo 6.6'da belirtildiği şekilde RNA-primer-dNTP miksi hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 65°C'de 5 dk inkübe edilip süre bitiminde 1 dk buzda bekletildikten sonra, Tablo 6.7'deki gibi hazırlanan cDNA sentez miksi ile birleştirilip, 25°C'de 10 dk ve 50°C'de 50 dk inkübasyon yapılmıştır.

Tablo 6.7: cDNA sentez miksi.

Bileşen	μL
10X RT buffer	2
25 mM MgCl ₂	4
0,1 mM dTT	2
RNase out	1
Superscript RT enzyme	1

Enzim inaktivasyonu için 85°C'de 5 dk inkübasyon yapıldıktan sonra 1 μL RNase H eklenip 37°C'de 20 dk RNA degradasyonu sağlandıktan sonra DNA konsantrasyonu belirlenip cDNA'lar -20°C'ye kaldırılmıştır.

6.2.3. İnsan Ağır Zincir (VH) Antikor Genlerinin Oluşturulması

İnsan ağır zincir değişken bölge antikor kütüphanesinin oluşturulması amacıyla sağlıklı bir bireyden izole edilen cDNA kalıp olarak kullanılmıştır. Nano-antikor yapılarının oluşturulması amacıyla TÜBİTAK MAM DAKİNAT-2 projesi kapsamında tasarlanmış olan insan VH değişken ağır zincir antikor genlerine spesifik primerler kullanılmıştır. Bu amaçla 12 farklı ileri primer ve 4 farklı geri primer kullanılarak tüm ileri primerlerin tüm geri primerler ile kombinasyonları sonucu yüksek çeşitliliğe sahip olan antikor kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu amaçla kullanılan ileri ve geri primer listeleri Tablo 6.1 ve Tablo 6.2'de gösterilmektedir.

PZR'de reaksiyon başına 100 ng cDNA kullanılmış, PZR reaksiyonları GoTaq polimeraz enzimi (Promega) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk önce 4 farklı geri primer için gereken hacimde ayrı ayrı reaksiyon miksleri hazırlanmıştır. Miks içeriği Tablo 6.8'de belirtilmektedir. Daha sonra hazırlanan mikslere tüplere paylaştırılıp, her sette tüm ileri primerler olacak şekilde 0.5 μL ileri primer (10 pmol/ μL) eklenip kısa bir spin sonrasında tüpler hemen termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. Her bir primer setinin Tm erime sıcaklıkları farklı olması dolayısıyla her set için belirlenen birleşme sıcaklığı seçilmiştir. Set 900 için 55°C, Set 901 için 57°C, Set 902 için 57°C ve Set 903 için 58°C birleşme sıcaklıkları uygulanmıştır. PZR koşulları Tablo 6.9'da belirtilmiştir.

PZR sonrasında örnekler antikor genlerinin varlığını tespit etmek amacıyla %1.2' lik agaroz jelde kontrol edilmiştir. Agaroz jel için 1.2 gram agaroz tartılıp 100 mL 0.5X TAE çözeltisi eklendikten sonra mikrodalga fırında çözülüp soğutulmuş, DNA bantlarının görünür hale gelmesi için 4 µL RedSafe (Intron Biotech.) eklenerek hazırlanmıştır. Jel polimerize olduktan sonra her bir PZR örneğinden 5 uL alınıp, final konsantrasyonu 1X olacak şekilde 6X DNA Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Marker olarak Thermo Scientific Mass Ruler Low Range DNA Ladder kullanılmıştır. Örnekler 80V'ta 1 saat boyunca yürütüldükten sonra Azure c600 cihazında görüntüleme yapılmıştır.

Tablo 6.8: PZR reaksiyon miksi (1 tüp için).

Bileşen	µL
ddH ₂ O	17.375
5X buffer	5
Kalıp cDNA (100 ng)	1
Geri Primer (10 pmol/µL)	0.5
dNTP karışımı (10 mM)	0.5
GoTaq polimeraz (5U/µL)	0.125

Tablo 6.9: PZR döngüsü.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Başlangıç denatürasyonu	94	2
Denatürasyon	94	1
Birleşme	*kullanılan primer setlerine göre	2
Uzama	72	2
Son uzama	72	10
	4	∞

Oluşturulan antikor gen fragmanları, spesifik olmayan PZR ürünlerinin uzaklaştırılması amacıyla jelden izole edilmiştir. Bu amaçla Qiagen Quick Gel

Extraction kit kullanılmış, kit protokolünde belirtildiği şekilde izolasyon yapılmıştır. İzolasyon sonrasında PZR ürünlerinin konsantrasyonları belirlenen örnekler -20°C'de saklanmıştır.

6.2.4. Antikor genlerine RE kesim bölgelerinin eklenmesi

Antikor genlerinin fajmid vektöre klonlanabilmesi için vektörün çoklu klonlama bölgesinde varolan spesifik restriksiyon enzim bölgelerinin, oluşturulan antikor genlerinin 5' ve 3' uçlarına eklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla her bir antikor geni kalıp olarak kullanılarak, ilk PZR döngülerinde kullanılan her bir ileri primerin SfiI restriksiyon enzim dizisi; her bir geri primerin ise NotI restriksiyon enzim dizisi eklenmiş olan versiyonlarıyla tekrar PZR döngüleri gerçekleştirilmiştir. Bu ileri ve geri primerlerin listesi Tablo 6.3 ve Tablo 6.4'te gösterilmektedir. Reaksiyon hacimleri Tablo 6.10'da belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. PZR döngüleri, birleşme sıcaklıkları 64°C olacak şekilde Tablo 6.9'da belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %1.2'lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 6.10: RE bölgesi eklemek için PZR miksi (1 tüp başına).

Bileşen	μL
ddH ₂ O	21.75
5X buffer	10
Kalıp cDNA (100 ng)	1
Geri Primer (10 pmol/ μL)	1
dNTP karışımı (10 mM)	1
GoTaq polimeraz (5U/ μL)	0.25

6.2.5. PZR Örneklerinin Birleştirilmesi ve Pürifikasyonu

Antikor genlerinin amplifikasyonu teyit edildikten sonra 4 farklı geri primer setine ait PZR ürünleri ayrı setler halinde birleştirilip etanol çöktürmeye alınmıştır. Bu amaçla bir tüpte toplanan PZR örnekleri üzerine 2 hacim %100 etanol eklenerek 3 saat -80°C'de bekletilmiştir. Süre sonunda 13000 rpm'de 50 dk 4°C'de santrifüj

yapılıp, süpernatant nazikçe uzaklaştırılır. Tüplere 1 mL %70 etanol eklenir ve hemen 13000 rpm 4°C koşullarında 20 dk santrifüj yapılır. Süpernatantın tamamı nazikçe uzaklaştırılır, pellet vakumlu santrifüjde 15 dk kurutmaya alınır. Alkol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pellet 50 µL steril su ile çözülür. 15 dk çözülmesi için beklenir. Örnekler %1.2'lik agaroz jelde yürütülür ve Qiagen QIAQuick Gel Extraction Kit ile kit protokolüne uygun olarak jelden izole edilir. Elde edilen antikor genleri Nanodrop cihazında nanogram ve saflıkları ölçüldükten sonra -20°C'de muhafaza edilmiştir.

6.2.6. Restriksiyon enzim kesimi

Oluşturulan antikor genleri ve pDuck fajmid vektörü *SfiI* ve *NotI* restriksiyon enzimleri ile kesime alınmıştır. Kesim reaksiyonlarında antikor geni örneklerinin tamamı kullanılmıştır. İlk önce 30 µL hacimde *SfiI* kesimi yapılmış, sonra kesim örneklerinin tamamı kullanılarak, 50 µL hacimde *NotI* kesimi yapılmıştır. İki enzim kesimi de 2 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda örneklerin 2 µL'si %1.2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. *SfiI* ve *NotI* kesim reaksiyonları Tablo 6.11 ve Tablo 6.12'de belirtilmiştir. Antikor genleri ve pDuck kesim örneklerinin tamamı jele yüklenerek istenen bantların izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 6.11: *SfiI* kesim reaksiyonu.

Bileşen	µL
ddH ₂ O	Hacim 30 µL'ye tamamlanacak şekilde
10X CutSmart Buffer	3
DNA	x
<i>SfiI</i> (20 U/µL)	1µL/1µg DNA için

Tablo 6.12: *NotI* kesim reaksiyonu.

Bileşen	µL
ddH ₂ O	Hacim 50 µL'ye tamamlanacak şekilde
10X CutSmart Buffer	2
<i>SfiI</i> kesim reaksiyonu	30
<i>NotI</i> (20 U/µL)	1µL/1µg DNA için

6.2.7. Ligasyon

Bant izolasyonu sonrasında örnekler hemen ligasyona tabi tutulmuştur. Ligasyon koşulları web sitesi aracılığıyla belirlenmiştir [74]. Vektör:DNA molar oranı 1:6 olarak belirlenmiş, reaksiyon 30 µL hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonda 1U ligaz enzimi kullanılmıştır. Ligaz enzimi olarak Thermo T4 DNA ligaz kullanılmıştır. Ligasyon koşulları Tablo 6.13'de belirtilmektedir. Ligasyon sonrası ürünün tamamı transformasyonda kullanılmıştır.

Tablo 6.13: Ligasyon koşulları.

°C	Süre (dk)
22	60
65	10
4	∞

6.2.8. Bakteri Kültürü ve Büyütülme Koşulları

Rekombinant faj üretimi için E. coli TG1 bakterileri kullanılmıştır. Bu amaçla -80°C'de muhafaza edile TG1 bakteri stoğundan 5 µL alınarak 5 mL LB besiyeri içerisinde gece boyu 37°C 220 rpm koşullarında büyütülmüştür. Kullanılan bakteri suşu yabancı tip olduğu için herhangi bir antibiyotik ilavesi yapılmamıştır.

6.2.9. Bakteri stoklarının hazırlanması

Büyütülen bakteri kültüründen -80°C stoklarının oluşturulması amacıyla 300 µL steril %60 gliserol ile 300 µL bakteri bir araya getirilmiş, tüpler birkaç kez karıştırıldıktan sonra kapakları parafilmlelenerek hızlıca -80°C'ye kaldırılmıştır.

6.2.10. Kompetan hücre hazırlanması

Transformasyonda kullanılacak kompetan hücrelerin hazırlanması amacıyla gece boyu büyütülen kültürden 400 µL alınıp 40 mL LB besiyerine ekim yapılmış,

bakteriler 37°C 220 rpm koşullarında OD600 değeri 0.5-0.8 olana kadar büyütülmüştür. Büyütülen kültür 3000 rpm 4°C koşullarında 10 dk boyunca santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet 20 mL 50 mM CaCl₂ ile çözülüp 30 dk boyunca buz içerisinde inkübe edilmiştir. Süre sonunda aynı koşullarda tekrar santrifüj yapılmıştır. Pellet 4 mL 50 mM CaCl₂ ile çözüldükten sonra final konsantrasyonu %15 olacak şekilde steril %100 gliserol ile karıştırılıp, tüp başına 300 µL olacak şekilde ependorflara dağıtılıp kapakları parafillenerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

6.2.11. Transformasyon

Ligasyon ürününün tamamı final hacim 50 µL olacak şekilde 50 mM Tris-HCl pH:7.2 solüsyonu ile birleştirilip cam tüplere alındıktan sonra üzerine 300 µL kompetan TG1 bakterileri eklenip 1 saat buzda inkübasyon yapılmıştır. 42°C'de 3 dk inkübasyon gerçekleştirilip 10 dk beklenip tüp oda sıcaklığına geldikten sonra 1 mL LB besiyeri eklenerek 37°C'de 220 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Transformasyonun kontrolü amacıyla 100 µL örnek alınarak 100 µg/mL ampisilin içeren LB agar plate'e ekim yapıldıktan sonra kalan sıvı kültür 100 µg/mL ampisilin içeren LB içerisinde gece boyu büyütülmüştür. Transforme sıvı kültürlerin -80°C gliserol stokları yapıldıktan sonra her bir setten 100 µL alınıp biraraya getirilerek bu bakteriler 5 mL LB besiyeri içerisinde 100 µg/mL ampisilin varlığında gece boyu 37°C'de 220 rpm'de çalkalanarak büyütülmüştür. Buradan elde edilen naiv insan VH antikör kütüphanesinin -80°C gliserol stokları da yapıldıktan sonra bu bakteri kültürü çöktürülerek faj eldesi gerçekleştirilmiştir.

