T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TERAPÖTİK MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU VE VERİMİNİN ARTTIRILMASI

Burcu Nur AYDIN

DANIŞMAN
Prof. Dr.Arif KAYGUSUZ

II. DANIŞMAN
Prof. Dr.Mehmet Ziya DOYMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

Aralık, 2022

Yardıma muhtaç tüm canlılara, şifa bekleyen tüm hastalara, masumiyetin ve umudun timsali olan bütün çocuklara ithaf ediyorum ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

TERAPÖTİK MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU VE VERİMİNİN ARTTIRILMASI

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 35157

TEŞEKKÜR

Çalışmamda uzmanlığından, bilgilerinden ve perspektifinden faydalandığım, tecrübelerinden ve katkılarından istifade ettiğim, bana yol gösteren Sayın Tez Danışman Hocalarım Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ ve Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ' a minnet ve şükranımı sunarım.

Eğitimim boyunca bilgi, deneyimlerinden yararlandığım, üzerimde emeği bulunan Anabilim Dalı öğretim üyelerimiz, Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN, Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN, Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Sevgi ERGİN, Doç. Dr. ERDAL POLAT ve Doç. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleşebilmesinde yardım ve desteklerini benden esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım MSc. Nesibe Selma ÇETİN, MSc. Sercan KESKİN, Özlem BAKANGİL, Dr. Merve YAZICI, Esmahan AVCI'ya ayrı ayrı teşekkür ederim.

Tez çalışmama olan finansal katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim. Tez çalışmamı yapabilmem için olanak sağlayan Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü'ne teşekkür ederim.

Hem iyi hem de zor zamanlarımda beni hep motive eden sevgili arkadaşlarım MSc. Büşra KARAÇAM, MSc. Nihan Sultan MİLAT, MSc. Sevim Nur AKYÜZ, Birgül ÇOLAK AL ve sevgili yüksek lisans arkadaşlarım MSc. Doğukan ÖZBEY, MSc. Edip TOKUÇ, MSc. Seçil İSKENDER, MSc. Özge AKSU, MSc. Nigar MİRALİZADEH, MSc. Merve EĞRİBEL, MSc. Metin YALÇIN, MSc. Ebru YÜCEBAĞ ayrıca süreç boyunca yardımı dokunan başta Biyolog Huriye YILDIZ, Biyolog Şerife KAYA, Lab. Nida KÜÇÜK AYDIN olmak üzere Anabilim dalımızın tüm çalışanları ve mikrobiyoloji laboratuarımızın tüm personeline teşekkür ederim.

Bu çalışmada kullanılan Cetuximab üreten CHO-K1 hücrelerini hazırlayan ve kullanımına izin vererek bizimle paylaşan Dr. Mohammadreza Nassiri ile MSc. Nesibe Selma ÇETİN'e ve çalışma esnasında lazım olan Cetuximab ticari antikorunu cömertçe hediye ettiği için Sayın Prof. Dr. Hacı Mehmet Türk'e teşekkür ederim.

Beni bugün olduğum yere gelmem konusunda her zaman destekleyen, her anımda yanımda olan, ellerinden gelenin en iyisini her daim yapmaya çalışan çok kıymetli aileme en samimi duygularımla teşekkürü bir borç bilirim.

Aralık 2022 Burcu Nur AYDIN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **ii**
BEYAN ..... **iii**
BÜTÇE DESTEKLERİ ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **x**
TABLO LİSTESİ ..... **xiv**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **xxii**
ABSTRACT ..... **xxiv**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Klasik Hücre Hattı Geliştirme Yöntemleri 4
1.1.1. Genel Hücre Biyolojisi 8
1.1.2. Hücre Kültürü için Gerekli Koşullar ve Malzemeler 14
1.1.3. Hücre Kültürü 23
1.1.4. Memeli Hücre Hatları 30
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE **34**
2.1. Monoklonal Antikorlar 34
2.1.1. Cetuximab 35
2.2. Apoptoz 38
2.2.1. Apoptozda Görevli Proteinler 40
2.2.2. Apoptotik Yolaklar 42
2.2.3. *Bax* ve *Bak1* 44
2.3. Gen Düzenleme ve Gen Nakavtı 45
2.4. CRISPR/Cas9 Sistemi 49
2.4.1. Genetik bir araç olarak CRISPR/Cas9 49
2.4.2. CHO-K1 hücrelerinde *Bak1* ve *Bax* genlerini nakavtla ilgili çalışmalar 56
2.5. Süspansiyon Kültürü 57

2.5.1. Biyoreaktörler 57
2.5.2. Kazanımlar 58
2.6. TEZİN AMACI 59
3. YÖNTEM 60
3.1. Gereçler 60
3.2. Yöntemler 65
3.2.1. Hücre Kültürü 65
3.2.2. Serum Azaltma 65
3.2.3. CRISPR/Cas9 ve pUC19_4sgRNA Vektörlerinin Hazırlanışı 66
3.2.4. Transformasyon 67
3.2.5. İzole Edilen Plazmidlerin Restriksiyon Enzim Kesimi İle Doğrulamasının Yapılması 68
3.2.6. PEI ile Transfeksiyon 68
3.2.7. FACS 69
3.2.8. Puromisin Öldürme Eğrisi 69
3.2.9. Tek Hücre Kültürü (Klonal İzolasyon) 69
3.2.10. CRISPR/Cas9 Aracılı Gen Nakavtının Değerlendirilmesi 70
3.2.11. Medyum Replasmanı 72
3.2.12. Süspansiyon Kültürüne Geçiş 72
3.2.13. MAb Saflaştırma 72
3.2.14. MAb Kontrolleri 73
4. BULGULAR 77
4.1. Serum Azaltma 78
4.2. CRISPR/Cas9 Gen Nakavtı 86
4.2.1. SgRNA Tasarımı 86
4.2.2. 4sgRNA Kaseti İçeren CRISPR/Cas9 Vektörlerinin Hazırlanışı 100
4.2.3. Restriksiyon Enzim Kesimi 102
4.3. T4 Ligaz Enzimi ile Ligasyon 104
4.4. Transformasyon 105
4.4.1. Plazmidlerin Restriksiyon Enzim Kesimi ile Doğrulamasının Yapılması 105
4.5. PEI ile Transfeksiyon 107
4.6. Transfekte Olan Hücrelerin Seçilimi 107
4.6.1. FACS 107
4.6.2. Puromisin Öldürme Eğrisi 108
4.7. Klonal İzolasyon ve Hücre Kültürünün Genişletilmesi 109

4.8. EIA ile MAb Üretiminin Kontrolü 110
4.9. Nakavt Kontrolleri 113
4.9.1. PZR-RFLP 113
4.10. Medyum Replasmanı 116
4.11. Süspansiyon Kültürü 116
4.12. MAb Kontrolleri 117
4.12.1. PZR 117
4.12.2. Bradford Testi ile MAb Miktar Tayini 118
4.12.3. EIA 119
4.12.4. IFA 120
4.12.5. Sitotoksisite 121
5. TARTIŞMA 123
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 126
KAYNAKLAR 128
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 147
ETİK KURUL İZİN YAZISI 148
KURUM İZNİ YAZILARI 149
ÖZGEÇMİŞ 150

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Prokaryot hücre yapısı [29] 11

Şekil 2: Ökaryot hücre yapısı [29] 11

Şekil 3: Her şeyin görüş alanında ve kullanım kolaylığına göre yerleştirilmişin olduğu kabin gösterilmektedir. 16

Şekil 4: CO_2'li hücre kültürü etüvü 17

Şekil 5:Ters mikroskop 18

Şekil 6: Morfolojilerine göre hücreler. 25

Şekil 7: Hücre sayımının yapıldığı Thoma lamının yakından görüntüsü 28

Şekil 8: Kültürde üretilen hücrelerin büyüme fazlarını gösteren grafik 29

Şekil 9: CHO-K1 hücrelerinin kültürdeki görüntüsü 31

Şekil 10: Mutant CHO-K1 hücrelerinin kültürdeki görüntüsü 32

Şekil 11: A-431 hücrelerinin kültürdeki görüntüsü 33

Şekil 12: Antikorun üç boyutlu yapısı. 34

Şekil 13: Cetuximab'ın üç boyutlu yapısı. [96] 38

Şekil 14: Bcl-2 ailesine ait proteinler 41

Şekil 15: Apoptotik yolaklar 43

Şekil 16: Hücre-içi apoptoz yolağı 44

Şekil 17: Gen düzenlemede olası sonuçlar. 46

Şekil 18: Bakteriyel bağışıklık sistemi [124] 49

Şekil 19: CRISPR/Cas9 sistemi [124] 50

Şekil 20: Addgene tarafından üretilen pX458 vektörü 51

Şekil 21: Addgene tarafından üretilen pX459 vektörü 52

Şekil 22: CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme metoduna ait basamaklar 53
Şekil 23: Multipleks sgRNA 55
Şekil 24: Hücre kültürü zaman çizelgesi 77
Şekil 25: Serum azaltılması (%10'dan %5'e) 79
Şekil 26: Serum azaltılması (%5'ten %2,5'e) 80
Şekil 27: Serum azaltılması (%2,5'ten %1,25'e) 81
Şekil 28: Serum azaltılması (1,25'ten %0,625'e) 82
Şekil 29: Serum azaltılması (%0,625'ten % 0,31'e) 83
Şekil 30: Serum azaltılması (%0,31'den serum içermeyen medyuma) 85
Şekil 31: Benchling'te proje oluşturma sayfası 87
Şekil 32: Proje oluşturma adımları 88
Şekil 33: Proje oluşturma adımları 88
Şekil 34: sgRNA tasarlama adımları 89
Şekil 35: sgRNA tasarlama adımları 89
Şekil 36: sgRNA tasarlama adımları 90
Şekil 37: sgRNA tasarlama adımları 91
Şekil 38: sgRNA tasarlama adımları 91
Şekil 39: sgRNA tasarlama adımları 92
Şekil 40: sgRNA tasarlama adımları 92
Şekil 41: sgRNA doğrulama adımları 93
Şekil 42: sgRNA doğrulama adımları 94
Şekil 43: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 94
Şekil 44: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 95
Şekil 45: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 95
Şekil 46: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 96
Şekil 47: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 97
Şekil 48: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 97

Şekil 49: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 98

Şekil 50: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 98

Şekil 51: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi 99

Şekil 52: 4sgRNA kaseti 101

Şekil 53: 1093 bp uzunluğundaki bant sgRNAların temsil edildiği sekansa aittir. 103

Şekil 54: pX458 plazmidinin kesiminin doğrulanması 103

Şekil 55: pX459 plazmidinin kesiminin doğrulanması 104

Şekil 56: Ligasyon hesaplamaları 105

Şekil 57: Ligasyon kontrolleri 106

Şekil 58: FACS analizi ile yeşil floresan ışıması yapan hücrelerin seçilmesi 107

Şekil 59: Öldürme Eğrisi 108

Şekil 60: pX458_4sgRNA ile transfekte edilen CHO-K1 hücrelerine ait tek hücreden köken alan kolonilere ait kültür 109