6.2.12. Koloni PZR

Transformasyon sonrası oluşan kolonilerin antikör genini içerip içermediğini kontrol etmek amacıyla platelerden rastlantısal olarak seçilen koloniler steril kürdan yardımıyla alınıp 15 µL steril su içeren tüplere inoküle edilmiştir. Ek olarak sıvı kültürün kontrolü amacıyla, 15 µL sıvı kültür örneği 3000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra 15 µL steril su ile çözülmüştür. Tüpler 95°C'ye ısıtılmış termal blokta 3 dk bekletildikten sonra tüpler 13000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiş ve süpernatantlar PZR'de kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Koloni

PZR'de, vektörün çoklu klonlama bölgesinin uç kısımlarına spesifik olan 459 ve 458 primerleri kullanılmıştır. Primer dizileri Tablo 6.5'te gösterilmiştir. Koloni PZR'de MyTaq polimeraz enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon hacimleri ve PZR döngü koşulları aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 6.14: Koloni PZR reaksiyon miksi.

Bileşen	μL
ddH ₂ O	33
5X Reaction buffer	10
İleri primer (459')	2
Geri primer (458')	2
Kalıp DNA	2
Enzim (1 U/ μL)	1

Tablo 6.15: Koloni PZR döngüleri.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	
Denatürasyon	94	1	30 döngü
Birleşme	55	2	
Uzama	72	2	
Son uzama	72	10	
	4	∞	

6.2.13. Enfektif Faj Eldesi

Transformasyon sonrası bakteri kültüründen 200 μL alınır ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampisilin içeren 40 mL 2xTY besiyerine ekim yapılır. Bakteriler 37°C'de 220 rpm'de çalkalanarak OD600 değeri 0.5-0.8 oluncaya kadar büyütülür. OD600 beklenen değere ulaştığında bu kültürden 10 mL alınır ve %2 glukoz ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampisilin içeren 40 mL 2xTY içerisine eklenir. Enfektif faj oluşumunu sağlamak amacıyla kültüre 10⁹ pfu yardımcı faj M13K07 eklenir. Kültür önce çalkalanmadan 37°C'de 45 dk, daha sonra çalkalanarak 45 dk inkübe edilir. Süre sonunda bakteriler santrifüj

tüplerine toplanır, 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılır. Süpernatant atıldıktan sonra pellet 100 µg/mL ampisilin ve 50 µg/mL kanamisin içeren 30 mL 2xTY besiyeri ile çözülüp gece boyu 37°C'de çalkalanarak büyütülmeye devam edilir. Oluşan fajların çöktürülmesi için kültür 8000 rpm 4°C'de 10 dk santrifüjlenir. Süpernatant temiz bir santrifüj tüpüne toplanır, üzerine ¼ hacimde PEG-6000/2.5 M NaCl eklenir. İyice karıştırıldıktan sonra 2 saat buz içerisinde inkübasyona bırakılır. Bu süre içinde belirli aralıklarla tüp karıştırılır. İnkübasyon bitiminde 8000 rpm 4°C'de 40 dk santrifüj yapılır. Süpernatant atılır, pellet 20 mL steril su ile çözülür. 12000 rpm'de 10 dk tekrar santrifüj yapılır. Süpernatant yeni bir santrifüj tüpüne aktarılır ve ¼ hacimde PEG-6000/2.5 M NaCl eklendikten sonra 45 dk buz içerisinde inkübe edilir. Süre sonunda 12000 rpm'de 30 dk soğuk santrifüj yapılır. Süpernatant atılıp, pellet steril 1X PBS ile çözülür, ependorfa alınarak masaüstü santrifüjde 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek kalıntılar uzaklaştırıldıktan sonra sıvı faz temiz bir tüpe alınarak 4°C'de muhafaza edilir.

6.2.14. Faj Titrasyonu

Faj veriminin belirlenmesi amacıyla, elde edilen faj stoğundan 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} ve 10^{-10} olacak şekilde dilüsyonlar hazırlanır ve hazırlanan her bir dilüsyondan 10 µL alınarak, minimal plate'te büyütülmüş OD600 değeri 0.5 olan 100 µL TG1 bakterisi ile karıştırılır. Tüpler 30 dakika 37°C'de inkübe edilir ve süre sonunda her bir dilüsyon 100 µg/mL ampisilin içeren LB agar plate'e yayma yöntemi ile ekilir. Platelere 37°C'de gece boyu büyütülmeye bırakılır. Ertesi gün oluşan koloniler sayılarak faj titrasyonu aşağıdaki formüle göre belirlenir. Yardımcı faj ile amplifikasyon sonrası 10^{10} - 10^{12} pfu/mL faj oluşumu beklenmektedir.

$$Faj\ miktarı\ (pfu/mL) = Koloni\ sayısı \times 10^2 \times seyreltme\ oranı$$

(6.1)

6.2.15. Biyopanning

Konsantrasyonu belirlenen faj stoğundan EGFR'ye spesifik olan nano-antikor yapılarının seçilimi amacıyla biyopanning döngüleri gerçekleştirilir. Bu amaçla Nunc Maxisorp immünoplateler 1 µg EGFR içeren 0.1 M NaHCO₃ ile hacim 100 µL

olacak şekilde kaplanır, tüp gece boyu 4°C’de inkübe edilir. Ertesi gün kaplama tamponu dökülerek, 3 kere 200 µL PBS ile yıkama yapılır. Sonrasında, tüplere %1 BSA içeren 1X PBS bloklama tamponundan 200 µL eklenerek 2 saat 37°C’de bloklama işlemi uygulanır. Süre sonunda tüpler 3 kere 200 µL ile yıkanır ve bloklama tamponu ile seyreltilen fajlar 1×10^{10} pfu olacak şekilde tüpe eklenir. 30 dk boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak, 90 dk çalkalamadan inkübasyon gerçekleştirilir. Tüpler 60 kere 200 µL %0,1 Tween-20 içeren TPBS ile, 60 kere 200 µL PBS ile yıkanır ve en son 200 µL PBS ile doldurulup bakteri enfeksiyonuna kadar bekletilir. PBS uzaklaştırıldıktan sonra minimal plate’teki tek bir koloniden alınan ve büyütülen OD600 değeri 0.5-0.8 olan TG1 bakterilerinden 100 µL alınır, PBS döküldükten sonra kuyuya eklenir ve 37°C’de 30 dk inkübasyon gerçekleştirilir. Süre sonunda, biyopanningden elde edilen faj çıktısının belirlenmesi amacıyla kuyudan 1 µL ve 10 µL örnekler alınır, 100 µL besiyeri ile karıştırılarak ampisilin içeren LB agar platelere yayım yapılır, platerler 37°C’de gece boyu büyütülür. Kuyuda kalan enfekte olmuş bakteriler ise 100 µg/mL ampisilin içeren 50 mL 2xTY besiyerine alınarak gece boyu 37°C’de 220 rpm’de çalkalanarak büyütülür. Ertesi gün bu sıvı kültürden biyopanning sonrası bakteri stokları oluşturulur, kalan kısımdan yardımcı faj ile amplifikasyon yöntemi ile önceden belirtildiği şekilde tekrar faj eldesi yapılır. Elde edilen faj çıktılarına göre panning döngülerine aynı şekilde 3-5 kere devam edilir.

6.2.16. Faj-ELISA

Panning döngüleri sonrası platerlerdeki kolonilerin, EGFR’ye bağlanma afinitelerini belirleyebilmek amacıyla faj-ELISA gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, incelenecek koloniler ampisilin içeren 5 mL LB besiyerinde gece boyu büyütüldükten sonra başlangıç hacminin 1/100’i oranında alınıp 100 µg/mL ampisilin ve %2 glukoz içeren 5 mL 2xTY besiyerine inoküle edilmiştir. 30°C’de 220 rpm’de büyütülen bakteriler, OD600 değeri 0.5’e ulaştınca 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pelletler tekrar ampisilin ve glukoz içeren taze 2xTY besiyerinde çözüldükten sonra 2×10^9 pfu M13K07 yardımcı fajı eklenerek 37°C’de 220 rpm’de 1 saat büyütülmeye devam edilmiştir. Süre sonunda aynı koşullarda santrifüj yapıldıktan sonra pellet 100 µg/mL ampisilin ve 50 µg/mL kanamisin içeren 2xTY

besiyerinde çözüldükten sonra 30°C'de 250 rpm'de çalkalanarak gece boyu büyütülmüştür. Ertesi gün kültür 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant faj-ELISA'da kullanılmıştır.

ELISA'da kullanılacak Nunc Maxisorp plate kuyuları 100 µL hacimde 100 ng/kuyu EGFR (Peprotech) içeren 0.1 M NaHCO₃ kaplama tamponu ile kaplanarak, gece boyu 4°C'de bekletilmiştir. Rekombinant fajların, bloklamada kullanılacak olan BSA proteinine bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek amacıyla eşit miktarda kuyu %1 BSA içeren kaplama tamponuyla kaplanmıştır. Ertesi gün kaplama tamponu döküldükten sonra kuyular 1 kere 200 µL PBS ile yıkanıp, 200 µL %1 BSA içeren bloklama tamponu eklenerek oda sıcaklığında 2 saat bloklama yapılmıştır. Süre sonunda kuyular 3 kere %0,1 Tween-20 içeren PBS ile, 3 kere de PBS ile yıkama yapıldıktan sonra faj süspansiyonları; 80 µL faj ve 20 µL bloklama tamponu olacak şekilde kuyulara eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. Kuyular 5 kere TPBS ile 5 kere PBS ile yıkandıktan sonra her bir kuyuya bloklama tamponu içerisinde 1:5000 oranda seyreltilmiş anti-M13 HRP konjugatından (GE Healthcare, 27-9421-01) 100 µL eklenerek, 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında 3 kere TPBS, 3 kere PBS yıkaması yapılarak, renk reaksiyonunun oluşması için her kuyuya 100 µL ABTS eklenmiş ve plate 1 saat ışıktan korunarak bekletildikten sonra ELISA plate okuyucusunda (Biotek) 405 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. ELISA'da negatif kontrol olarak fajların büyütüldüğü besiyeri kullanılmıştır. Tüm örnekler 3 tekrarlı olarak kontrol edilmiştir. Absorbans değerleri Excel programında analiz edilmiş ve örneklerin absorbansları negatif kontrolden çıkarılarak normalize edilmiştir.

6.2.17. Plazmid İzolasyonu

ELISA sonucu en yüksek absorbans değerine sahip olan klonlar büyütülmeye alınıp, plazmid izolasyonları yapılmıştır. Plazmid izolasyonu ZymoPURE MiniPrep Kit (Zymo Research) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar %0.8'lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra, konsantrasyon ve saflıkları belirlenerek -20°C'de saklanmıştır.

6.2.18. DNA Dizileme

EGFR'ye spesifik nano-antikor faj yapılarının DNA dizilerinin belirlenmesinde Beckman Coulter CEQ8800 cihazı ve DTCS Quick Start Kiti kullanılmıştır. Dizileme için 150 ng plazmid DNA kalıp olarak kullanılmıştır. Sekans PZR'ye ait reaksiyon hacimleri ve döngü koşulları Tablo 6.16 ve Tablo 6.17'de gösterilmiştir.

Tablo 6.16: Sekans PZR reaksiyonu.

Bileşen	μL
ddH ₂ O	5
DNA	2 (150 ng)
Primer (İleri ya da geri primer)	2 (3.2 pmol)
DTCS	4

Tablo 6.17: Sekans PZR döngüleri.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	
Denatürasyon	96	20	30 döngü
Birleşme	50	20	
Uzama	60	240	
	4	∞	

PZR sonrasında sekans reaksiyonunun sonlandırılması amacıyla her bir tüpe 2 μL 3M sodyum asetat çözeltisi, 2 μL 100 mM EDTA ve 1 μL 20 mg/mL glikojen eklenmiştir. Bunun ardından sekans örneklerinin çöktürülmesi amacıyla etanol çöktürme yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla tüplere 60 μL soğuk %100 etanol eklenip 15 dk boyunca 4°C'de 14000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı nazikçe uzaklaştırıldıktan sonra pellet 2 kere 60 μL %70'lik etanol ile yıkanıp her yıkamadan sonra aynı koşullarda santrifüj gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında etanol dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra 15 dk boyunca vakumlu santrifüjde kurutma yapılmıştır. Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pelletler SLS (Beckman Coulter) ile 30 μL 'de çözülüp tamamen çözülmeleri için 10 dk beklendikten sonra sekans plate'ine aktarılmıştır. Hava kabarcığı kalmadığına dikkat edilerek her bir

kuyuya 1 damla mineral yağ eklenerek ışıktan muhafaza edilmiştir. Buffer plate'inin kuyuları $\frac{2}{3}$ hacimde Separation Buffer (Beckman Coulter) ile doldurulduktan sonra plateler cihaza yerleştirilerek LFR-a programında dizileme gerçekleştirilmiştir. Dizi sonuçları Ape, Blast ve VBase2 biyoinformatik araçlarıyla değerlendirilmiştir.

6.2.19. DNA Parmak İzi Analizi

Sekanslanan klonların DNA parmak izi paternlerini ortaya koymak amacıyla belirli klonlara ait PZR örnekleri BstNI (NEB) restriksiyon enzimi ile kesime alınmıştır. Kesim reaksiyonu içeriği Tablo 6.18'de gösterilmektedir.

Tablo 6.18: BstNI kesim reaksiyonu.

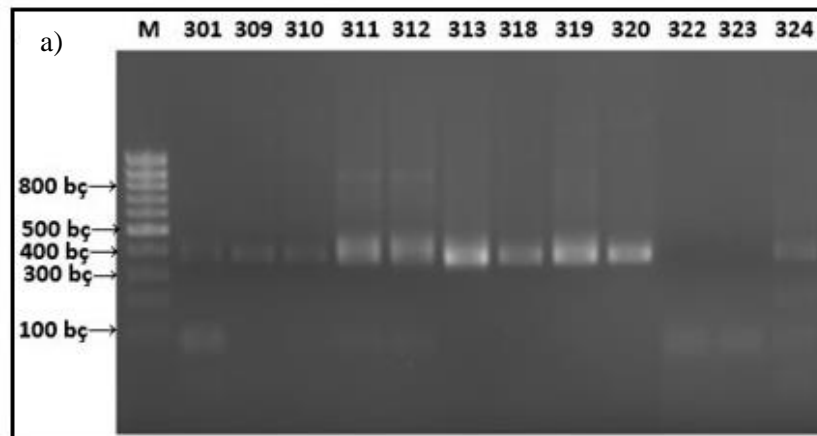
Bileşen	μL
ddH ₂ O	Hacim 30 μL 'ye tamamlanacak şekilde
10X NEB 3.1 Buffer	3 μL
PZR örneği	1 μL (1 μg)
BstNI (10 U/ μL)	1 μL

7. SONUÇLAR

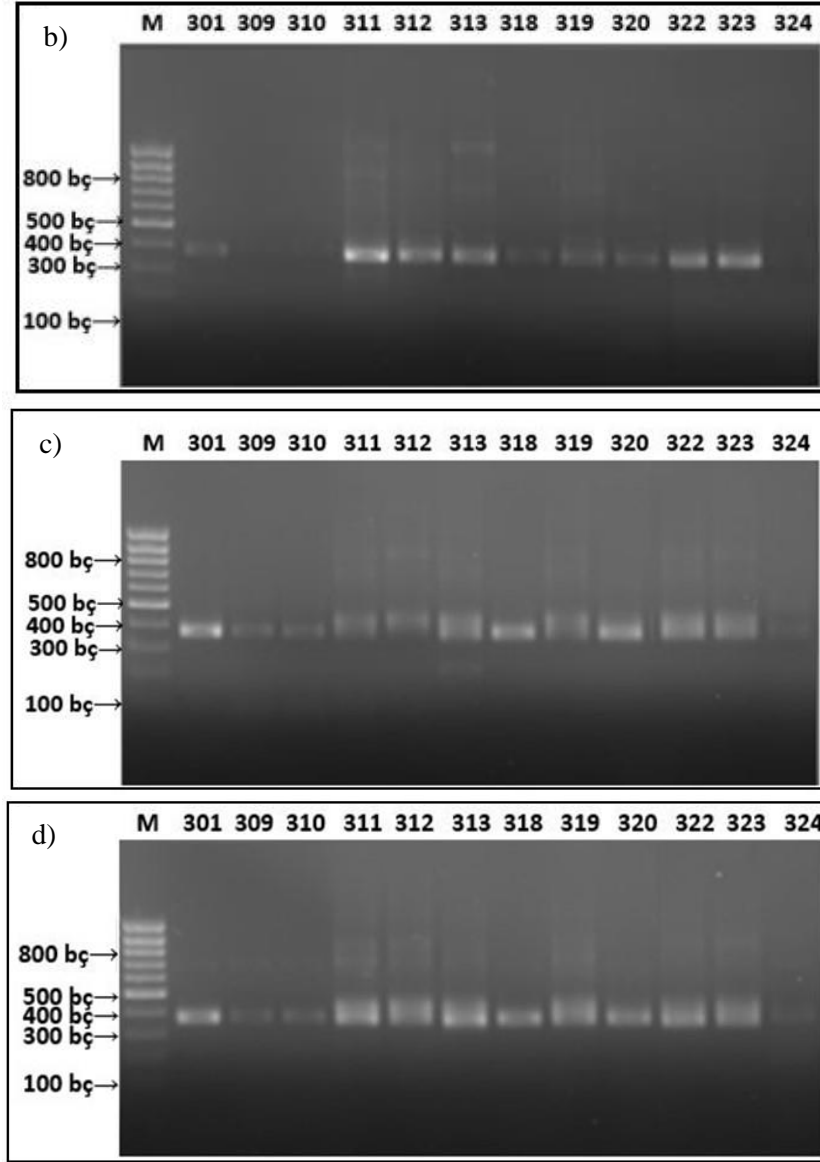
7.1. Antikor Kütüphanesinin Oluşturulması

7.1.1. İnsan Ağır Zincir (VH) Antikor Genlerinin Oluşturulması

İnsan ağır zincir değişken bölge antikor kütüphanesinin oluşturulması için öncelikle sağlıklı insan periferal kanından total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve geri transkripsiyon ile cDNA sentezi yapılmıştır. Sentezlenen cDNA kalıp olarak kullanılarak, insan VH genlerine spesifik olarak tasarlanmış 12 adet ileri ve 4 adet geri primerin tüm kombinasyonlarıyla PZR döngüleri gerçekleştirilmiştir. Agaroz jelde kontrol edilen PZR örneklerinde yaklaşık olarak 350-400 baz çifti büyüklüğünde olan insan VH antikor gen parçalarının oluşturulduğu görülmüştür. Bazı örneklerde antikor gen fragmanlarına ek olarak, spesifik olmayan smear benzeri kirlilikler görülmüştür. Bunun yanında 322-900 ve 323-900 primer çiftlerine ait kuyularda, tekrarlanan PZR çalışmalarına rağmen herhangi bir bant görülememiş sadece primer dimerleri görülmüştür. Antikor genlerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 7.1'de gösterilmektedir. Spesifik olmayan bantlar içeren örnekler agaroz jelden izole edildikten; saf olan örnekler ise PZR pürifikasyon kiti ile temizlendikten sonra konsantrasyonları belirlenerek sonraki aşamalarda kullanılmıştır.

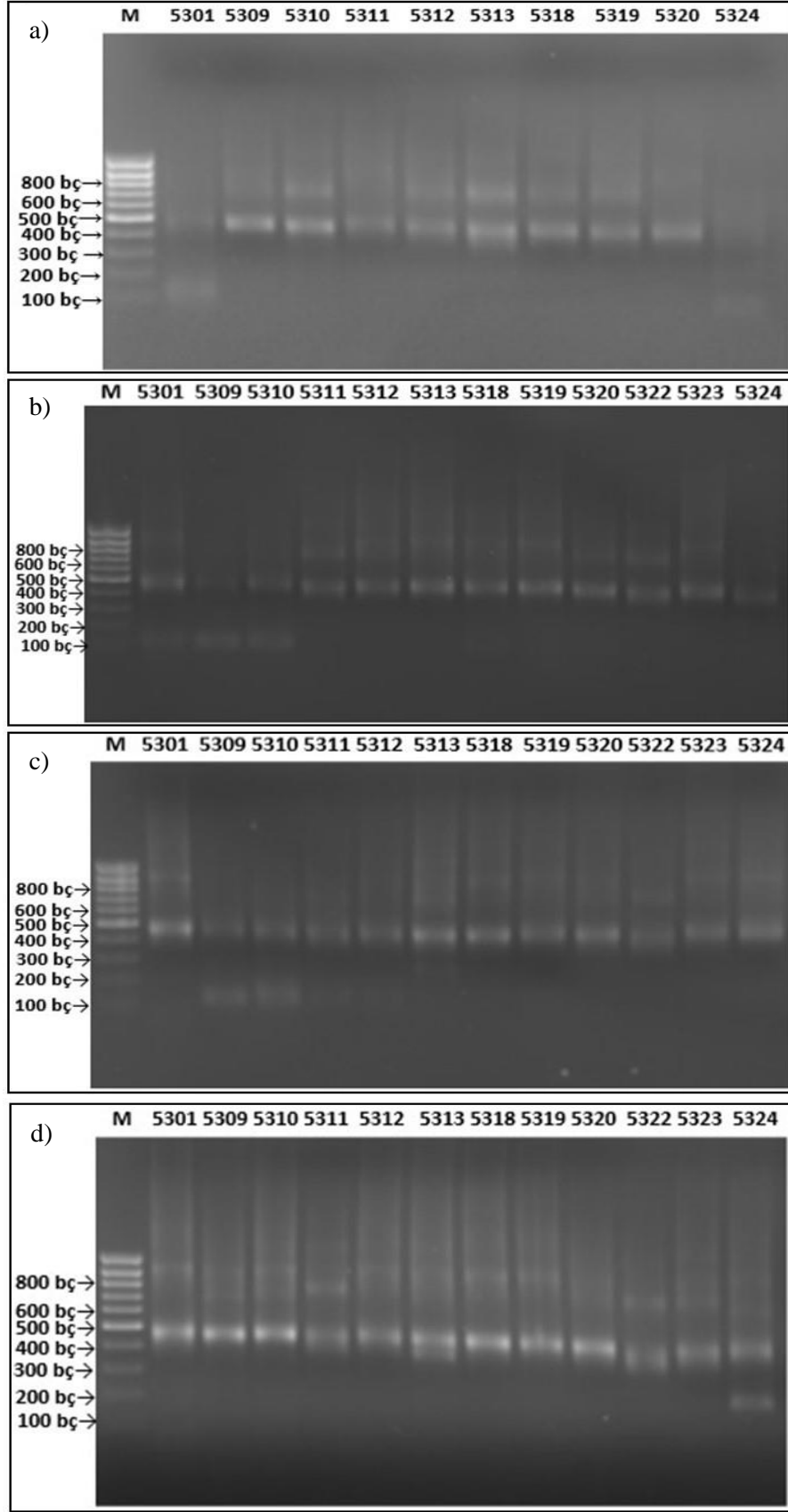


Şekil 7.1: a) 900, b) 901, c) 902 ve d) 903 geri primerleri ile ileri primer kombinasyonlarının PZR görüntüleri.