Şekil 61: pX459_4sgRNA ile transfekte edilen CHO-K1 hücrelerine ait tek hücreden köken alan kolonilere ait kültür. 110

Şekil 62: Serum azaltmanın mAb üretimine etkisinin anlaşılması için yapılan EIA 111

Şekil 63: pX458_4sgRNA Plazmidi İle Transfekte Edilen Hücrelerin mAb Üretimi 112

Şekil 64: pX459_4sgRNA Plazmidi İle Transfekte Edilen Hücrelerin mAb Üretimi 113

Şekil 65: Koloni PZR 114

Şekil 66: PZR ile çoğaltılan bölgeler 115

Şekil 67: PZR-RFLP 115

Şekil 68: Süspansiyon kültürüne geçiş 117

Şekil 69: PZR ile gen seviyesinde doğrulama 118

Şekil 70: Bradford antikor miktar tayini 119

Şekil 71: EIA ile mAbların hedef antijene bağlanmalarının kıyaslanması 120

Şekil 72: IFA ile mAbların EGFR'ye bağlanmasının gösterilmesi 120

Şekil 73: ADCC Yüzdeliği 121

Şekil 74: CDC Yüzdeliği.....122

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Hücre biyolojisi ve hücre kültürü için önem arz eden gelişmelerin zaman çizelgesi ..6

Tablo 2: Prokaryotlar ile ökaryotların karşılaştırılması [35] 10

Tablo 3: Hayvan hücre kültürü için kullanılan medyumlar [44] 20

Tablo 4: Hücre kültüründe kullanılan bazı medyumlar 21

Tablo 5: Memeli hücre kültürü için kullanılan antibiyotik ve fungisit konsantrasyonları [57] 23

Tablo 6: Gen susturma teknikleri [120] [121] 47

Tablo 7: Gen düzenleme teknikleri [122] 48

Tablo 8: Malzemeler 60

Tablo 9: Cihazlar 63

Tablo 10: Çözeltiler 64

Tablo 11: PZR değerlendirmesi için tasarlanan primer sekansları ve reaksiyon sonucunda oluşması beklenen amplikon boyutları 71

Tablo 12: PZR değerlendirmesi için tasarlanan primer sekansları ve reaksiyon sonucunda oluşması beklenen amplikonların boyutları 74

Tablo 13: Tasarlanmış olan sgRNA sekansları 99

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
α	Alfa
w/v	Ağırlık/hacim
β	Beta
bp	Baz çifti
C°	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm^2	Santimetre kare
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Bağıl merkezkaç kuvveti
GB	Giga baz
gr	Gram
h/h	Hacim/hacim
κ	Kappa
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
λ	Lambda
L	Litre
m	Metre
M	Molar
mA	Miliamper
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm^2	Milimetre kare

N	Normal
ng	Nanogram
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
pg	Pikogram
pH	Potansiyel hidrojen
U	Ünite
V	Volt
w/w	Ağırlık/ağırlık
x:y	(x+y) karışımındaki x ve y'nin miktarsal oranı
1X	Bir kat yoğunlukta
10X	On kat yoğunlukta
100X	Yüz kat yoğunlukta

Kısaltmalar	**Açıklama**
3'-UTR	3’ translasyon olmayan bölge
A-431	İnsan epidermoid karsinom hücre hattı
Ab	Antikor
ADCC	Antikor bağımlı hücresel sitotoksisite
Ag	Antijen
AOF	Hayvansal köken içermeyen
APAF-1	Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1
APS	Amonyum Persülfat
Bak1	Bcl-2 Antagonist/Katil 1 proteini
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
BB	Bağlama tamponu
BH	Bcl-2 homoloji
BHK	Baby Hamster Kidney hücre hattı

Bim	Bcl-2 Etkileşimli Hücre Ölümü Aracısı
BR	Bradford reaktifi
BRAF	V-raf fare sarkoma viral onkogen homolog B1
BSA	Sığır serum albümini
$CaCI_2$	Kalsiyum Klorid
Cas9	CRISPR aracılı protein 9
CB	Kaplama tamponu
CBh	Chicken β-Actin hybrid
CDC	Kompleman bağımlı sitotoksisite
CH	Ağır zincirin sabit bölgesi
CHO	Chinese Hamster Ovary hücre hattı
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary-K1 hücre hattı
CL	Hafif zincirin sabit bölgesi
CMV	*Cytomegalovirus*
CO2	Karbondioksit
CRISPR	Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar
CRISPR/Cas9	CRISPR/CRISPR aracılı protein 9
CRISPRi	CRISPR interference
crRNA	CRISPR RNAları
CTL	Sitotoksik T lenfositleri
DAPI	4’,6’-diamino-2-fenil-indol
DH5α	Douglas Hanahan Kompetan *E. coli* hücreleri
DKO	İkili nakavt
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DPBS	Dulbecco’s phosphate-buffered saline
EB	Elüsyon tamponu
E. coli	*Escherichia coli*

EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EIA	Enzim İmmüno Assay
ER	Endoplazmik Retikulum
EX-CD	EXCELL CD Hybridoma Medium
F	İleri
Fab	Antijen bağlayan bölge
FACS	Florescence activated cell sorting
FBS	Fetal sığır serumu
Fc	Kristalize olan bölge
FCS	Fetal buzağı serumu
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FO	Plazmasitomlu fare B lenfoblast hücresi
GFP	Yeşil floresan proteini
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
HAMA	İnsan anti-fare antikoru
H	Ağır
HC	Ağır zincir
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HR	Homolog rekombinasyon
HRP	Horse radish peroksidase enzimi
H_2SO_4	Sülfürik asit
IAP	Apoptoz inhibitör ailesi proteinleri
IFA	İmmüno floresan analizi
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobülin
IgG	İmmünoglobülin-G
IgG-FITC	İmmünoglobülin G floresan izotiyosiyanatı
IgG-HRP	İmmünoglobülin G yabanturpu peroksidazı
IHC	İmmünohistokimya analizi

Kaspaz	Cysteine Aspartate Specific Proteases
KCI	Potasyum Klorid
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KH_2PO_4	Potasyum Fosfat Monobazik
KRAS	Kirsten sıçan sarkom virüsü
L	Hafif
lag	Başlangıç fazı
LB	Luria Bertani
LBA	Luria Bertani agar
LC	Hafif zincir
L-glu	L-glutamik asit
log	Logaritmik üreme fazı
mAb	Monoklonal antikor
MAPK	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
MEM	Eagle minimal essential medium
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
$MgSO_4$	Magnezyum Sülfat
MGW	Moleküler kalite su
miRNA	mikro RNA
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MOMP	Mitokondrilerin dış zarları geçirgenleşmesi
NaCI	Sodyum Klorid
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
$NaHCO_3$	Sodyum Bikarbonat
NaH_2PO_4	Sodyum Fosfat Monobazik
Na_2HPO_4	Sodyum Foasfat Dibazik
NB	Nötralizasyon tamponu
NHEJ	Homolog olmayan uç birleşmesi
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PAM	Öncül-aralayıcı komşu motif
PBMC	Periferik kan mononükleer hücresi

PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween 20
PEİ	Polietilen imin
PES	Penisilin-Streptomisin
pX458	pSpCas9(BB)-2A-GFP
pX459	pSpCas9(BB)-2A-Puro
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR-RFLP	PZR ve restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi
R	Geri
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA interferans
Scr	Tek kılavuz RNA iskelesi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SF	Serum içermeyen
SFM	Serum içermeyen medyum
sgRNA	Tek kılavuz RNA
siRNA	Susturucu RNA
Sp2/0	Fare dalak ve miyeloma hibridoması
Stbl3	Stabil Kompetan *E. coli* hücreleri
SOC	Super Optimal Catabolite
TALEN	Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazı
TAE	Tris-asetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TGF-α	Dönüştürücü büyüme faktörü-alfa
TKI	Tirozin kinaz inhibitörü
TMB	Tetrametilbenzidin

TNF	Tümör nekroz faktörü
TNFR	Tümör nekroz faktörü reseptörü
Top10	Yüksek verimli kompetan *E. coli* hücresi
tracrRNA	Trans aktive edici CRISPR RNA
TRAIL	Tümör nekroz faktörü ilişkili apoptoz başlatıcı ligand
Tris-HCl	Tris (Hidroksimetil) Aminometan
UV	Ultraviyole
VH	Ağır zincirin değişken bölgesi
VL	Hafif zincirin değişken bölgesi
VLP	Virüs benzeri partikül
WT	Yabanıl tip
ZFN	Çinko-parmak nükleazı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TERAPÖTİK MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU VE VERİMİNİN ARTTIRILMASI

Burcu Nur AYDIN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Mikrobiyoloji Programı

Danışman : Prof. Dr.Arif KAYGUSUZ

II. Danışman :Prof. Dr.Mehmet Ziya DOYMAZ

Terapötik monoklonal antikorlar (mAb) günümüzde özellikle onkoloji, immünoloji ve organ nakli alanlarında iyi kabul görmüş bir ilaç sınıfıdır. MAbların çeşitli kanserlerin tedavisinde, geleneksel sitotoksik ilaçlardan daha az yan etki taşıdığı kanıtlanmış ve hasta yaşam kalitesinin artmasını sağladığı gösterilmiştir. [1]

Günümüzde bilinen birçok monoklonal antikorun endüstriyel ölçekte üretilebilmesi için sıklıkla CHO (Chinese Hamster Ovary) hücreleri kullanılmaktadır. [1] [2] CHO hücreleri insan benzeri translasyon sonrası modifikasyonlar ile rekombinant proteinleri ifade edebilme yeteneğine sahiptir. [2]

Bu çalışmanın amacı CHO hücrelerinin K1 suşu kullanılarak Cetuximab üretiminin ve verimliliğinin arttırılması için:

1. Yapışan hücre kültüründen süspansiyon kültürüne geçiş yapılarak daha büyük hacimlerde kültür yapılarak daha fazla mAb üretilmesi,
2. Süspansiyon kültürünü desteklemek için RPMI 1640'tan EXCELL Hybridoma'ya geçilmesi,

3. Vasatta bulunan serum miktarı azaltılarak CHO-K1 hücrelerinin serum içermeyen kültüre adapte edilmesi,
4. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak programlı hücre ölümüne neden olan pro-apoptotik *Bak1* ve *Bax* genlerinin kalıcı olarak inhibe edilmesi ile zorlu kültür koşullarına dayanıklı yeni bir hücre suşu oluşturulup Cetuximab üretimindeki verimin arttırılması hedeflenmektedir.

Aralık 2022 , 2sayfa.