Şekil 7.1: Devam.

Antikor genlerinin fajmid vektöre klonlanabilmesi için vektörün çoklu klonlama bölgesinde varolan spesifik restriksiyon enzim bölgelerinin, oluşturulan antikor genlerinin 5' ve 3' uçlarına eklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla her bir antikor geni kalıp olarak kullanılarak, ilk PZR döngülerinde kullanılan her bir ileri primerin *SfiI* restriksiyon enzim dizisi; her bir geri primerin ise *NotI* restriksiyon enzim dizisi eklenmiş olan versiyonlarıyla tekrar PZR döngüleri gerçekleştirilmiştir. PZR döngüleri sonucunda yaklaşık olarak 400-500 baz çifti büyüklüğünde, ilk PZR setlerinden daha büyük olan bantlar gözlenmiştir. Bu örneklerin bazılarında da smear benzeri yapılar görülmüştür. PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 7.2'de gösterilmektedir.



Şekil 7.2: a) 6900, b) 6901, c) 6902 ve d) 6903 geri primerleri ile ileri primer kombinasyonlarının PZR görüntüleri.

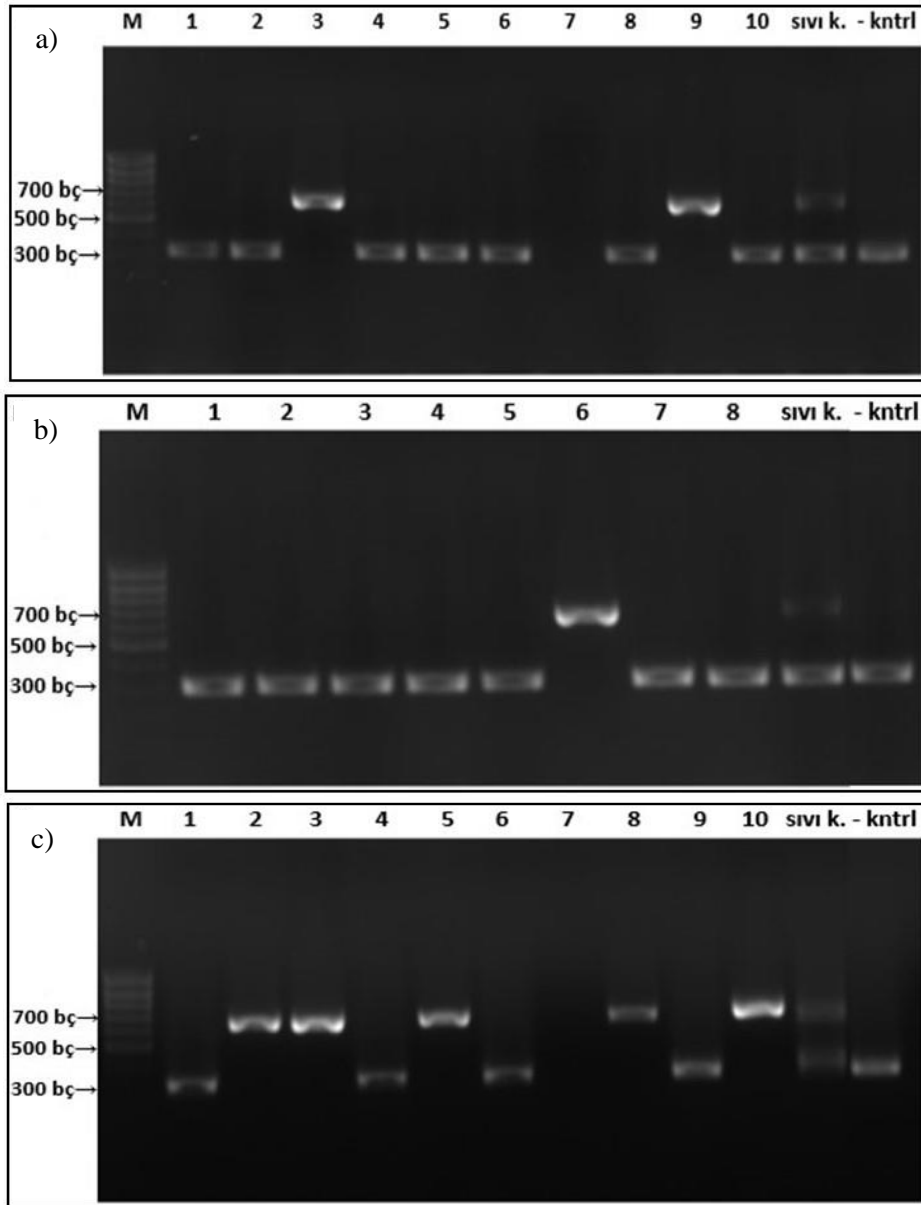
Antikor gen parçalarının elde edilmesi sonrasında her bir geri primer setine (6900, 6901, 6902, 6903) ait olan PZR örnekleri kendi aralarında biraraya getirilerek etanol çöktürme yöntemiyle konsantre edilmiş ve spesifik olmayan bantların uzaklaştırılması amacıyla antikor genlerine ait bantlar agaroz jelden izole edilmiştir.

7.1.2. Antikor Kütüphanesinin Vektöre Klonlanması ve Bakterilere Transformasyonu

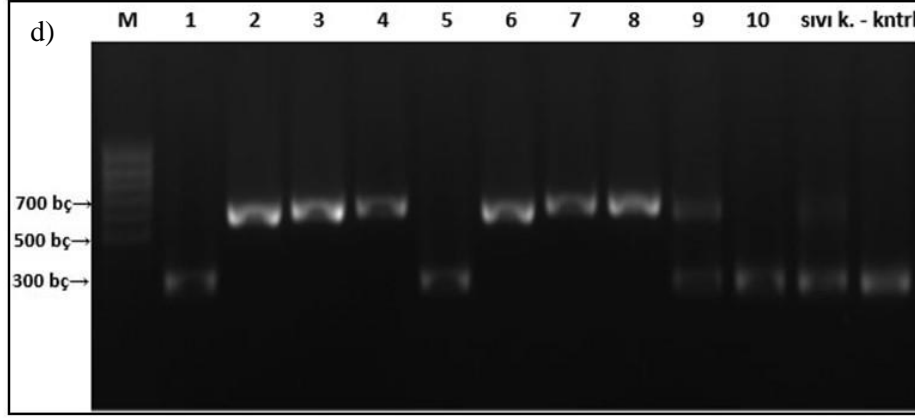
Bant izolasyonu ile elde edilmiş 4 farklı antikor geni seti ve klonlama yapılacak olan pDuck fajmid vektörünün sırasıyla *SfiI* ve *NotI* enzimleri ile kesimleri yapıp, örnekler agaroz jelden izole edildikten sonra 1:6 vektör:insert molar oranında ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon bitiminde ürünün tamamı *E. coli* amber supresör suşu olan TG1 bakterilerine transforme edilmiştir. Transformant kolonilerin seçilimi, pDuck fajmid vektörünün ampisilin direnç genine sahip olması dolayısıyla, ampisilinli ortamda büyütülme ile sağlanmıştır. Rastlantısal olarak seçilen transformant koloniler vektörün dış klonlama bölgesine spesifik olan primerler (459 ve 458 primerleri) kullanılarak koloni PZR ile kontrol edilmiştir. Koloni PZR ile kontrol edilen kolonilerden bazılarında yaklaşık olarak 600-700 baz çifti büyüklüğünde olan antikor gen parçaları görülmüştür. Burada, kullanılan primerlerin vektöre spesifik diziler olmaları dolayısıyla PZR ürünleri uç kısımlarında vektörden gelen dizileri içermekte, dolayısıyla boyut artmış olmaktadır. Bazı kolonilerde ise yaklaşık olarak 300 baz çifti büyüklüğünde bantlar görülmüştür. Bu bantlar vektörün çoklu klonlama bölgesinden kaynaklanmakta, dolayısıyla antikor geni içermeyen kolonileri göstermektedir. Transformasyon sonrası gece boyu büyütülen sıvı kültürlerin ise bir havuz olmaları nedeniyle hem antikor geni içeren bantlara hem de sadece vektör dizisi içeren bantlara sahip olduğu görülmüştür. Bunun yanında bazı örneklerde hiçbir bant görülememiştir. Agaroz jel görüntüleri Şekil 7.3'te gösterilmektedir. Transforme sıvı kültürlerden alınan örneklerin biraraya getirilip büyütülmesiyle B.E. VH antikor kütüphanesi olarak adlandırdığımız naiv insan antikor kütüphanesinin oluşturulması tamamlanmıştır. Bu bakterilere ait plate görüntüsü Şekil 7.4'te gösterilmiştir. Daha sonra bu bakteri kültürü faj eldesi işlemlerinde kullanılmıştır.

Burada kullanılan TG1 bakterileri amber stop kodonu açısından supresör olması sebebiyle vektöre klonlanan antikor gen yapısı ile bakteriyofaj kılıf proteini

arasındaki amber stop kodon tanınmamakta ve bu sayede antikor yapısı ve faj kılıf proteini birbirine bağılı olarak üretilmektedir. Bu sayede bu aşamada kullanılan amber supresör suşları, rekombinant antikor veya (poli) peptid yapılarının faj yüzeyinde oluşturulmasına olanak vermekte ve bu sayede spesifik yapıların seçilimini mümkün kılabilir.



Şekil 7.3: a) 6900, b) 6901, c) 6902 ve d) 6903 kütüphanelerinin TG1 bakterilerine transformasyonu sonrası koloni PZR görüntüleri.



Şekil 7.3: Devam.



Şekil 7.4: B.E. VH TG1 miks kütüphanesinin çizgi ekim yöntemi sonrası görüntüsü.

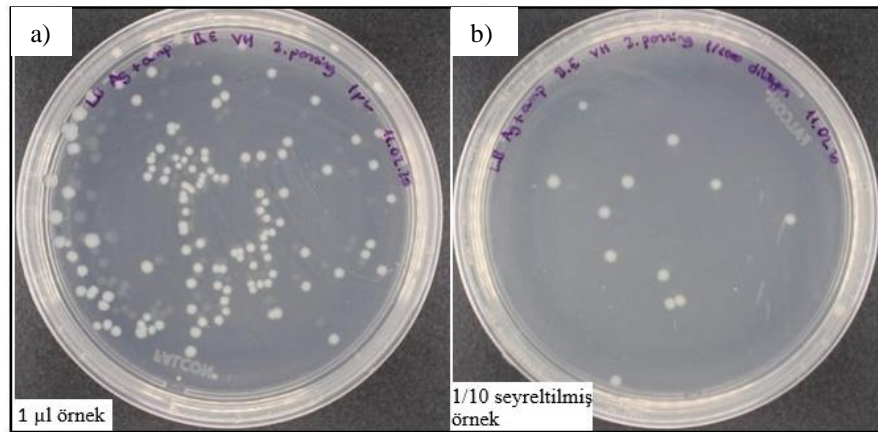
7.2. Enfektif Faj Eldesi ve Biyopanning Döngüleri

Fajmid vektörün enfektif faja dönüştürülmesi için M13K07 yardımcı fajından yararlanılmıştır. Bu sayede enfektif faj üretimi sağlandıktan sonra PEG çöktürme yöntemiyle fajlar bakteri kültür süpernatantından elde edilmiş, seri dilüsyon yöntemiyle titrasyonları yapılmıştır. EGFR'ye spesifik rekombinant faj yapılarının seçilimi için biyopanning döngüleri gerçekleştirilmiştir. VH yapılarının yaklaşık olarak 15 kDa gibi oldukça küçük yapılar olmaları ve yapışkan olmaları dolayısıyla spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, biyopanning döngülerinde yıkama aşamaları zorlayıcı koşullarla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yıkama sayısı ve deterjan yüzdesi normal prosedürdekine kıyasla 2 kat arttırılmıştır. Biyopanning döngüleri 1×10^{10} pfu faj ile gerçekleştirilmiştir. Her bir biyopanning döngüsü

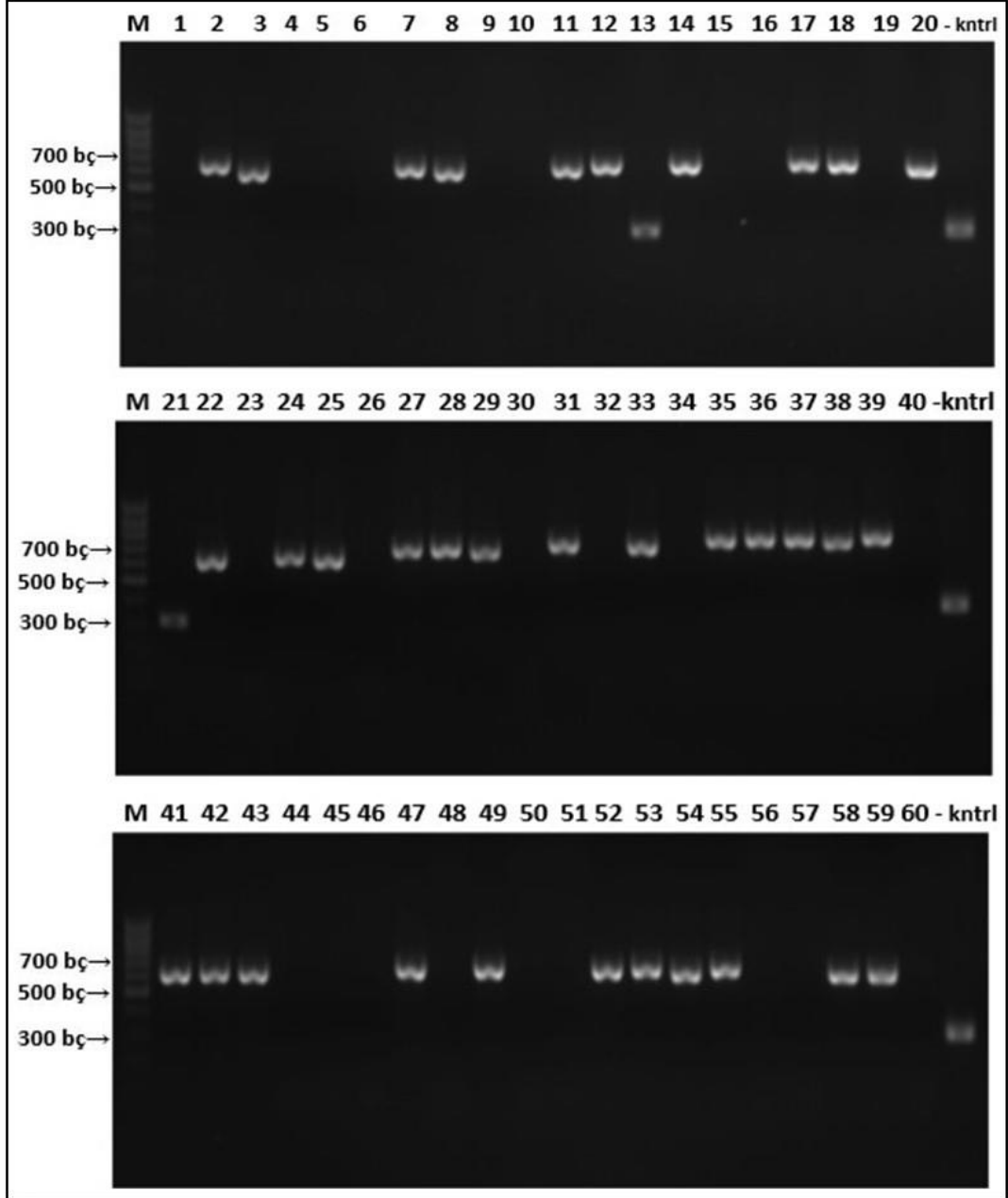
sonrasında rastlantısal olarak seçilen koloniler PZR yöntemiyle kontrol edilerek, klonların antikor geni içerip içermediği kontrol edilmiştir. Her bir biyopanning döngüsü sonrasında faj verimi hesaplanıp, biyopanningden elde edilen bakteriler tekrar M13K07 ile çoğaltılıp enfektif faja dönüştürüldükten sonra faj eldeleri gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen 3 tur biyopanning döngüsü sonrasında faj çıktısı 1.35×10^5 pfu/mL'ye ulaşmıştır. Faj veriminin beklenen düzeyde olması sebebiyle, panning döngüleri durdurulmuştur. Biyopanning döngülerine ait faj verimleri Tablo 7.1'de gösterilmiştir. 3. Biyopanning döngüsüne ait plate görüntüleri Şekil 7.5'te gösterilmiştir. 3. biyopanning sonrasında rastlantısal olarak seçilen 60 koloni PZR ile kontrol edilmiş, 34 koloninin klonlanan gen parçasını içerdiği tespit edilmiştir. PZR sonuçlarına ait agaroz jel görüntüleri Şekil 7.6'da gösterilmektedir.

Tablo 7.1: Biyopanning faj verimleri.

Biyopanning döngüsü	Faj girdisi (pfu)	Faj çıktısı (pfu)	Amplifikasyon sonrası (pfu)
			4×10^{11}
1	1×10^{10}	8.9×10^3	3×10^{11}
2	1×10^{10}	1.16×10^4	7.5×10^{11}
3	1×10^{10}	1.35×10^5	1.18×10^{12}



Şekil 7.5: 3. Biyopanning döngüsü sonrası a) 1 µL örnek ve b) 1/10 seyreltilmiş örneklerin plate görüntüleri.

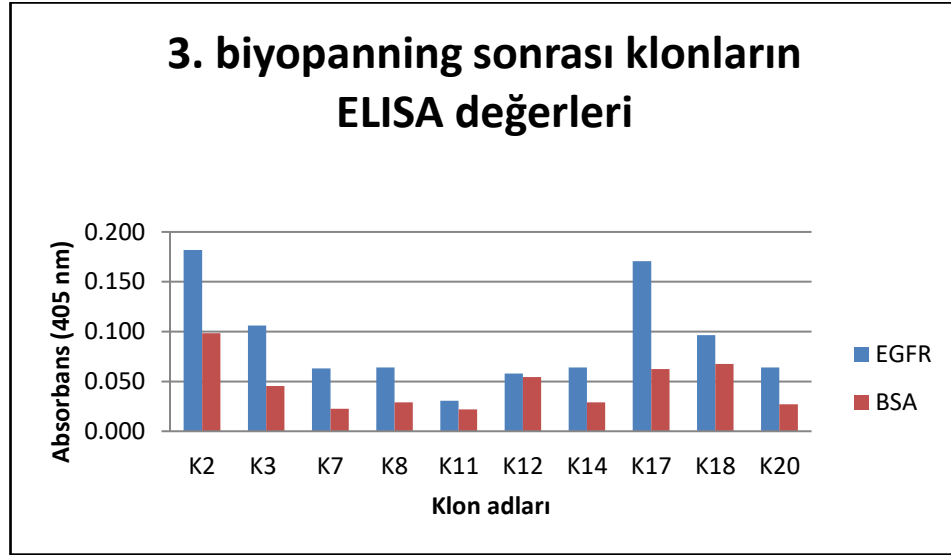


Şekil 7.6: 3. Biyopanning döngüsü sonrası koloni PZR.

7.3. Klonların EGFR'ye Bağlanması İncelenmesi

Biyopanningden elde edilen ve koloni PZR ile antikor genini taşıdığı tespit edilen 34 klonun EGFR'ye bağlanma afiniteleri faj-ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Klonlar büyütülüp M13K07 ile enfektif faj oluşumu teşvik edildikten sonra gece boyu büyütülen kültürlerden alınan süpernatantlar incelenmiştir. Değerlendirilen klonların bloklama tamponunda kullanılan BSA proteinine bağlanıp bağlanmadığı da kontrol edilmiştir. Bazı klonların EGFR ve BSA

proteinlerine benzer şekilde bağlandığı görülürken K3, K7, K8, K14, K17, K20 klonlarının BSA'ya kıyasla EGFR'ye bağlanma afinitelerinin 2 kattan fazla olduğu; K2 klonunda ise 1.8 kat olduğu ve EGFR'ye bağlanmada en yüksek absorbansa sahip olduğu görülmüştür. Klonların EGFR ve BSA'ya bağlanma afinitelerine ait grafik Şekil 7.7'de gösterilmiştir.



Şekil 7.7: 3. Biyopanning sonrası faj klonlarının ELISA değerleri.

7.4. DNA Dizileme Analizi

ELISA sonucunda EGFR'ye spesifitesi yüksek olan K2, K3, K7, K8, K14, K17, K20 klonlardan plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, elde edilen plazmid DNA'lar dizileme reaksiyonunda kullanılmıştır. Dizileme işleminde vektörün çoklu klonlama bölgesinin uçlarına spesifik olan 459 veya 458 primerleri kullanılmıştır. Dizileme reaksiyonları, sonuçların güvenilirliği açısından her klon için hem ileri okuma hem geri okuma olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Dizileri belirlenen klonların her birinde yaklaşık 500-700 bazlık diziler elde edilmiştir. Bu diziler, öncelikle ApE biyoinformatik aracıyla kontrol edilmiştir. ApE (A plasmid Editor) programı ile yapılan analiz sonucunda, klonların *SfiI* ve *NotI* kesim bölgelerini içerdiği görülmüştür. *SfiI* RE kesim bölgesinin öncesinde başlayan, çözümlük olarak üretilen antikorun periplazmik alana salgılanmasına aracılık eden pelB lider sekans dizisi gösterilmiştir.

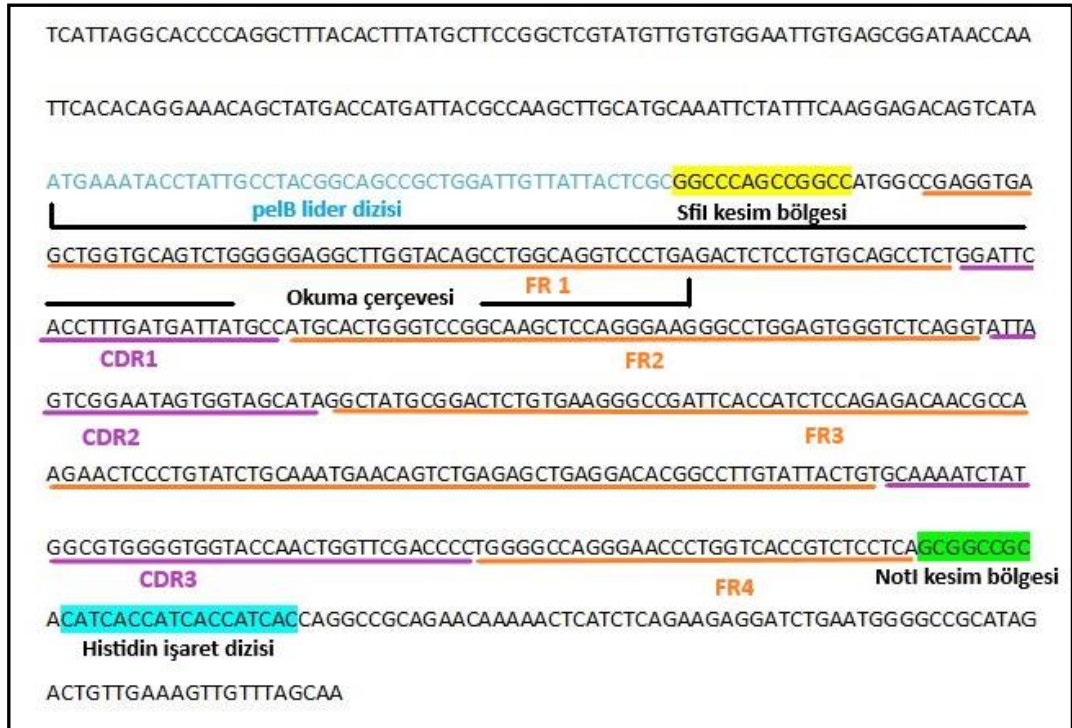
Okuma çerçeveleri analiz edildiğinde ise K2, K3, K7, K8, K14, K17 klonlarında antikor geninin orta kısımlarında bir TGA opal stop kodonu bulunduğu görülmüştür. Bu sebeple antikor geninin başlangıcından yaklaşık 20-50 aminoasit sonrasında dizinin sonlandığı görülmektedir. Bu şekilde oluşan okuma çerçeveleri Tablo 7.2'de gösterilmiştir.