Anahtar kelimeler: Cetuximab, CHO-K1 hücre hattı, CRISPR/Cas9, Süspansiyon Kültürü, Serum-içermeyen medyuma adaptasyon

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

OPTIMIZATION AND INCREASING EFFICIENCY OF PRODUCTION OF THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES

Burcu Nur AYDIN

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Microbiology

Microbiology Programme

Supervisor: Prof. Dr.Arif KAYGUSUZ

Co-Supervisor:Prof. Dr.Mehmet Ziya DOYMAZ

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are currently a well-accepted class of drugs, especially in the fields of oncology, immunology, and organ transplantation. MAbs have been proven to have fewer side effects than conventional cytotoxic drugs in the treatment of various cancers and have been shown to improve patient quality of life. [1]

CHO (Chinese Hamster Ovary) cells are frequently used to produce many known monoclonal antibodies on an industrial scale. [1] [2] CHO hücreleri insan benzeri translasyon sonrası modifikasyonlar ile rekombinant proteinleri ifade edebilme yeteneğine sahiptir. [2] CHO cells are capable of expressing recombinant proteins with human-like post-translational modifications. [2] CHO hücreleri insan benzeri translasyon sonrası modifikasyonlar ile rekombinant proteinleri ifade edebilme yeteneğine sahiptir. [2]

The aim of this study is to increase the production and efficiency of Cetuximab using K1 strain of CHO cells by:

1. Producing more mAbs by switching from adherent cell culture to suspension culture and culturing in larger volumes,
2. Switching from RPMI 1640 to EXCELL Hybridoma to support suspension culture,

3. Adaptation of CHO-K1 cells to serum-free culture by reducing the amount of serum in the medium,
4. By using the CRISPR/Cas9 system, it is aimed to permanently inhibit the pro-apoptotic *Bak1* and *Bax* genes that cause programmed cell death, to create a new cell strain resistant to harsh culture conditions and to increase the efficiency in Cetuximab production.

December2022, 2pages.

Keywords: Cetuximab, CHO-K1 Cell Line, CRISPR/Cas9, Suspension Culture, Serum-free media adaptation

1. GİRİŞ

Bir kanser ilacı olan Cetuximab, hücre kültürü ile üretilen bir monoklonal antikordur. Hücre kültürüne küçük hacimler ile başlanıp zamanla hücre sayısının artmasıyla kültür genişletilerek büyük hacimlerde monoklonal antikor üretimi sağlanmaktadır. Bu amaçla hücre kültürü çeşitli yöntemlerle optimize edilerek en asgari girdi ile en azami çıktının elde edilmesi ve yüksek verim ile monoklonal antikorun üretilmesi hedeflenmiştir.

Bu projenin amaçlarından biri olan serum içermeyen medyum adaptasyonu sayesinde, hem etik olarak problem teşkil eden hem de kontaminasyon riskini arttıran serumun azaltılarak tamamen kullanımdan çıkartılması birincil olarak önem taşımaktadır. Aynı hacimde medyum kullanılarak daha fazla hücrenin üretilebilmesi için hücrelerin süspanse kültüre adapte olması ikinci hedef olarak amaçlanmıştır. Bu işlem sırasında süspansiyon kültürünü desteklemek amacıyla RPMI 1640 medyumundan kademeli olarak EX-CELL CD Hybridoma medyumuna geçiş planlanmıştır. Son olarak her bir hücreden en uzun sürede faydalanabilmek için hücrelerin daha dayanıklı olması amacıyla apoptoza neden olan pro-apoptotik genlerinin nakavt edilmesi amaçlanmıştır. Tüm bu hedefler neticesinde bu projede optimize edilmiş bir üretim sisteminde en yüksek verim ile Cetuximab adlı ticari monoklonal antikorun üretilmesi hedeflenmiştir.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiş olan bu projede,

- CHO-K1 hücre kültürlerinin yüksek miktarda ve süspanse olarak üremeleri için serum miktarı azaltılarak serum içermeyen kültüre geçilmesi
- Bu esnada hücrelerin ihtiyaç duyacağı metabolik ürünleri sağlayabilmek amacıyla medyumun değiştirilmesi;
- Bu hücrelerin CRISPR/Cas9 sistemi ile *Bak1* ve *Bax* pro-apoptotik genlerinin devre dışı bırakılarak zorlu kültür koşullarına dirençli olmalarının sağlanması,
- •DKO *Bax* ve DKO *Bak1* mAb üreten süspanse CHO-K1 hücre hattının elde edilmesi amaçlanmıştır.

Sağlık Bakanlığının verilerine göre ülkemizde kalın bağırsak (kolorektal) kanseri tüm kanserler içerisinde 3. sırada yer almaktadır. [3] Kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalmaları ile ortaya çıkmakta olan bu hastalıkta, hastaların %40'ında Kirsten sıçan sarkom virüsü(KRAS) onkojeninin 12. ya da 13. kodonunda mutasyon saptanmıştır. KRAS proto-onkojeni, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) sinyalinin *V-raf* fare sarkoma viral onkogen homolog B1 (BRAF) aracılıklı mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal mekanizmasında yer alan bir moleküldür. [4][5] EGFR'nin mutasyonlar yahut fazla ifadesinden dolayı gerçekleşen deregülasyonu birçok kanser türünde gösterilmiştir. Bunların içerisinde yer alan kanser türlerinden biri baş ve boyun kanserlerinin 9/10'undan fazlası, yassı hücreli kanser olarak da adlandırılan skuamöz hücreli karsinomadır. Bir diğer kanser türü de küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (KHDAK). Bu hastaların %85'inde EGFR'nin çok fazla ifade edildiği görülmüştür. Ayrıca bu mutasyonun tümör büyümesi, invazyon, metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ek olarak 19. ve 21. eksonlarda gerçekleşen EGFR'yi aktive edici mutasyonlar neticesinde akciğer kanseri hücrelerinde EGFR sinyalleşmesine bağımlılık sağlandığı gösterilmiştir. Bu nedenle EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ'ler) veya anti-EGFR monoklonal antikorları (mAblar) tarafından EGFR engellenmesi, bu kanser türlerinin tedavisinde önemli rol oynamaktadır. [6]

Bir çeşit rekombinant ve kimerik mAb olan Cetuximab, insan epidermal hücrelerinin ekstrasellüler alanında bulunan EGFR'ye bağlanmaktadır. EGFR'ye rekabetçi bir şekilde bağlanarak, EGFR'nin endojen ligandı ile bağlanmasını bloke eder. Cetuximab, fareye ait değişken (Fab) ve insana ait sabit (Fc) İmmünoglobülin G1 bölgesine sahiptir. Erbitux® markası altında 2004 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. KHDAK tedavisinde kullanılır ve diğer kanser türlerinin tedavisi için de araştırmalar yapılmaktadır. Orijinal Cetuximab patentinin süresi dolduğundan, şu anda piyasada birçok biyo-benzer mAb bulunmaktadır. [7][8][9]

MAblar yüksek özgüllükleri ve etkinlikleri sayesinde tıp, biyoloji, immünoloji alanlarında ve ilgili disiplinlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra kanserler de dâhil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde, monoklonal antikorlara terapötik olarak ihtiyaç duyulmaktadır. [10][11][12]

MAblar memeli hücreler vasıtasıyla üretilmektedirler. Bu hücrelerin proteinlerin ifade edilmesinde ana sistem olarak kullanılmasının temel sebebi, memeli hücrelerin proteinleri

uygun şekilde katlayıp bir araya getirebilmesi ve translasyon sonrası modifikasyonları yapabilmesidir. [13]

İnsan benzeri N-glikozilasyon yapma, yüksek üretim hızına sahip olma ve büyük ölçekli süspansiyon kültürüne uygun olma özellikleri sayesinde bu amaçla sıklıkla kullanılan hücre hattı CHO-K1'dir. [14]Bu sebeple de mAb miktarını artırmak maksadıyla kültür ortamının gereksinimlerini iyileştirmek ve karşılamak için üzerinde en çok çalışılan ve modifiye edilmiş olan hücre hattıdır. Bu hücreler tarafından üretilen mAblar ortama salındığından, üretim aşamasında kullanılan besi yeri formülasyonları büyük önem taşımaktadır. [15]

Hücrelerin enerji ve besin ihtiyaçlarını karşılamak, ortamın pH ve ozmolalitelerini korumak ve hücre döngüsünü düzenleyebilmek için medyum içinde çeşitli bileşikler bulunmaktadır. Tipik bir kültür medyumunda amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar, glikoz ve bunların yanı sıra büyüme faktörleri, hormonlar, bağlanma faktörlerinin kaynağı olarak serum bulunmaktadır. [16] Serum miktarı genellikle medyumun yüzde beş ila onunu teşkil etmektedir. Embriyonik büyüme faktörleri içeriği sebebiyle fetal buzağı serumu (FBS) en etkili takviyelerden biridir. Ancak, kültür ortamında serum kullanımı, çeşitli sorunlara yol açmaktadır. Bu sorunlardan bazıları; lotlar arasında büyümeyi aynı oranda teşvik etmeyi zorlaştıran tutarsızlıklar, kontaminant bulundurma ve bu kontaminantların insanlar tarafından kullanılan son üründe insana bulaşma riski taşıması, besi yerinin toplam maliyetini arttırması ve üretilen mAbların saflaştırılmasını engelleyebilecek yüksek protein içeriğine sahip olmasıdır. [17] Ayrıca, biyofarmasötik endüstrisinde yüksek kalitede saflaştırılmış ve tutarlı ürünlerin üretilebilmesi için düzenleyici ve güvenlik koşullarına uyulması gerekmektedir. Bu sebeple hayvan kaynaklı bileşenlerden kaçınılması gerekir. Bunların yerine kimyasal olarak tanımlanmış ve serum içermeyen medyumlar tercih edilmelidir. Dolayısıyla, serum içeren medyumda büyütülmüş memeli hücrelerinin, genellikle ortamdaki serum konsantrasyonunun aşamalı olarak azaltılmasından ve ticari serum ikameleri, tanımlanmış proteinler veya amino asitler veya eser elementler gibi küçük moleküller ile ek takviyeden oluşan, serumsuz koşullarda kültüre adaptasyon sürecinden geçmesi gerekir. Yine de, hücre büyümesi ve mAb veriminin yanı sıra mAb kalitesi (örneğin glikozilasyon profili) etkilenebileceğinden, serumsuz adaptasyon çok zor ve zaman alıcıdır. Bu aşamada hücre ölümü kaçılmaz bir sorundur ve bu sorun mAb üretiminde azalmaya hatta rekombinant proteinlerin proteolizine yol açmaktadır. [14]

Hücre ölümünün birçok sebebi vardır. Büyük ölçekli kültürlere geçildiğinde bu sebepler genellikle; besin tükenmesi, atık yan ürünlerin medyumda birikmesi, hipoksi ve kültür sırasında dışarıdan gelen sinyallerin hücreleri tetikleyip programlanmış hücre ölümü için kaskadların başlatılmasıdır. Bu olaylar neticesinde hücreler apoptoza uğramaktadır. Apoptozun engellenmesi için birçok araştırmacı çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Bunlardan bazıları besi yerinin belirli zaman aralıkları ile değiştirilmesi, medyuma apoptoz inhibitörlerinin eklenmesi, anti-apoptotik genlerin çok fazla ifade edilmesinin sağlanması ve pro-apoptotik genlerin inhibe edilmesidir. [14]