Tablo 7.2: Klonlara ait oluşan okuma çerçeveleri.

Klon Adı	Aminoasit dizisi
K2	MAEVSWSLGEAWYSLAGP*
K3	MAEVQLVETGETWGTGETSSRAWHGVLGNGNEAPEGATW*
K7	MAEVQLVETGVTVETGETWGTGETSSRAWHGVLGNGNEAPE GATW*
K8	MAEVQLVETGETWGTGETSSRAWHGVLGNGNEAPEGATW*
K14	MAEVSWSLGEAWYSLAGP*
K17	MAEVSWSLGEAWYSLAGP*

Klonların immünoglobulin aileleriyle benzerlikleri, CDR ve FR bölgeleri VBase2 ve IgBlast analiz araçlarıyla incelenmiştir [75,76]. VBase2 analiz aracı ile K2, K14, K17 klonlarının IGHV3 gen ailesine ait olduğu tespit edilmiştir. Ancak VBase2 aracı K2 dizisinin insersiyon veya delesyon içerdiğini; K14 dizisinde ise stop kodon olduğunu belirtmektedir. K17 klonunda ise VBase2 ile IGHV3 genleri ile benzerliği gösterilmiştir ve CDR bölgeleri ile FR bölgeleri belirlenebilmiştir (Şekil 7.8). Ancak ApE ve Expasy translate araçlarıyla yapılan incelemede bu geni üretecek okuma çerçevesinin insersiyon veya delesyon sebebiyle değiştiği görülmüştür [77]. K17 klonuna ait dizi Şekil 7.8'de gösterilmiştir. K17 klonunun insersiyon veya delesyon olmaması durumunda oluşturacağı muhtemel dizi ise Şekil 7.9'da gösterilmiştir. Şekil 7.8'deki K17 dizisinden iki bazın bilgisayar ortamında silinmesiyle oluşturulan bu dizide klonlanan gen içerisinde stop kodonu olmadan bir okuma çerçevesi oluşmaktadır. Bu da bizim bu çalışmada kullandığımız vektör sisteminden beklediğimiz şekilde olmaktadır. Burada pelB lider dizi (vektörde) ile başlayan okuma çerçevesi *SfiI* enzim kesim bölgesi ve sonrasında klonlanan gen ile devam etmektedir. *SfiI* bölgesinden sonra 4. ve 5. Sırada gelen bazların silinmesiyle

teorik olarak oluşturduğumuz bu dizinin bitiminde *NotI* enzim kesim bölgesi ve histidin işaret dizisi bulunmaktadır. Bundan belirli sayıda baz sonrasında ise TAG amber stop kodonu bulunmaktadır ve bu stop kodonu, antikor geninin faj yüzeyinde sunulmasını (amber supresör suşlarda) veya çözümlük olarak üretilmesini (amber supresör olmayan suşlarda) sağlamaktadır. Ayrıca dizinin bu şekilde olması durumunda, K17 klonuna ait VBase2 ile elde edilen, IGHV3 ailesine ait bir VH antikoru oluşmaktadır.



Şekil 7.8: K17 klonuna ait DNA dizisi.

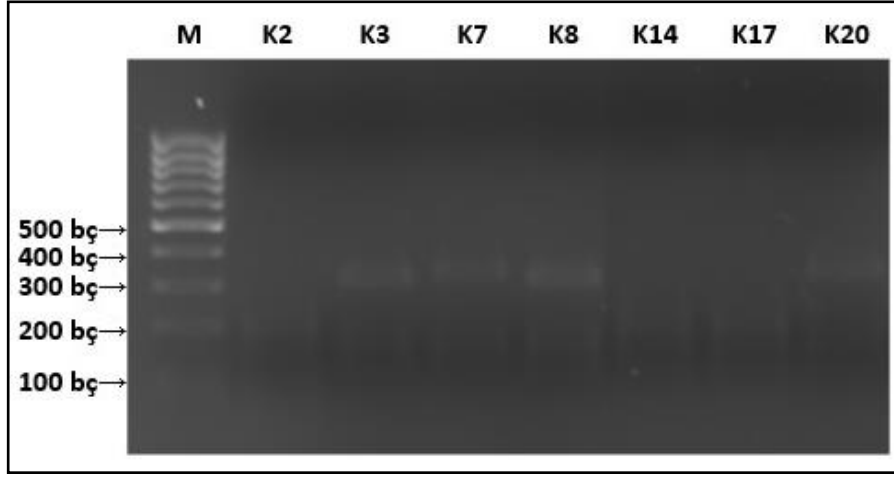
yapısının çözümlük olarak üretilmesi ve karakterizasyonu mümkün olamamaktadır. K20 klonuna ait dizi Şekil 7.10'de gösterilmektedir.



Şekil 7.10: K20 klonuna ait DNA dizisi.

7.5. DNA Parmak İzi Analizi

DNA dizileri belirlenen anti-EGFR faj klonlarının benzerlik/farklılıklarını ortaya koymak ve dizileme sonuçlarını desteklemek amacıyla DNA parmak izi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kısa bir tanıma bölgesine (5'-CCWGG-3') sahip olan ve parmak izi analizlerinde çoğunlukla kullanılan BstNI enzimi kullanılmıştır. K3, K7 ve K8 klonlarında 350 bç ve 200 bç büyüklüklerinde 2 farklı bant profilinin olduğu görülmüştür. K2, K14 ve K17 klonlarında ise yaklaşık 200 bç büyüklüğünde tek bir bant profiline sahip oldukları görülmüştür. Diğerlerinden farklı olarak K20 klonunda ise yaklaşık 300 bç büyüklüğünde tek bir bant görülmektedir. DNA parmak izi analizine ait agaroz jel görüntüsü Şekil 7.11'de gösterilmektedir.



Şekil 7.11: BstNI ile DNA parmak izi analizi.

8. TARTIŞMA

Monoklonal antikorlar kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisi ve tanısı için oldukça önem arz etmektedir [1]. Ancak yaklaşık 150 kDa büyüklüğünde olmaları, stabilite ve çözünürlüklerindeki problemler IgG formundaki bu antikorların tanı ve tedavideki kullanım potansiyellerini kısıtlayabilmektedir. Bu sebeple zaman içerisinde daha küçük yapıları antikor formatlarının geliştirilmesi üzerinde çalışılmıştır [17]. Nanobodyler bu antikor fragmanlarından biridir. Ağır zincir antikorları devgillerde doğal olarak üretilen hafif zincir içermeyen özgün antikorlardır. Bu yapılarıdaki antijen tanımadan sorumlu en küçük birim olan VHH nanobody yapıları hedef antijene karşı yüksek afinite gösteren ve 15 kDa boyutlarında olan oldukça küçük yapıları dolayısıyla tanı ve tedavi alanlarında yüksek potansiyele sahiptir. IgG yapısındaki antikorlara kıyasla küçük boyutları, yüksek stabilite ve çözünürlüğe sahip olmaları IgG antikorlarına kıyasla avantaj sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar nanobodylerin ekstrem koşullara dayanıklı olduğunu hatta denatürasyona uğrasalar bile tekrardan kolayca katlanabildiklerini göstermiştir [24,27,28,31]. Ayrıca bu yapılar üretim konusunda da IgG antikorlarına karşı avantaj sağlamaktadır. IgG antikorlarının post-translasyonel modifikasyonlar içermeleri üretimlerini zorlaştırmaktadır ve bu sebeple üretimleri gelişmiş yapıları organizmalarda sağlanabilmektedir. Dolayısıyla üretim süreci oldukça uzun ve maliyetli olabilmektedir. Buna karşın Nanobody yapıları sadece ağır zincir değişken bölgesinden oluştuğu için post-translasyonel modifikasyon içermemektedirler ve mikroorganizmalar kullanılarak kolayca üretilmektedir [27,31]. Bu sebeple, günümüzde bu tip antikorlar üzerinde birçok çalışma gerçekleştirilmektedir. Buna ek olarak boyutlarının çok küçük olması kan-beyin bariyerini geçmelerine olanak sağlamakta ve bu sebeple birçok nörolojik hastalığın tedavisi için de umut vadetmektedirler. Nanobodylerin etkinliklerini arttırmak amacıyla farklı moleküllerle konjuge edilmelerine de sağlanabilmektedir. Bu amaçla çeşitli konjugasyonlar yapılarak etkinlikleri arttırılmaya çalışılmaktadır. VH antikorları tek başlarına sağlayacakları faydalara ek olarak floresan proteinlerle füzyon olarak üretilerek tanı amacıyla kullanılabilirler. Bir diğer potansiyel ise Fc parçası ile füzyon edilmeleridir. Bu yolla nano-antikor yapısının tek başınayken sahip olmadığı efektör fonksiyonların sağlanabilmesi mümkündür. Dolayısıyla nano-antikor yapılarının

hedef yapıyı bloke etmesine ek olarak hedef hücrelerin öldürülmesini de sağlayabilirler. Fc yapısının füzyonuna benzer bir şekilde nano-antikoru, ilaç yüklü lipozom gibi yapılarla füzyonu da gerçekleştirilebilir. Bu sayede nano-antikor ile hedef hücrelere bağlanma sağlanırken, lipozomun taşıdığı ilacın hedef bölgeye taşınmasıyla terapötik etkinin sadece hedef bölgede gerçekleşmesi sağlanabilir. Benzer şekilde, farklı hedefleri tanıyan bispesifik yapılar oluşturularak da tedavi potansiyeli artırılabilir [24,28,34].

Nanobodylerin bu avantajları dolayısıyla bu tez çalışmasında naiv insan VH nano-antikorlarının oluşturulması ve potansiyellerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında insan VH antikor genleri başarıyla çoğaltılmış ve fajmid vektöre klonlanarak naiv insan VH antikor kütüphanesi oluşturulmuştur.

Bu kapsamda öncelikle antikor genlerinin oluşturulması için sağlıklı bireyden alınan periferik kan örneğinden RNA izole edilmiş ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Burada yüksek çeşitliliğe sahip cDNA, antikor kütüphanesinin kaynağı olmuştur. VH bölgesine spesifik primerler ile antikor genleri PZR yoluyla başarıyla çoğaltılmıştır. Sadece 322-900 ve 323-900 primer çiftlerine ait kuyularda, tekrarlanan PZR çalışmalarına rağmen herhangi bir bant görülememiş sadece primer dimerleri görülmüştür. Bunun sebebi, reaksiyon koşullarının bu primer çiftleri için uygun olmamasından kaynaklanmaktadır, koşulların optimize edilmesiyle bu örneklere ait bantların elde edilmesi sağlanabilir. Antikor genlerinin vektöre klonlanabilmesi amacıyla PZR reaksiyonlarıyla, antikor genlerinin uç kısımlarına restriksiyon enzim kesim bölgeleri eklenmiştir. Agaroz jel elektroforeziyle kontrol edilen örneklerin ilk PZR örneklerine kıyasla daha büyük olduğu görülmüştür. Bu durum, antikor genlerine restriksiyon enzim kesim bölgelerinin eklendiğini doğrulamıştır. Vektöre klonlama amacıyla antikor genlerinin 5' ve 3' uçlarına iki farklı restriksiyon enzim kesim bölgesi eklenmesi ile genin istenen doğrultuda olacak şekilde vektöre klonlanması sağlanmıştır.

Antikor kütüphanesinin TG1 bakterilerine transformasyonu sonrasında transformant bakterilerin büyütülmesi ve seçilimi, fajmid vektörde var olan; yaban TG1 bakterilerinin içermediği ampisilin direnç geni yoluyla sağlanmıştır. Buna ek olarak koloniler, antikor geninin varlığı açısından PZR ile kontrol edilmiştir. Bazı transformant kolonilerde 300 bç büyüklüğünde bantlar görülürken; diğerlerinde yaklaşık 600-700 bç büyüklüğünde bantlar görülmüştür. Burada kullanılan primerler

vektöre spesifik primerlerdir dolayısıyla vektöre ait bir kısım dizi de çoğaltılmakta ve bu sebeple bantlar antikor genlerinin boyutundan fazla olmaktadır. 300 bç içeren örnekler ise vektörün kendi üzerine katlanmasıyla oluşmuş; antikor geni içermeyen örneklerdir.

Transformant kültürlerden enfektif faj üretimi M13K07 yardımcı fajı ile sağlanmıştır. Daha sonra fajlar PEG çöktürme ile bakteri kültüründen elde edilmiştir. Seri dilüsyon yöntemiyle miktarları belirlenen faj stoğu, EGFR'ye spesifik yapıların seçilmesi amacıyla biyopanning döngülerinde kullanılmıştır. Zorlayıcı koşullarda yıkamalar ile spesifik olmayan yapılar uzaklaştırıldıktan sonra fajlar bakteri enfeksiyonu yoluyla biyopanning kuyularından ayrılmıştır. Her bir biyopanning döngüsü sonrasında koloniler PZR ile kontrol edilip antikor geni içerip içermedikleri açısından değerlendirilmiştir. Biyopanningden elde edilen bakteri kültürüyle tekrardan enfektif faj üretimi sağlanarak tekrar biyopanning yapılmıştır. Her biyopanning döngüsünde başlangıçtaki faj miktarı sabit tutulmuş; biyopanning sonucu elde edilen faj miktarları değerlendirilmiştir. Bu şekilde 3 tur biyopanning gerçekleştirilmiş ve beklenildiği şekilde 10^3 'ten başlayarak 10^5 pfu/mL faj miktarına ulaşılmasıyla döngüler sonlandırılmıştır. Son panning döngüsünden sonra klonlar öncelikle PZR ile değerlendirilmiştir. Naiv kütüphaneler teorik olarak yüksek sayıda antikor çeşitliliği içeren kütüphanelerdir [46,51,56]. Burada DNA dizilerine ek olarak PZR ile taranan klonların çoğunda bant boyutlarında küçük farklılıklar görülmektedir. Bu da oluşturduğumuz antikor kütüphanesinin çeşitliliğini kanıtlayıcı niteliktedir.

Antikor geni içeren klonlar büyütülerek enfektif faj oluşumu sağlandıktan sonra EGFR'ye bağlanma verimleri ELISA ile kontrol edilmiştir. Fajların, ELISA'da bloklamada kullanılan BSA proteinine bağlanıp bağlanmadığı da kontrol edilmiştir. İncelenen klonların bazılarında EGFR ve BSA proteinlerine bağlanma benzer şekilde iken, 7 klonun (K2, K3, K7, K8, K14, K17, K20) EGFR'ye spesifik olarak bağlandığı görülmüştür. Bu sebeple çalışmalara bu klonlar ile devam edilmiştir. DNA dizileri belirlenen klonların IGHV3 gen ailesi ile benzerlik gösterdiği tespit edilirken; okuma çerçeveleri analiz edildiğinde K2, K3, K7, K8, K14 ve K17 klonlarında, klonlanan bölge içerisinde TGA opal stop kodonu meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu sebeple klonlanan genin başlangıcından yaklaşık 20-50 aminoasit sonrasında dizi sonlanmaktadır ve fonksiyonel bir VH yapısı oluşmamaktadır. Bu durumda TGA stop kodonu sebebiyle, antikor geninin bitimindeki faj kılıf proteinine ulaşmadan

translasyonun durması ve enfektif faj oluşumunun gerçekleşmemesi beklenir. Ancak bu klonlar vektörde bulunan antibiyotik direnç geni dolayısıyla antibiyotikli ortamda seçimleri yapılan ve ELISA'da hedefe bağlandıkları anti-M13 antikoru ile tespit edilen klonlardır. Dolayısıyla TGA kodonuna rağmen bir şekilde translasyon devam etmiş ve faj yapıları oluşmuş olabilir. Ya da bir şekilde translasyon dursa da oluşan peptid yapıları faj oluşumuna katılmış ve yüzeyde sunulmuş olabilir. K20 klonunda ise diğer klonlardan farklı olarak klonlanan bölge içerisinde stop kodon içermediği görülmüştür. Biyoinformatik analizler, K20 klonunun klonlanan bölgeyi içeren bir okuma çerçevesi oluşturduğunu göstermiştir ancak bu klonda görülen durum beklenilenden farklıdır ve bu klon VBase2 ile analiz edilemezken; IgBlast taramasında sadece IGHV3 genlerinin FR1 bölgeleriyle benzerlik içerdiğini göstermiştir. Buna ek olarak bu okuma çerçevesi antikor geninin normal şartlarda sonlanmasını beklediğimiz TAG kodonundan önce, TGA stop kodonuyla sonlanmaktadır. Dolayısıyla beklenen antikor dizisi olmadığı anlaşılmaktadır.

Tüm klonlar içerisinde K17 klonunun biyoinformatik olarak analizlerine devam edildiğinde, K17 klonunda klonlanan bölge içerisinde insersiyon veya delesyon olduğu anlaşılmıştır. Dolayısıyla analiz araçlarıyla elde edilen okuma çerçevelerindeki aminoasit dizileriyle VBase2 analizinde elde edilen antikor geni uyuşmamaktadır. Bu durumun kaynağı olan 2 baz bilgisayar ortamında silindiğinde ve oluşan dizi tekrar analiz edildiğinde ise vektör ve klonlama sistemimize uyumlu şekilde; pelB lider dizi ile başlayan SfiI ve NotI bölgeleri arasında klonlanmış, histidin işaret dizisini içeren ve klonlanan yapının faj kılıf proteini ile arasında bulunan TAG amber stop kodonuyla sonlanacağı görülmüştür. Dolayısıyla bu çalışmada beklediğimiz dizi bu şekildeyken bir takım sebeplerle beklenen diziler değişmiştir. Bu duruma, antikor genlerinin çoğaltılması sırasında kullanılan polimeraz enziminin yanlış baz eklemesi sebep olmuş olabilir. Ya da antikor kütüphanesinin oluşturulmasında kullanılan primerler dolayısıyla antikor genlerinde bu tür bir insersiyon veya delesyon oluşmuş olabilir. Mutasyona sebep olan etkenin primerler olması durumunda; kullanılan primerler içerisinde mutasyon oluşmasına sebep olabilecek diziler bulunsa bile; sorunsuz primer dizilerinin olması da mümkündür. Bu durumda farklı klonların DNA dizilerinin belirlenmesiyle VH yapısına sahip, çözünük halde üretilebilecek yapıların üretimi mümkün olabilir. Dizi analizlerinde görülen sıkıntılar sebebiyle çözünük protein üretimi mümkün olmamıştır. İleriki çalışmalarda ise klonlarda meydana gelen stop kodonlarının sebeplerinin

araştırılması istenmektedir. Buna ek olarak farklı klonların DNA dizilimleri belirlenerek VH antikor geni içeren dizilerin taranması gerçekleştirilmelidir.

Birçok araştırma ekibi tarafından, faj gösterim teknolojisiyle, önemli bir anti-kanser hedefi olan EGFR'ye karşı nanobody yapıları oluşturulmaktadır. Henüz tedavide kullanım için onaylı olmasa da bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Bu yapıların oluşturulması için lama vb. kamelid türlerinin hedef antijen ile immünizasyonu gerekmektedir. Belirli sayıda immünizasyon sonrasında hayvandan elde edilen B lenfositleri üzerinden antikor genleri çoğaltılmakta ve daha sonra hedefe spesifik yapıların seçilimi faj gösterim teknolojisi sayesinde yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında ise farklı olarak antikor genleri insan kaynaklıdır ve immünizasyon gerekmeksizin oluşturulmuştur. Dolayısıyla bu tez kapsamında oluşturulan insan VH antikor kütüphanesi ile kamelid VHH nanobody yapıları ve VH nano-antikor yapılarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında naiv insan VH antikor kütüphanesi başarıyla oluşturulmuş ve fajmid vektöre klonlanmıştır. Hedefe spesifik olan yapıların seçiliminin ardından, analiz edilen klonların IGHV3 gen ailesi ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bir klon haricinde diğer tüm klonların klonlanan bölge içerisinde stop kodunu içerdiği; bir klonda ise DNA dizisinin beklenen antikor dizisiyle uygunluk göstermediği belirlenmiştir. Bu sebeplerden dolayı protein yapılarının üretimi gerçekleştirilememiştir. Gelecek çalışmalarda farklı klonların analiz edilmesi planlanmaktadır. Bu çalışmayla oluşturulan kütüphane naiv olması dolayısıyla yüksek çeşitliliğe sahiptir ve bu kütüphane içerisinde mutasyon içermeyen, beklenen türde bir VH antikor geninin tespit edilmesi, ayrıca farklı hedef yapılara karşı seçim yapılarak fonksiyonel VH yapılarının tespit edilmesi de mümkündür.

KAYNAKLAR

- [1] Nelson P.N., (2000) "Demystified ...: Monoclonal antibodies", *Molecular Pathology*, 53, 111–117.
- [2] Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S., Baker D. L., (2014) "Cellular and Molecular Immunology", 8th Edition, Cambridge-Elsevier.
- [3] Muyldermans S., (2013), "Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies", *Annual Review of Biochemistry*, 82, 775–797.
- [4] Rajewsky K., (2019), "The advent and rise of monoclonal antibodies" *Nature*, 575, 47–49.
- [5] Singh A., Chaudhary S., Agarwal A., Verma A. S., (2014) "Antibodies", *Animal Biotechnology*, 265–287.
- [6] Köhler G., Milstein C., (1975), "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature*, 256, 495–497.
- [7] Suzuki M., Kato C., Kato A., (2015), "Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies", *Journal of Toxicologic Pathology*, 28, 133–139.
- [8] Mahmuda A., Bande F., Al-Zihiry K. J. K., Abdulhaleem N., Majid R. A., Hamat R. A., et al., (2017), "Monoclonal antibodies: A review of therapeutic applications and future prospects", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16, 713–722.
- [9] Teng N. N. H., Lam K. S., Riera F. C., Kaplan H. S., (1983), "Construction and testing of mouse-human heteromyelomas for human monoclonal antibody production", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 7308–7312.
- [10] Little M., Kipriyanov S. M., Le Gall F., Moldenhauer G., (2000) "Of mice and men: Hybridoma and recombinant antibodies", *Immunology Today*, 21, 364–370.
- [11] Uba A. I., Abdulazeez M. A., Usman S. S., Tabakoglu H. O., Abubakar H., (2015) "Phage Display Technology As A Strong Alternative To Hybridoma Technology For Monoclonal Antibody Production", *International Journal of Science and Technology*, 4, 125–131.
- [12] Jakobovits A., (1995), "Production of fully human antibodies by transgenic mice", *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 561–566.
- [13] Wang S., (2011), "Advances in the production of human monoclonal antibodies", *Antibody Technology Journal*, 1, 1–4.