Apoptoza yol açan doğrudan mekanizmalardan biri mitokondrinin fonksiyonunun bozulmasına ve sitokrom c salınımına neden olan pro-apoptotik genlerdir. *Bcl-2* ile ilişkili X proteini (*Bax*) ve *Bcl-2* Antagonist/Katil 1 proteini(*Bak1*) gibi pro-apoptotik genlerin oligomerizasyonu ve mitokondride porlar oluşturması sonucunda mitokondri geçirgenliği artmakta ve sitokrom c, Smac, AIF ve EndoG gibi apoptojenik faktörler mitokondri dışına geçmektedir. [18] Bu olaylar sonucunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, yüksek miktarlarda mAb üretmek için daha sağlam hücrelere ihtiyaç vardır. Bu nedenle, farklı metodolojiler kullanan birçok araştırmacı tarafından CHO-K1 hücrelerinde *Bax* ve *Bak1* genlerinin çeşitli yöntemlerle inhibisyonu hedeflenmiştir. [19] [20] [21] Bu araştırmacıların bulguları sonucunda hem *Bax* hem de *Bak1* genlerinden yoksun hücrelerin sitokrom c salınımını ve farklı uyaranlara bağlı apoptozu inhibe ettiği ve hücreleri bu uyaranlara dirençli hale getirdiği görülmüştür. [19] [20]

CRISPR/Cas9 plazmidleri genomda kalıcı modifikasyonlar yapabilmek için nükleer lokalizasyon sekansları içermektedir. Bu sayede hücrenin sitoplazmasında üretilen Cas9 nükleazı, hücrenin çekirdeğine gelmektedir. Burada hedef sekansa ait bilgiyi içeren sgRNAlar sayesinde istenen bölgede iki zinciri kesip DNA tekrar birleştirilirken indellerin meydana gelmesi ile çerçeve kayması mutasyonlarına yol açmaktadır. [22]

1.1. Klasik Hücre Hattı Geliştirme Yöntemleri

Hücre kültürü teknolojisinde özellikle son yarım yüzyılda çok önemli gelişmeler yaşanmıştır. Bu gelişmeler sayesinde biyoteknolojiye olan katkıları ile hücre kültürü başlı başına bir alan olarak vazgeçilmez olmuştur. [23] Gelişimi sırasında birçok disiplini çok başarılı bir şekilde bir araya getirmiş ve hücre biyolojisi, genetik mühendisliği, protein üretimi, biyokimya mühendisliği gibi konularda yeni metotların kullanımı ile büyük miktarlarda, kompleks yapılı proteinlerin üretilebilmesini mümkün kılmıştır. [24] [25]

Hücre kültürü teknolojisi sayesinde geliştirilen ürünler günümüzde çok çeşitli alanlarda örneğin önleyici ve terapötik olarak ciddi hastalıkların tedavisinde, görüntülemede tanı amacıyla kullanılmaktadır. Bu ürünlerin güvenli, etkili ve ekonomik olduğu kanıtlanmıştır. Geniş bir pazar ve yüksek bir getiriye sahip olan bu ürünler yılda ortalama 500 kg bir arza ve 1-2 milyar dolarlık bir hasılata sahiptir. [25]

Hücre kültürü teknikleri ilk başta *in vitro* ortamda hücre ve dokuların davranış ve fonksiyonlarını inceleyebilmek için geliştirilmiştir. Hücre kültüründen terapötik amaçlarla istifade edilmesi bu hücrelerin aşı üretiminde kullanılması ile başlamıştır. Kültürlenen hücreler virüs üretimi için başarılı bir şekilde konak olarak kullanılabilmekte olduğundan aşı sektöründe büyük ölçekli üretim için olanak sağlamıştır. [26] [27] [25]

Hücre kültüründe bir sonraki büyük gelişme sürekli hücre hatlarının düzenleyici vasıta olarak kullanımının yaygınlaşması olmuştur. Sürekli hücre hatları sınırsız bölünebilme, daha kolay üretilebilme ve en önemlisi süspanse halde kültürlenebilme özelliklerine sahiptir. Katı bir yüzeye tutunmaya gereksinim duyulmaması kültürün çok daha büyük hacimde yapılabilmesini ve biyoreaktörlerin kullanılabilmesini mümkün kılmıştır. [25]

Genetik mühendisliğindeki gelişmeler ile rekombinant DNA teknolojisinin bu alanda kullanılabilmesi de kültürde üretilebilen ürünlerin sayısını ve çeşitliliğini oldukça artırmıştır. Bu amaçla birçok vektör, hücreler tarafından nativ ve modifiye edilmiş insansı proteinlerin üretilmesi için sıklıkla kullanılmaktadır. Üretim amacıyla kullanılan bu hücreler üzerinde yapılan mühendislik stabilite, etkinlik ve biyolojik aktivite için proteinlerin modifikasyonuna imkan sağlamıştır. Hücre biyolojisi ile biyokimya mühendisliği arasındaki yakın işbirliğinin bir sonucu olarak üstün üretme kabiliyetine sahip hücre hatları artık büyük ölçekli biyoreaktörlerde ve çok yüksek hücre yoğunluklarında yetiştirilebilmektedir. [25]

Kültür için kullanılan medyumların geliştirilmesi ve hücrelerin saklanması teknolojilerindeki ilerlemeler, biyoreaktörlerde çok yüksek hücre yoğunluklarının üretilebilmesini sağlamıştır. Biyoreaktörlerde üretkenliği artırmanın yanı sıra ortamdan serum ve diğer yüksek maliyetli proteinlerin elimine edilmesiyle hücre kültürü işleminin maliyeti önemli ölçüde azaltılmıştır. Artık kimyasal olarak tanımlanmış medyumların kullanımı ile üretilen biyolojiklerin ham maddelerinin güvenliği ve güvenilirliğine önemli ölçüde katkı sağlamıştır. Son olarak, biyoteknolojiden yüksek oranda saflaştırılmış, etkili ve güvenli ürünlerle sonuçlanan verimli ayrıştırma, saflaştırma ve virüs inaktivasyonu yöntemleri için faydalanılmaktadır. [25]

Tablo 1'de hücre biyolojisi alanında yaşanan önemli gelişmeler kronolojik olarak gösterilmektedir.

Tablo 1: Hücre biyolojisi ve hücre kültürü için önem arz eden gelişmelerin zaman çizelgesi

[28] [29] [30]

1665	Robert Hook şişe mantarının "hücreler-cellula" olarak adlandırdığı bölmelerindeki küçük odacıkları tanımlamak için ilkel bir mikroskop kullanmıştır.
1674	Anthony van Leeuwenhoek protozoayı keşfettiğini bildirmiştir. Bundan dokuz yıl sonra ilk defa bakterileri göstermiştir.
1833	Robert Brown orkidelerle ilgili mikroskopla yaptığı çalışmalarını yayınlamıştır. Hücre çekirdeğini açıkça tanımlamıştır.
1839	Matthias Schleiden ve Theodor Schwann çekirdekli hücrenin bitki ve hayvan dokularının temel yapı taşı olduğunu belirterek hücre teorisini önermişlerdir.
1855	Rudolf Virchow dokuların şekillenmesi ile ilgili "*omnis cellula e cellula*" adlı teoriyi önermiştir.
1857	Albert von Kölliker kas hücrelerinde mitokondriyi tanımlamıştır.
1879	Alexander Fleming hayvan hücrelerinde mitoz sırasında oluşan kromozom davranışını büyük bir netlikle tanımlamıştır.
1881	Santiago Felipe Ramon y Cajal ve diğer histologlar sinir hücrelerinin yapısını ve sinir dokusunun organizasyonunu ortaya çıkaran boyama yöntemlerini geliştirmişlerdir.
1885	Wilhelm Roux tarafından ilk kez kullandığı bir metotla tavuk embriyoları tuzlu çözeltide kültürlenmiştir.
1898	Camillo Golgi hücreleri gümüş nitrat ile boyayarak Golgi aygıtını ilk kez görmüş ve tanımlamıştır.
1902	Theodor Boveri eşeyli üreme sırasında kromozom davranışını gözlemleyerek kromozomları ve kalıtımı birbiri ile ilişkilendirmiştir.
1907	Ross Granville Harrison asılı damla (hanging drop) tekniği ile kültürde ilk kez kurbağa embriyolarının sinir lifini *in vitro* olarak üretmiştir.
1910	Alexis Carrel, Montrose Thomas Burrows doku parçalarının eksplantlarının üç aya kadar kültürünü yapmıştır.
1912	Alexis Carrel hücre kültüründe aseptik teknikleri formüle etmiştir.
1916	Francis Peyton Rous ve John Stephen Jones ilk kez tripsinizasyonu ve alt kültür / pasajlama metotlarını tanımlamışlardır.
1920	Avrupa Kimliği Doğrulanmış Hücre Kültürleri Koleksiyonu (ECACC) hücre kültürü korunması amacıyla kurulmuştur.
1925	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre kültürü tekniklerinin değerlendirilmesi amacıyla kurulmuştur.

1925-1926	Thomas Strangeways Pigg Strangeways ve Honor Bridget Fell organ kültüründe *in vitro* farklılaşmayı tarif etmişlerdir.
1920ler-1930lar	Alexis Carrel ve Albert H. Ebeling fibroblastik hücre hatlarının alt kültürünü yapmışlardır.
1930lar	Alexis Carrel ve Charles Lindbergh yeni hücre kültürü aletleri icat etmişlerdir.
1940lar	H. Keilova, C. N. D. Cruickshank ve E. J. L. Lowbury doku kültüründe antibiyotikleri ilk kez kullanmışlardır.
1943	İlk sürekli fare fibroblast hücre hattı (L-hücreleri) kültürü yapılmıştır.
1948	Doku kültüründe ilk kez antibiyotikler kullanılmıştır. Aynı yıl John C. Sanford L hücre hattından 929 klon türetmiştir.
1949	John Franklin Enders ilk kez hücre kültürünü virüs üretmek amacıyla kullanmıştır.
1940lar-1950ler	Hücre kültürü, antikor ve aşı üretimi kültürleri için teknikler geliştirilmiştir.
1950	İlk kez beyin tümörü kültürü *in vitro* olarak yapılmıştır.
1951	George Otto Gey ilk insan hücre hattını geliştirmiştir.
1952	George Palade, Keith Porter, Torgny Sjöstrand birçok hücre içi yapının ilk kez görüntülenebilmesini sağlayan elektron mikroskobu yöntemlerini geliştirmişlerdir. Bu tekniklerin ilk uygulamalarından birinde Andrew Huxley, bir hücre iskeletinin varlığının ilk kanıtı olarak, kasın protein iplikçikleri dizileri içerdiğini göstermiştir. Aynı yıl Henrietta Lacks adlı hastanın serviks kanseri biyopsi örneğinden ilk kez insan tümör hücre hattı "HeLa" adıyla geliştirilmiştir.
1955	Harpy Eagle tarafından mitotik hücrelerin kültürü için Eagle modifiye medyum (MEM) geliştirilmiştir.
1957	David Robertson elektron mikroskobunda ilk defa görüntülenen hücre zarının iki katmanlı yapısını tanımlamıştır.
1960	John Kendrew x-ışını kristalografisini kullanarak ilk ayrıntılı protein yapısını 0,2 nm çözünürlüğüne kadar tanımlamıştır. Max Ferdinand Perutz ise hemoglobin için daha düşük çözünürlüklü bir yapı önermiştir.
1965	Christian de Duve ve arkadaşları peroksizomları, mitokondrileri ve lizozomları bir sıçanın karaciğerinden preparat hazırlarken hücre kesitleme tekniği ile ayırmışlardır. Aynı yılda Leonard Hayflick insan hücrelerinin sınırlı yaşam sürelerinin olduğunu tanımlamış, "Hayflick fenomeni"ni geliştirmiştir.
1968	M. Petran ve arkadaşları ilk konfokal mikroskobu yapmıştır.
1970	Larry Frye ve Michael Edidin plazma zarı moleküllerinin zar düzleminde yayılabileceğini göstermek için floresan antikorlar kullanmış ve bu şekilde hücre zarlarının sıvı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu yılda, Richard H. Kruse laminer akış kabinini üretmiştir.
1974	Elias Lazarides ve Klaus Weber hücre iskeletini boyamak için floresan antikorları kullanmışlardır.
1975	César Milstein ve Georges Köhler ilk hibridoma hücre hattını geliştirmişlerdir.
1976	Hücre hatları için ilk serum içermeyen kültür çalışmaları yapılmıştır.

1983	Genentech hücre kültüründe ilk kez terapötik protein üretmiş ve insan klinik deneylerini gerçekleştirmiştir.
1992	SkinEthic *in vitro* olarak ilk kez insan doku ve nöral kök hücrelerini kültürde üretmiştir.
1994	Martin Chalfie ve arkadaşları canlı hücrelerdeki proteinlerin davranışını takip etmek için yeşil floresan proteinini ilk kez kullanmışlardır. Aynı sene nörobazal medyumu geliştirilmiştir.
1990lar ve 2000ler	Eric Betzig, Stefan W. Hell, William E. Moerner süper çözünürlüklü floresan mikroskopisi için geleneksel ışık veya floresan mikroskopisi ile çözülemeyecek kadar küçük biyolojik moleküllerin gözlemlenmesini sağlayan teknikler geliştirmiştir.
1998	John Gearhart ve James Thomson ilk kez insan embriyo kök hücrelerini izole etmiş ve kültürünü yapmıştır.
2002	Anthony Atala ve Robert Lanza çalışmalarıyla doku mühendisliğine fayda sağlamışlardır.
2003	İnsan beyin tümörlerinde kanser kök hücreleri (CSC) tespit edilmiştir.
2006	Shinya Yamanaka indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (iPS) ilk kez elde etmiştir. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve Epidermal büyüme faktörü (EGF) ile desteklenmiş medyumda ilk kez Glioblastoma multiforme (GBM) CSC kültürü yapılmıştır.
2009	Nöral kök hücreler (NCS) ilk kez gliomada hücre kökeni olarak kullanılmıştır.
2010	Oligodendrosit öncü hücreler (OPC) ilk kez gliomada hücre kökeni olarak kullanılmıştır.
2010lar	Anthony Atala doku ve organların üç boyutlu biyobaskı tekniklerini göstermiştir.
2016	İlk kez OPC medyumunda GBM kültürü yapılmıştır.

1.1.1. Genel Hücre Biyolojisi

1.1.1.1. Hücre

Tüm canlılar hücrelerden meydana gelmektedir. Hücreler içleri kimyasal çözeltilerle dolu, küçük ve zarla çevrilmiş olan yaşam birimleridir. Hücreler yeterli büyüklüğe ulaştığında ikiye bölünerek kendilerinin tıpatıp aynısı birer hücre daha oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Tek hücreli canlılar en basit yaşam biçimlerini temsil etmektedir. Tek hücreli organizmalar aşırı sıcak veya aşırı soğuk arasında uzanan, aerobik ya da anaerobik koşullarda bulunan hatta metan gazı varlığında, yüksek tuz konsantrasyonlarında hayatta kalmayı başarabilen ve bu şekilde yaşamaya adapte olabilen canlılardır. Bazıları da diğer organizmaların içinde yaşamını devam ettirmektedir. Bunun yanı sıra bizim gibi daha yüksek organizmalar tek bir kurucu hücrenin büyüyüp bölünmesi ile türetilmiş hücre topluluklarından oluşmaktadır. Bu organizmalardaki hücreler, organizmanın bir bütün olarak işlev görmesini

sağlamak için birbirleriyle iletişim kurmaktadır. Bir organizmada kontrolsüzce çoğalmaya başlayan hücreler kansere neden olmaktadır. Hücreler birbirlerinden boyut ve şekil olarak farklılık göstermektedir, belirli çözeltilerde serbest olarak, bir yüzeye ya da diğer hücrelere bağlı olarak veya olmayarak yaşayabilmektedir. [29] [31]

1.1.1.2. Hücre Biyolojisi

Hücre biyolojisi tüm canlıların yapı taşı olan hücrelerin yapı ve işlevlerine, nasıl oluştuğuna, nasıl bölündüğüne ve nasıl farklılaşıp özelleştiğine, nasıl birleşip organize olduklarına odaklanan bir biyoloji dalıdır. Tüm hücreler aynı yapı taşlarından oluşur ve hepsi yüksek enerji barındıran bileşikleri üretebilmektedir. Hücreler bu bileşikleri kullanarak büyüyüp, sayıca çoğalabilmektedir. Çevrelerini algılayabilmekte ve bu durumlara tepki verebilmektedir. Tüm canlılar temel olarak üç ana gruba ayrılmaktadır: arkebakteriler, öbakteriler ve ökaryotlar. Bu organizmalar yapısal açıdan birbirlerinden ayrılsalar da hepsi temel yaşam birimi olan hücrelerden oluşmaktadır. Moleküler düzeyde incelendiğinde tüm canlılar aynı elementlerden meydana gelmektedir. Bu molekülleri genetik bilgi depolama, bu bilgiyi çoğaltma, hücresel metabolizmayı oluşturma, moleküler mekanizmaları çalıştırma ve hücresel yapıyı oluşturma amacıyla kullanmaktadır. Böylece tüm canlıların hücrelerinde nükleik asitler, karbonhidratlar, proteinler, yağ asitleri, vitaminler ve mineraller; tek başlarına ya da çeşitli kombinasyonlarda, birçok metabolit ve iyonla birlikte bulunmaktadır. [32] [33]

Tüm hücreler kalıtsal bilgilerini aynı şekilde deoksiribo nükleik asit (DNA) ile doğrusal olarak kodlamaktadır. Bu kalıtsal bilgi, tüm hücrelerde polimerizasyon reaksiyonu ile kopyalanmaktadır. Tüm hücreler DNA'dan protein yapabilmek için gerekli bilgiyi taşıyan kısımları, aynı aracı forma, yani ribonükleik aside (RNA), aktarmakta ve tüm proteinler RNA'dan aynı yolla üretilmektedir. Katalizör olarak tüm hücrelerde proteinler kullanılmaktadır. Her protein kendisine özgü bir gen tarafından kodlanmaktadır. Tüm hücreler besin maddeleri ve atıkların geçişini sağlayan bir plazma zarı içinde bulunmaktadır. Her hücre kullanacağı enerjiyi kendisi üretmektedir. Tüm hücreler aynı temel moleküler yapı taşlarını kullanarak makro molekülleri oluşturmaktadır. [34]

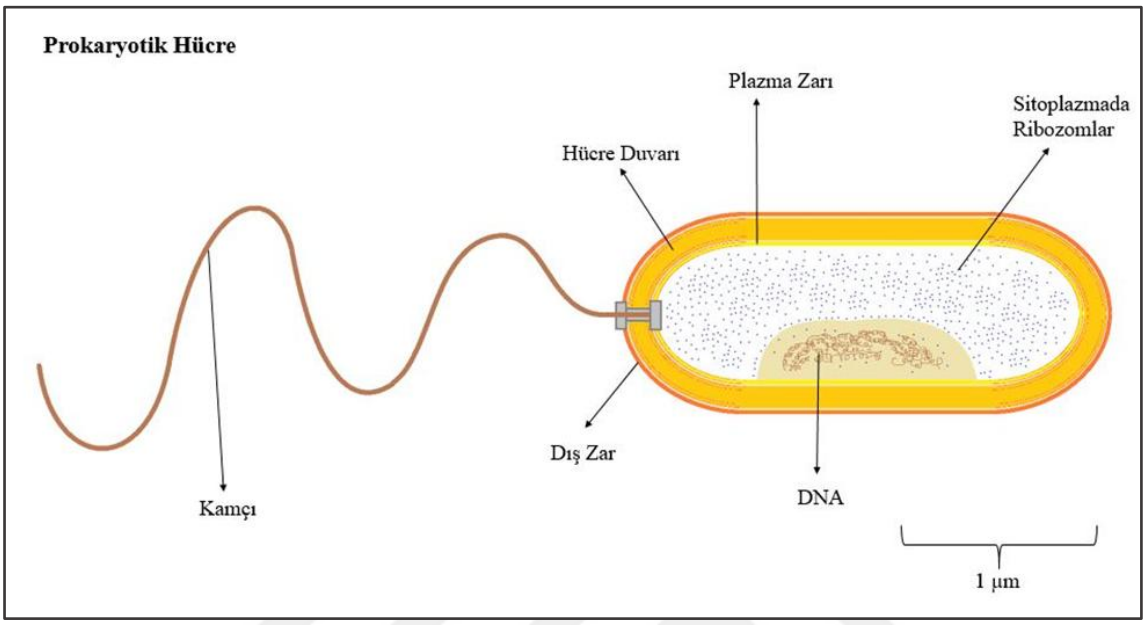
Temelde prokaryot ve ökaryotlar olmak üzere iki çeşit hücre bulunmaktadır. Bu iki temel yaşam formunu birbirinden ayıran hücresel organizasyon ve mimari dikkat çekmektedir. Prokaryotik ve ökaryotik yaşam alanları arasındaki temel farkı gerçek bir çekirdeğin varlığı belirlemektedir. Ökaryotik hücreler, her biri belli bir göreve hizmet edecek şekilde küçük bölümlerden oluşan organellerden meydana gelmektedir. Bu organellerin bir

bütün olarak dağılmadan muhafazasını sağlayan membran sayesinde hem organellerin içindeki ortamın biyokimyasal yapısı sağlanmış olmakta hem de çeşitli biyomoleküllerin erişimi belirli fiziksel sınırlarla düzenlenmiş olmaktadır. [33] Tablo 2, Şekil 1 ve Şekil 2'de prokaryotlarla ökaryotlar karşılaştırılmıştır.