- [14] Chames P., Van Regenmortel M., Weiss E., Baty D., (2009), "Therapeutic antibodies: Successes, limitations and hopes for the future", *British Journal of Pharmacology*, 157, 220–233.
- [15] Ward E. S., Güssow D., Griffiths A. D., Jones P. T., Winter G., (1989) "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*", *Nature*, 341, 544–546.
- [16] Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hammers C., Songa E. B., (1993), "Naturally occurring antibodies devoid of light chains", *Nature*, 363, 446–448.
- [17] Holliger P., Hudson P. J., (2005), "Engineered antibody fragments and the rise of single domains", *Nature Biotechnology*, 23, 1126–1136.
- [18] De Greve H., Viridi V., Bakshi S., Depicker A., (2020) "Simplified monomeric VHH-Fc antibodies provide new opportunities for passive immunization", *Current Opinion Biotechnology*, 61, 96–101.
- [19] Golay J., Introna M., (2012), "Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays", *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 526, 146–153.
- [20] Zafir-Lavie I., Michaeli Y., Reiter Y., (2007), "Novel antibodies as anticancer agents", *Oncogene*, 26, 3714–3733.
- [21] Frenzel A., Hust M., Schirrmann T., (2013), "Expression of recombinant antibodies", *Frontiers in Immunology*, 4, 1–20.
- [22] Hunter M., Yuan P., Vavilala D., Fox M., (2019), "Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells", *Current Protocol in Protein Sci.*, 95,1–28.
- [23] Utsumi S., Karush F., (1964), "The Subunits of Purified Rabbit Antibody", *Biochemistry*, 3, 1329–1338.
- [24] Li C., Tang Z., Hu Z., Wang Y., Yang X., Mo F., et al., (2018), "Natural single-domain antibody-nanobody: A novel concept in the antibody field" *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14, 1–19.
- [25] Riechmann L., Muyldermans S., (1999), "Single domain antibodies: Comparison of camel VH and camelised human VH domains", *Journal of Immunological Methods*, 231, 25–38.
- [26] Allegra A., Innao V., Gerace D., Vaddinelli D., Allegra A. G., Musolino C., (2018), "Nanobodies and Cancer: Current Status and New Perspectives", *Cancer Investigation*, 36, 221–237.
- [27] Harmsen M. M., De Haard H. J., (2007), "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 13–22.

- [28] Jovčevska I., Muyldermans S., (2020), "The Therapeutic Potential of Nanobodies", *BioDrugs*, 34, 11–26.
- [29] Huang L., Muyldermans S., Saerens D., (2010), "Nanobodies®: Proficient tools in diagnostics", *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10, 777–785.
- [30] Schmitz K. R., Bagchi A., Roovers R. C., Van Bergen En Henegouwen PMP, Ferguson K. M., (2013), "Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains", *Structure*, 21, 1214–1224.
- [31] Khodabakhsh F., Behdani M., Rami A., Kazemi-Lomedasht F., (2018), "Single-Domain Antibodies or Nanobodies: A Class of Next-Generation Antibodies", *International Reviews of Immunology*, 37, 316–322.
- [32] Vincke C., Loris R., Saerens D., Martinez-Rodriguez S., Muyldermans S., Conrath K., (2009), "General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold", *Journal of Biological Chemistry*, 284, 3273–3284.
- [33] Scully M., Cataland S. R., Peyvandi F., Coppo P., Knöl P., Kremer Hovinga J. A., et al., (2019), "Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura", *New England Journal of Medicine*, 380, 335–346.
- [34] Bannas P., Hambach J., Koch-Nolte F., (2017), "Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics", *Frontiers in Immunology*, 8, 1–13.
- [35] Oliveira S., Schiffelers R. M., van der Veecken J., van der Meel R., Vongpromek R., van Bergen en Henegouwen PMP, et al., (2010), "Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform", *Journal of Controlled Release*, 145, 165–175.
- [36] Van Der Meel R., Oliveira S., Altintas I., Haselberg R., Van Der Veecken J., Roovers R. C., et al., (2012), "Tumor-targeted Nanobullets: Anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment", *Journal of Controlled Release*, 159, 281–289.
- [37] Van Audenhove I., Gettemans J., (2016), "Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer", *EBioMedicine*, 8, 40–48.
- [38] Schoonooghe S., Laoui D., Van Ginderachter J. A., Devoogdt N., Lahoutte T., De Baetselier P., et al., (2012) "Novel applications of nanobodies for in vivo bio-imaging of inflamed tissues in inflammatory diseases and cancer" *Immunobiology*, 217, 1266–1272.
- [39] Chanier T., Chames P., (2019), "Nanobody Engineering: Toward Next Generation Immunotherapies and Immunoimaging of Cancer", *Antibodies*, 8, 13.
- [40] Marschall A. L. J., Dübel S., (2016), "Antibodies inside of a cell can change its outside: Can intrabodies provide a new therapeutic paradigm?", *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 304–308.

- [41] Smith G.P., (1985), "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", *Science*, 228, 1315–1317.
- [42] McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., Chiswell D. J., (1990), "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains", *Nature*, 348, 552–554.
- [43] Marks J. D., Hoogenboom H. R., Bonnert T. P., McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., (1991), "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage", *Journal of Molecular Biology*, 222, 581–597.
- [44] Winter G., Griffiths A. D., Hawkins R. E., Hoogenboom H. R., (1994), "Making Antibodies by Phage Display Technology", *Annual Review of Immunology*, 12, 433–455.
- [45] Bazan J., Całkosiński I., Gamian A., (2012), "Phage display - A powerful technique for immunotherapy", *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 8, 1817–1828.
- [46] Lu R. M., Hwang Y. C., Liu I. J., Lee C. C., Tsai H. Z., Li H. J., et al., (2020), "Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases", *Journal of Biomedical Science*, 27, 1–30.
- [47] Nixon A. E., Sexton D. J., Ladner R. C., (2014), "Drugs derived from phage display from candidate identification to clinical practice", *MAbs*, 6, 73–85.
- [48] Smith G. P., Petrenko V. A., (1997), "Phage display", *Chemical Reviews*, 97, 391–410.
- [49] Rami A., Behdani M., Yardehnavi N., Habibi-Anbouhi M., Kazemi-Lomedasht F., (2017), "An overview on application of phage display technique in immunological studies", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, 599–602.
- [50] Carmen S., Jermutus L., (2002), "Concepts in antibody phage display", *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 1, 189–203.
- [51] Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A. H., (2018), "Basics of antibody phage display technology", *Toxins*, 10.
- [52] Harel Inbar N., Benhar I., (2012), "Selection of antibodies from synthetic antibody libraries", *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 526, 87–98.
- [53] Hamzeh-Mivehroud M., Alizadeh A. A., Morris M. B., Bret Church W., Dastmalchi S., (2013), "Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery", *Drug Discovery Today*, 18, 1144–1157.
- [54] O'connell D., Becerril B., Roy-Burman A., Daws M., Marks J. D., (2002), "Phage versus phagemid libraries for generation of human monoclonal antibodies", *Journal of Molecular Biology*, 321, 49–56.

- [55] Erdağ B., (1999), "Erişkin İnsan Normal Hemoglobinine Karşı Faj Gösterim Yöntemi ile Rekombinant Antikor Geliştirilmesi", Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi.
- [56] Frenzel A., Schirrmann T., Hust M., (2016), "Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy", *MAbs*, 8, 1177–1194.
- [57] Lim B. N., Tye G. J., Choong Y. S., Ong E. B. B., Ismail A., Lim T. S., (2014), "Principles and application of antibody libraries for infectious diseases", *Biotechnology Letters*, 36, 2381–2392.
- [58] Ponsel D., Neugebauer J., Ladetzki-Baehs K., Tissot K., (2011), "High affinity, developability and functional size: The holy grail of combinatorial antibody library generation", *Molecules*, 16, 3675–3700.
- [59] Almagro J. C., Pedraza-Escalona M., Arrieta H. I., Pérez-Tapia S. M., (2019), "Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development", *Antibodies*, 8, 44.
- [60] Chen W., Zhu Z., Xiao X., Dimitrov D. S., (2009), "Construction of a Human Antibody Domain (VH) Library", *Methods in Molecular Biology*, 525, 81–99.
- [61] Hammers C. M., Stanley J. R., (2014), "Antibody Phage Display: Technique and Applications", *Journal of Investigative Dermatology*, 134 (2), 1–5.
- [62] Chen W., Zhu Z., Feng Y., Xiao X., Dimitrov D. S., (2008), "Construction of a Large Phage-Displayed Human Antibody Domain Library with a Scaffold Based On a Newly Identified Highly Soluble, Stable Heavy Chain Variable Domain", *Journal of Molecular Biology*, 382, 779–789.
- [63] Pento J. T., (2017), "Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer", *Anticancer Research*, 37, 5935–5939.
- [64] Trenevskaa I., Li D., Banham A. H., (2017), "Therapeutic antibodies against intracellular tumor antigens", *Frontiers in Immunology*, 8.
- [65] Web 1, (2020), https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1, (Erişim Tarihi: 31/05/2020).
- [66] Seshacharyulu P., Ponnusamy M. P., Haridas D., Jain M., Ganti A. K., Batra S. K., (2012), "Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy", *Expert Opinion in Therapeutic Targets*, 16, 15–31.
- [67] Normanno N., De Luca A., Bianco C., Strizzi L., Mancino M., Maiello M. R., (2006), "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer", *Gene*, 366, 2–16.
- [68] Xu M. J., Johnson D. E., Grandis J. R., (2017), "EGFR-targeted therapies in the post-genomic era", *Cancer Metastasis Reviews*, 36, 463–473.

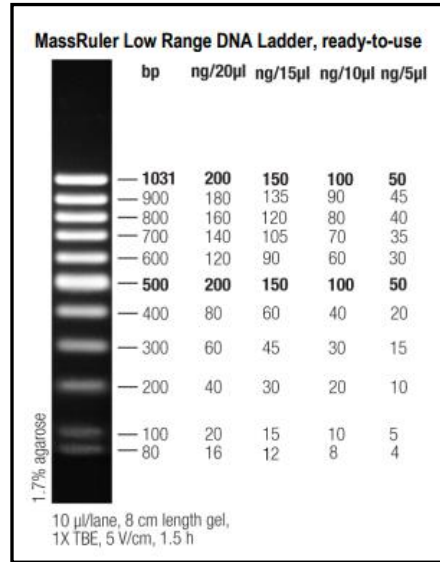
- [69] Wieduwilt M. J., Moasser M. M., (2008), "The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 1566–1584.
- [70] Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L., (2018), "Emerging functions of the EGFR in cancer", *Molecular Oncology*, 12, 3–20.
- [71] Arteaga C. L., Engelman J. A., (2014), "ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics", *Cancer Cell*, 25, 282–303.
- [72] Temraz S., Mukherji D., Shamseddine A., (2016), "Dual targeting of HER3 and EGFR in colorectal tumors might overcome anti-EGFR resistance", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 101, 151–157.
- [73] Han W., Lo H-W., (2012), "Landscape of EGFR signaling network in human cancers: Biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations", *Cancer Letters*, 318, 124–134.
- [74] Web 2, (2019) http://2011.igem.org/Team:UT_Dallas/ligation, (Erişim Tarihi: 01/09/2019)
- [75] Web 3, (2020) <http://www.vbase2.org/vbase2.php>, (Erişim Tarihi: 20/04/2020)
- [76] Web 4, (2020) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>, (Erişim Tarihi: 20/04/2020)
- [77] Web 5, (2020) <https://web.expasy.org/translate/>, (Erişim Tarihi: 22/04/2020)

ÖZGEÇMİŞ

Nurşah ERSEZEN 9 Ağustos 1995 yılında Balıkesir'in Burhaniye ilçesinde doğdu. 2013 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne başladı. Lisans bitirme tezi çalışmalarını "Hepatoselüler Karsinoma Hücrelerinde *Eya2*, *Ezrin* ve *Elf2* Genlerinin *Six1* Geni ile Olan Bağlantılarının Araştırılması ve Anlatım Seviyelerinin Analizi" konulu TÜBİTAK 2209-A projesi kapsamında tamamlayarak 2017 yılında mezun oldu. Aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde başladı. Bu süreçte TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde "Kanser Tedavisine Yönelik Yerli Biyobenzer İlaç Geliştirilmesi ve Üretimi-BİOSİM-1" projesinde bursiyer olarak görev aldı. Yüksek lisans tez çalışmasında faj gösterim teknolojisiyle naiv insan nano-antikorlarının geliştirilmesi üzerinde çalıştı.

EKLER

Ek-A: Mass Ruler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, SM0383)



Şekil A1.1: Mass Ruler Low Range DNA Ladder.