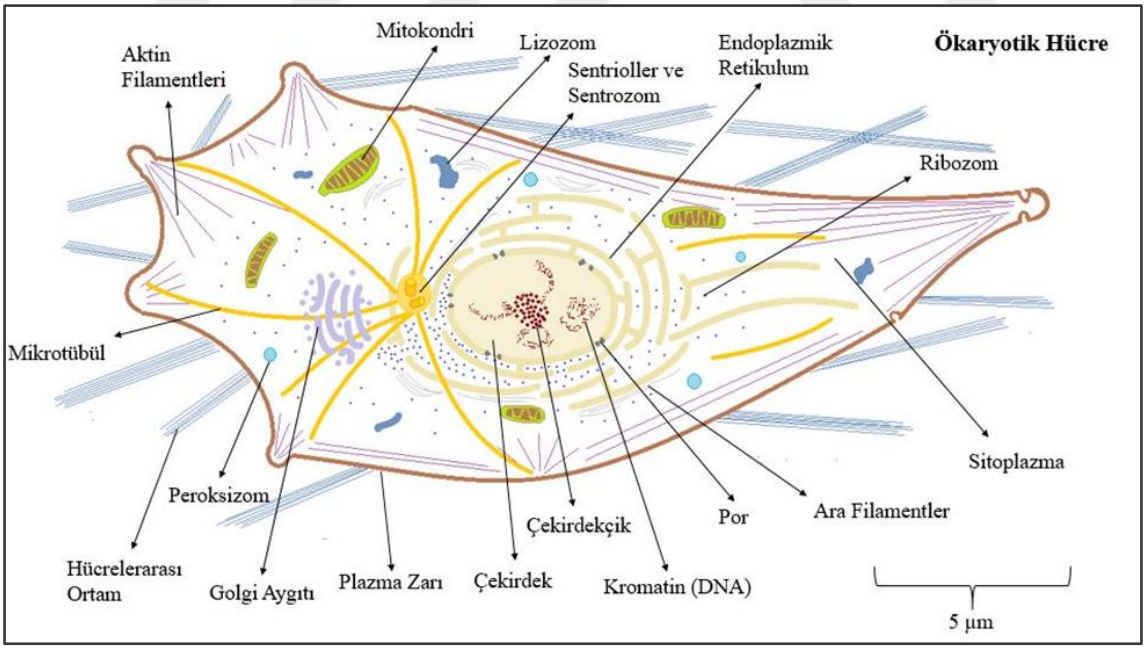
Tablo 2: Prokaryotlar ile ökaryotların karşılaştırılması [35]

Özellikler	**Prokaryotlar**	**Ökaryotlar**
Filogenetik Gruplar	Bakteriler, Arkeler	Algler, Mantarlar, Protozoa, Bitkiler, Hayvanlar
Çekirdek Yapısı ve Fonksiyonu		
Çekirdek Zarı	Yok	Var
Çekirdekçik	Yok	Var
DNA	DNA çıplak halde bulunmaktadır, tek bir kromozomdan oluşur, halkasal şekildedir ve yaklaşık 1-5 x 106 baz çifti büyüklüğündedir	DNA özel proteinlere bağlı halde lineer olarak bulunmaktadır, genellikle 1,5 - 500 x 107baz çifti büyüklüğündedir
Bölünme	Amitoz ile ikiye bölünerek çoğalır	Mitoz, mitotik aygıt ve mikrotübüler iğ iplikleri
Eşeyli Üreme	Miyoz bölünme yoktur, sadece DNA parçalarının transferi (konjugasyon) gerçekleşir	Miyoz bölünme vardır
Genlerde İntron Varlığı	Nadir	Yaygın
Sitoplazmik Yapı ve Organizasyon		
Sitoplazmik Zar		
İç Zarlar		
Ribozom	70S büyüklüğünde	80S, mitokondri ve kloroplasttaki ribozomlar 70S büyüklüğündedir
Zarlı Organeller	Yok	Çekirdek, mitokondri, Golgi aygıtı, endoplazmik retikulum, lizozom gibi belli organeller var
Fotosentetik Pigmentler	Kloroplastları yoktur,	Kloroplastta
Solunum Sistemi	Mezozom adı verilen sitoplazmik membranın özel bir kısmından meydana gelir, mitokondri yoktur	Mitokondride
Hücre Duvarları		
Endosporlar	Var (bazılarında), sıcaklığa çok dayanıklı	Yok
Gaz Vezikülleri	Var (bazılarında)	Yok
Hareket Türleri		
Flagellar Hareket		
Flagellar Olmayan Hareket		

Boyut		
	Genellikle 2µm çapından küçük	Genellikle 2-100 µm çapında veya daha büyük



Şekil 1: Prokaryot hücre yapısı [29]



Şekil 2: Ökaryot hücre yapısı [29]

1.1.1.3. Hücrelerin Kullanım Amaçları

Hücre kültürü gerek hücre biyolojisinde gerek moleküler biyolojide kullanılan ve tercih edilen başlıca araçlardan bir tanesidir. Hücre kültürü, hücrelerin normal koşullardaki

fizyolojisi ve biyokimyasını, ilaçların ve toksik bileşiklerin hücreler üzerinde oluşturduğu etkileri, mutajenez veya karsinojenez uygulamalarını çalışabilmek için oldukça sıklıkla kullanılmaktadır. Bunların dışında hücre kültürü çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen biyo-benzerlerin de üretimi için kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda hücre kültürüne başvurulmasının en büyük getirisi, monoklonal bir hücre grubu kullanılarak elde edilebilecek sonuçların tutarlı ve tekrarlanabilir olmasıdır. Aşağıda hücre kültürünün kullanıldığı bazı alanlarla ilgili örnekler bulunmaktadır.

Model Sistem

Hücre kültürü birçok temel hücre biyolojisi ve biyokimyası çalışmaları için model sistem olarak kullanılmaktadır. Konak hücre ile patojen mikroorganizmalar arasındaki etkileşimleri incelemede, ilaçların hücreler üzerindeki etkilerini araştırmada, yaşlanma sürecini ve hatta yaşlanmayı tetikleyen durumları ortaya çıkarmada hücre kültür çalışmaları sonraki aşamalar için model sistem olarak önem arz etmektedir. Bunların haricinde, kalıtsal bozuklukların ortaya çıkarılmasında da hücre kültürü kullanılmaktadır. [36]

Kanser Araştırmaları

Normal bir hücre ile kanser hücresi arasındaki temel farklar, her iki hücre tipi de laboratuar koşullarında kültürlenebildikleri için, memeli hücre kültürü yöntemleri ile çalışılabilmektedir. Uygun teknikler kullanılarak normal hücreler kanser hücresine dönüştürülebilmektedir. Bu tekniklerden bazıları radyasyon kullanımını, bazıları kimyasal kullanımını ve bazıları da virüslerin kullanımını gerektirmektedir. Böylelikle kansere sebep olan mekanizmalar ve nedenler araştırılabilmektedir. Ayrıca kanserin elimine edilmesi yahut en azından inhibisyonunu sağlamak amacıyla da çeşitli ilaçların seçiminde ve belirlenmesinde hücre kültürü kullanılmaktadır.[38]

Viroloji

Hücre kültürü virolojide sıklıkla tercih edilen ve çok çeşitli uygulamaları olan bir yöntemdir. Hücreler virüsü üretmek için kullanılabildikleri gibi, hangi virüs ile karşı karşıya kalındığının tespit edilmesi için identifikasyon amacıyla da kullanılabilmektedir. Ayrıca virüsleri izole etmek, büyüme ve gelişme döngülerini incelemek ve hücreye nasıl etkilerinin olduğunu gözlemlemek amacıyla da hücre kültürü uygulamaları kullanılmaktadır.[38]

Toksisite Testleri, İlaç Tarama ve Geliştirme

Hayvan hücrelerinin kültürü toksisite testleri, yeni ilaçların veya kozmetik ürünlerin ve bazı kimyasalların hücreler üzerinde nasıl bir etkiye sebep olduğunun incelenmesi için hayvan deneylerinden önce tercih edilen uygulamalardır. Hangi hücre türlerinin hayatta kaldığı, hücrelerin büyüme ve yaşam döngüleri ve bölünme süreleri üzerinde oluşan etkilerin araştırılmasında özellikle karaciğer ve böbrek hücreleri kullanılmaktadır. İlaçların maksimum dozunun belirlenmesi için de toksisite testlerinde hücre kültürü kullanılmaktadır.[38]

Aşı Üretimi

Hücre kültürü daha önce de belirtildiği üzere virüslerin çoğaltılmasına imkân tanımaktadır. Bu sayede üretilen bu virüsler zayıflatılarak birçok virüs kaynaklı hastalığa karşı aşı olarak kullanılabilmektedir. Örneğin çocuk felci, kuduz, suçiçeği, kızamık ve hepatit B gibi ölümcül hastalıklara yönelik aşılar, hayvan hücre kültürü kullanılarak üretilir. Bunun haricinde virüs benzeri partiküller (VLP) de hücre kültüründe üretilip bu amaçla kullanılabilmektedir.[38]

Genetik Olarak Tasarlanmış Protein

Hücre kültürü, bakteriyel kültürlere nazaran, memeli hücrelerin insan benzeri translasyon sonrası modifikasyonlar yapabilmesi sebebiyle birçok rekombinant proteinin üretimi için tercih edilmektedir. Bu sebeple çok çeşitli mAblar, hormonlar terapötik peptitler ve ticari olarak önemli proteinler hücre kültüründe üretilmektedir.[38]

Yedek Doku veya Organ

Kök hücreler birçok hücre tipine dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Bu hücrelerin *in vitro* olarak kültürlenmesi ve gerekli uyaranlarla gelişiminin ve farklılaşmasının sağlanması ile doku ve organlar üretilebilmektedir. Organ kültürü ile ilgili araştırmalar embriyonik ve yetişkin kök hücre kültürüyle yapılmaktadır. Bu tarz hücre kültürleri, normalden farklı olarak, hücrelerin fonksiyonel hücre kümeleri (organoid) halinde organize olmasına izin veren üçboyutlu protein matrisinde gerçekleştirilmektedir.[38]

Genetik Danışmanlık

Hamilelerden elde edilen fetal hücre kültürü, karyotipleme yöntemi ile kromozomlar ve genlerdeki anormallikleri incelemek veya araştırmak amacıyla kullanılmaktadır ve bu bulgular sayesinde fetal bozuklukların erken tespiti yapılabilmektedir.[38]

Genetik mühendisliği

Genetik mühendisliği genomdaki DNA sekanslarının modifikasyonunda kullanılan, moleküler biyolojinin en önemli araçlarından biridir. Bu amaçla birçok yöntem kullanılabilmektedir. Yabancı bir genetik materyalin bir hücre içerisine aktarılmasının sağlanması ile o hücrede yeni genler ifade edilebilmekte, bu genlerin hücreye etkileri gözlemlenebilmektedir. [37] Bunun için kültürlenmiş hayvan hücreleri kullanılmaktadır ve bu hücrelere aktarılacak olan DNA sekansları çeşitli virüsler vektör olarak kullanılarak yahut moleküler yöntemlerle gen sekansının hücre içerisine elektriksel yükle veya lipozomlarla kaplanarak girmesi sağlanmaktadır. Bu sayede bu hücrelerin yeni ve ticari önemi olan rekombinant proteinleri de üretmelerine imkân tanınmış olmaktadır.[38]

Gen tedavisi

Fonksiyonel olmayan genleri tedavi etmek amacıyla bu genlerin bulunduğu hücre kültürlenip, kültürdeki hücrelere fonksiyonel gen sekansının aktarılması sağlanıp, bu geni düzgün bir şekilde ifade eden hücrelerin seçilmesi ve organizmaya tekrar yerleştirilmesi ile hücre kültüründe gen tedavisi *in vitro* olarak gerçekleştirilmektedir. Bir diğer yöntemde de hücreler hala organizmada iken viral vektörler kullanılarak, fonksiyonel gen sekansının hücre içerisine aktarılması ve bu genin organizmanın genomuna entegre edilmesi ile genin ifadesinin sağlanması şeklinde yapılmaktadır. [38]

1.1.2. Hücre Kültürü için Gerekli Koşullar ve Malzemeler

Her hücrenin kültürlenmesi için ihtiyaç duyduğu koşullar birbirinden farklı olmakla beraber tüm hücrelerin temel olarak aminoasitlere, karbonhidratlara, minerallere, büyüme faktörlerine, bazı hormonlara, oksijen ve karbondioksite, belirli bir pH aralığına, uygun ozmotik basınca ve sıcaklığa gereksinimi vardır. Ayrıca hücrelerin nasıl bir kültür ortamında üretileceği, hücrelerin süspanse halde olup olmamasına ya da yapışan kültürde tek tabaka (monolayer) olarak üretilme zorunluluğuna da bağlıdır. [39]

En başından en sonuna doğru değerlendirildiğinde hücrelerin bir dokudan/eksplanttan elde edilmesinden belli bir hücre hattının elde edilmesine kadar birçok aşama bulunmaktadır ve her aşamada gerekli koşullar ve malzemeler lazım olmaktadır. Her adımda steril ve saf bir hücre kültürü için en uygun aseptik teknikler kullanılmalı, hücrelerin en optimal şekilde büyümesi için elverişli koşullar sağlanmalıdır. [40]

1.1.2.1. Ekipmanlar

Her laboratuarda olduğu gibi hücre kültürü laboratuarında da bir takım donanıma ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ekipmanlar temel hücre kültürü prosedürlerini uygulayabilmek için gerekli olan temel bileşikler ve önemli malzemelerden oluşmaktadır. Bunlardan bahsedecek olursak, bir hücre kültürü laboratuarında dikey akış kabini, CO_2'li etüv, ters (inverted) mikroskop, santrifüj, su banyosu, soğutucu ve dondurucu dolaplar, otoklav, hemositometre, pipetler, pipet uçları, hücre kültürü için kullanılan şişeler ve plakalar, petri kapları ve santrifüj tüpleri ile sarf malzemeleri ve kimyasallar mutlaka bulunmalıdır. Bunların haricinde de çeşitli aletlerin ve malzemelerin kullanıldığı durumlar olabilmektedir.

1.1.2.2. Dikey akış kabini

Dikey akış kabinleri hücre kültürü için oluşturulan çalışma alanının aseptik bir ortama dönüştürülmesini sağlamaktadır. Dikey akışın olduğu alan içerisine dışarıdan kontamine edici herhangi bir madde veya mikroorganizmanın girmesi, çalışma alanı içerisindeki herhangi bir mikroorganizma yahut gazlı çözeltilerin ve aerosollerin de alan dışına çıkması engellenmektedir. Yapılan araştırmaların ve klinik çalışmaların mahiyetine göre geliştirilmiş üç çeşit dikey akış kabini bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III dikey akış kabinleri olarak adlandırılmaktadır.

Sınıf I dikey akış kabinlerinde laboratuar personeli ve çevre korunmakta iken, çalışılan kültürlerin çevredeki bulaş kaynaklarından korunması garanti edilememektedir. Bu tür kabinler genel itibariyle hava akış karakteristiği olarak ve tasarımları ile çeker ocağa benzemektedir.

Sınıf II dikey akış kabinleri biyogüvenlik seviyesi 1, 2 ve 3 dâhilinde olan materyaller ile çalışmak için ve hücre kültürü için gerekli olan aseptik ortamın sağlanması amacıyla tasarlanmıştır. Sınıf II kabinler potansiyel olarak zararlı materyallerin çalışılmasına olanak sağlamaktadır.

Sınıf III dikey akış kabinleri çalışan personel ve çevre için en yüksek seviyede koruma sağlamaktadır. Bu kabinlerde gaz sızdırma engellenmiştir. Bilinen insan patojenleri ve biyogüvenlik seviyesi 4 dâhilinde olan materyaller üzerine yapılacak çalışmalar için bu kabinler tasarlanmıştır. [41]

Dikey akış kabini en az bir kişinin rahatlıkla çalışabilmesine imkân verecek büyüklükte, içeriden ve dışarıdan kolaylıkla temizlenebilir, yeterli aydınlatmaya sahip ve

kullanımı rahat olmalıdır. Kabin içinde çalışırken alan temiz ve düzenli tutulmalıdır. Mümkün oldukça her şey görüş alanı içinde ve araştırmacı hangi elini dominant olarak kullanıyorsa ona uygun şekilde yerleştirilmiş olmalıdır. Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce, çalışma esnasında ve çalışma bittikten sonra kabin ve kabine alınacak her şey %70 etanol çözeltisi püskürtülerek ve silinerek dezenfekte edilmelidir (Şekil 3).



Şekil 3: Her şeyin görüş alanında ve kullanım kolaylığına göre yerleştirilmişin olduğu kabin gösterilmektedir.

1.1.2.3. CO_2'li Etüv

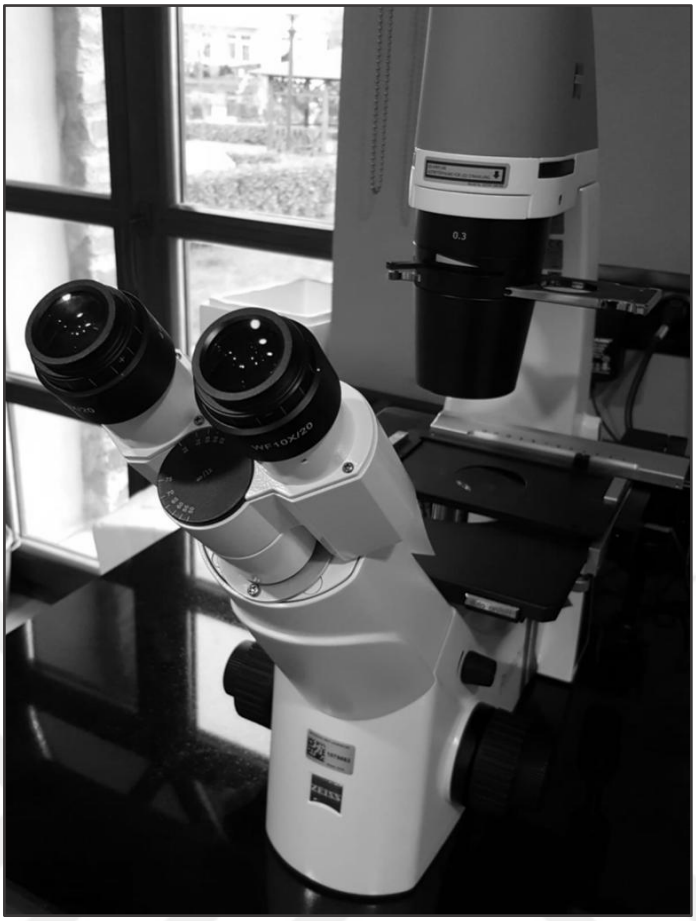
Bir canlıya ait hücrelerin, o canlının vücut sıcaklığı, nem oranı, pH dengesi ve oksijen miktarı ile doğrudan ilişkisi bulunmaktadır. Hücrelerin laboratuar koşullarında ait olduğu canlıya has bu özellikleri taklit ederek yaşamasını mümkün kılan ortam, etüv sayesinde sağlanmaktadır. Etüv ile gerekli sıcaklık, pH aralığı, nem oranı belirli bir seviyede tutulmaktadır. Hücre kültürlerinde genellikle 37°C sıcaklık, %5 CO_2 ve %5 nem oranı tercih edilmektedir (Şekil 4).



Şekil 4: CO_2'li hücre kültürü etüvü

1.1.2.4. Ters (inverted) Mikroskop

Ters mikroskop, adından da anlaşılacağı üzere, mekanizma olarak ışık mikroskobunun ters döndürülmüş hali gibidir. Ters mikroskopta incelenmek istenen örnek tablaya yerleştirildikten sonra ışık, ışık mikroskobunun aksine, yukarıdan gelir ve objektifler tablanın altında olduğu için okülere gelen görüntü örneğin altından görünen kısmının görüntüsüdür. Hücre kültürü şişeleri, çok kuyulu plakalar ve petri kapları bu mikroskopla rahatlıkla incelebilmektedir (Şekil 5). Ters mikroskop asiditesi yüksek olan sıvıların içindeki örnekleri ya da kaynayan sıvıların içindeki örnekleri rahatlıkla inceleyebilmek için 1850 senesinde Tulane Üniversitesi öğretim üyesi olan J. Lawrence Smith tarafından icat edilmiştir. [42]



Şekil 5:Ters mikroskop

1.1.2.5. Güvenlik

Deneylerde kullanılacak her türlü malzemenin, örneklerin, çalışanların ve çevrenin güvenliğinin sağlanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılacak malzemelerin güvenlik bilgi formlarında yer alan erime noktası, kaynama noktası, parlama noktası gibi fiziksel verileri, toksisite değerleri, reaktivitesi, sağlığa etkileri, depolanması ve itlafı hakkında bilgilere uygun şekilde hareket edilmeli, koruyucu donanım ve herhangi bir istenmeyen durum oluştuğunda izlenmesi gereken prosedürler uygulanmalıdır.

Tüm ekipmanın güvenliğinin sağlanması için ayrıca birincil olarak gereksiz malzeme kullanımından kaçınılmalı, mikroskopların ve güvenlik kabinlerinin temiz kalmaları için kullanılmayacakları zaman kılıfları ve/veya kapakları üzerlerine kapatılmalı, işe başlamadan ve iş bittikten sonra çalışılan alan ve malzemeler %70 etil alkol solüsyonu ile temizlenmeli, çalışan kişiler gerekli durumlarda eldiven ve önlük başta olmak üzere kişisel koruyucu ekipman kullanmalıdır. [39]

1.1.2.6. Aseptik Teknikler

Hücrelerin uzun süre kültürlenebilmeleri için olası kontaminasyon ve potansiyel hücre kayıplarının önüne geçilmesi adına aseptik tekniklerin kullanılması gerekmektedir. Araştırmacı deneylerinde kullanacağı materyalin potansiyel olarak bulaş riski taşıdığını bilmeli ve buna uygun şekilde önlemler alarak hareket etmelidir. Hücre kültürü yapılırken her zaman steril eldivenler kullanılmalı, laboratuar önlüğü giyilmelidir. Kabin içerisinde çalışırken minimum seviyede hareket ile maksimum miktarda işin yapılması önemlidir. Bu sebeple her malzemenin kullanış sıklığına göre çalışma alanına en yakın yerden başlayarak yerleştirilmesi, çalışan kişi hangi elini dominant olarak kullanıyor ise buna göre ortamın organize edilmesi deney koşullarını iyileştirmektedir.

Deney esnasında ihtiyaç duyulacak sarf malzemeler, cam ve metal materyaller mutlaka otoklavlanarak sterilize edilmiş ve kurutulmuş olmalıdır. Kullanılacak materyaller kabin içine alınırken %70 etil alkol solüsyonu ile dezenfekte edilmelidir. Eğer mümkünse tek kullanımlık steril malzeme kullanılmalı ya da metal enstrümanlar alevden geçirilerek sterilize edildikten sonra kullanılmalıdır. Deneye başlamadan bir müddet önce kabin açılarak çalıştırılmalı ve içeride devinim yapan havanın HEPA filtreler vasıtası ile temizlenmesi beklenmelidir. İşlemlere başlamadan önce ve işlemleri bitirdikten sonra ortam %70 etil alkol solüsyonu ile temizlenmelidir. Çöpe atılacak sarflar (pipet uçları, mikrosantrifüj tüpleri vb.) %1 çamaşır suyu solüsyonunda bekletilmelidir. Kabin kapatıldıktan sonra ultraviyole ışık açılarak ortamın sterilizasyonu sağlanmalıdır.

Kullanılacak medyum 0,22 μm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmelidir. Sterilizasyondan emin olmak için medyum bir gece 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübe edilmeli ve üremenin olmadığı teyit edilmelidir. Herhangi bir bulaş riski tekrar göz önünde bulundurularak medyuma Penisilin, Streptomisin gibi antibiyotikler ve/veya Amfoterisin B gibi antifungaller belirli miktarlarda eklenmelidir. Hücre kültürü şişelerinin başta olmak üzere, tüm malzemelerin (medyum, FBS vb) kapakları sadece kabin içerisinde açılıp kapatılmalıdır ve etüv içerisinde hava geçişini sağlamak için hücre kültürü şişelerinde filtreli kapaklar tercih edilmelidir. Etüv sadece hücre kültürü amacıyla kullanılmalı ve periyodik olarak sterilize edilmelidir. [43]

1.1.2.7. Kültür Medyası

Yapay bir ortamda hücrelerin hayatta kalmalarını ve büyümelerini desteklemek amacıyla kullanılan herhangi bir jelöz ya da sıvıya, besi ortamı veya kültür medyumu

denmektedir. Hücrelerin büyüyüp çoğalabilmesi, içinde bulundukları ve tüm ihtiyaçlarını karşılayabildikleri kültür medyumu ile doğrudan ilişkilidir. Tamamen doğal olan, ticari olarak satılan veya laboratuarlarda yapılabilen birçok kültür medyumu mevcuttur. Araştırmacı kullandığı hücre hattına en uygun medyumu seçerek deneylerine devam etmelidir. Bu sebeple deneme yanılma yöntemi ile eklemeler ve çıkarmalar yaparak, kullanılacak hücre hattı için optimum medyum elde edilebilir.

Ticari olarak satılan medyumlar steril, kullanıma hazır ve hücre hatlarına uyarlanmış oldukları için avantajlı, yüksek maliyetli oldukları için de dezavantajlıdırlar. Bunlardan kimyasal olarak tanımlanmış medyumlar toz halinde veya sıvı halde mevcut bulunmaktadır. Bunların haricinde laboratuar koşullarında da medyum hazırlanabilmektedir. Bu seçenekler diğerlerinden maliyet olarak düşük olsa da hazırlanış esnasında çok fazla zaman almaktadır.

Toz halinde satın alınan medyumların hazırlanması için iki veya üç kez arıtılmış su ya da kültür için uygun özelliklere sahip su kullanılmalıdır. Gerekli eklemeler yapıldıktan sonra pH ayarlaması yapılmalıdır. Genel olarak birçok memeli hücre için en uygun pH 7.2 ila 7.4 aralığındadır. Bikarbonat tamponu ve HEPES pH dalgalanmalarının önüne geçmek amacıyla en çok tercih edilen tamponlardır. Filtre sterilizasyonu pH derecesini düşüreceği için, pH birkaç derece yüksek ayarlanmalıdır. Sıvı haldeki medyum filtreden geçirilip sterilize edildikten sonra 4°C'de muhafaza edilmeli ve bir ay içerisinde bitirilmelidir. Tablo 3'te kültür için kullanılan medyum çeşitleri listelenmiştir.

Tablo 3: Hayvan hücre kültürü için kullanılan medyumlar [44]

Doğal Medya	Plazma, serum ve embriyo ekstraktı gibi doğal biyolojik içeriklerden meydana gelmektedir. Hayvan hücre kültüründe çok geniş bir kullanım alanı vardır. Aynı koşulların sağlanması ve aynı kalitede medyum üretimi konusunda yaşanan problemler bu tür medyumların en büyük dezavantajıdır.	Koagülan veya pıhtı
		Doku özütleri
		Biyolojik sıvılar
Sentetik Medya	Organik ve inorganik besinlerin, vitaminlerin, minerallerin, amino asitlerin, karbonhidratların,	Serum içeren medyumlar

	kofaktörlerin, geçiş metallerinin, pH ve tuz tamponlarının eklenmesi ile yapay yolla elde edilen medyumlardır.	Serum içermeyen medyumlar
		Zeno-içermeyen medyumlar
		Protein içermeyen medyumlar
		Kimyasal olarak tanımlanmış medyumlar

Hücre kültürü için en sık tercih edilen temel medyumlar şunlardır: Eagle minimal essential medium (MEM) ve Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) (Tablo 4). Bu medyumlarda amino asitler, vitaminler, mineraller, glikoz, inorganik tuzlar ve bazı besin maddeleri bulunmaktadır. Hücrenin proteinlerini üretebilmesi için esansiyel olan ve olmayan amino asitlere, hücresel büyümeye yardımcı olan vitaminlere, enerji kaynağı olarak karbonhidratlara, membran yapısının iyonik potansiyeli ve ozmolalite düzenlemesi için inorganik tuzlara, hücre fonksiyonlarının ve büyümenin düzenlenmesi için hormonlara, pH düzenlemesi için tamponlara, kontaminasyona engel olmak için antibiyotiklere ihtiyaç duyulmaktadır. [45] Temel medyumların kültür için aseptik koşullarda gerekli eklemeler yapılarak, L-glutamin, antibiyotikler ve serum gibi takviyelerle tam medyum (complete medium) haline getirilmesi sağlanmaktadır.

Tablo 4: Hücre kültüründe kullanılan bazı medyumlar

DMEM	DMEM çok çeşitli memeli hücresinin büyümesini desteklemek amacıyla sıklıkla kullanılan bazal bir medyumdur. Fibroblastlar, nöronlar, glial hücreleri, düz kas hücreleri ve birçok hücre hattı bu medyum ile kültürlenebilmektedir. DMEM'in, modifikasyonları ile kullanım yelpazesi daha da genişlemektedir. DMEM protein, lipit veya büyüme faktörleri içermemektedir. [180]
RPMI 1640	Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC), astrositler, karsinomlar ve birçok hücre hattı için uygun bir medyumdur. RPMI 1640'ı diğer medyumlardan ayıran bazı faktörler bulunmaktadır; indirgeyici bir ajan olan glutatyon bulundurması, yüksek konsantrasyonlarda vitamin içermesi bunlardandır. Ayrıca DMEM'de bulunmayan biyotin, B12 vitamini ve PABA da bu medyumu farklı kılmaktadır. [181]
EX-CELL CD Hybridoma	Kimyasal olarak tanımlanmış olan EX-CELL CD Hybridoma medyumu tek tip ve her lotta ürün tutarlılığını sağlayan bir medyumdur. Hayvansal içerik bulundurmayan bir medyum olduğu için monoklonal antikor üretimi amacıyla yaygın olarak tercih edilmektedir. Hücreler, serum destekli kültürlerden bu ortama çok az veya hiç adaptasyon aşaması olmaksızın başarılı bir şekilde transfer edilebilmektedir. [182]

Serum, hücreler için büyüme faktörleri ve inhibitörleri, hormonları, proteaz inhibitörlerini, şelatörleri, amino asitleri, karbonhidratları, lipitleri, vitaminleri, eser elementleri, mineralleri ve hücresel büyüme için gerekli olan daha birçok molekülü içermektedir. FBS kültürde yaygın olarak kullanılan bir serum çeşididir.

[45] Ayrıca at serumu ve insan serumu da kullanıldığı gibi, bazı hücre hatları için serum içermeyen medyum kullanılmaktadır. [46] Tam medyumlar genellikle %5-30 arasında serum içermektedir. Medyaya eklenen serum miktarı, hücrenin ihtiyaçlarına bağlı olarak değişmektedir. Serum satın alındığında soğuk zincir ile getirilmeli, donuk halde olmalıdır, -20°'de muhafaza edilmelidir. Kullanılacağı zaman 4°C'de çözdürülmeli, 55-65°C arasında yarım saat ısı inaktivasyonu akabinde 37°C sıcaklığa geldikten sonra kullanılmalıdır. Kontaminasyon riski göz önünde bulundurularak ve daha uzun süre kullanabilmek için ihtiyaç duyulmayan kısmı 50 mL hacmindeki santrifüj tüplerine alikotlanarak tekrar kullanıncaya kadar -20°C'de saklanmalıdır. [43]

Serum kullanımının hücre kültürü için avantajları kadar dezavantajları da bulunmaktadır. Geniş bir çerçevede bakıldığında her lotta farklı bileşenler içeren, nitelik ve nicelik açısından farklılıkları bulunan, ürünlerin saflaştırılmasında problem oluşturabilecek çeşitli proteinleri barındıran, hücrelerin birbirleri, içinde bulundukları ortam ve medyum ile ilişkilerini içeriğindeki hormonlar ve büyüme faktörleri ile göz ardı edilemeyecek bir şekilde etkileyen, hayvansal kaynaklı kontaminasyona açık bir kapı bırakan ve bu kontaminantların son ürünle birlikte insanlara bulaşmasına sebep olma potansiyeli bulunan ve en önemlisi yüksek maliyetlerle elde edilen serumun sanayide kullanımı ciddi bir endişe kaynağı olmaktadır. [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53]

Endüstrinin en temel ilkelerinden biri üretimin verimini artırırken maliyeti azaltmak ve bu sayede kar elde etmektir. Maliyeti artıran herhangi bir ürünün ikamesi bulunmalı veya eğer yapılabiliyorsa tamamen kullanımı bırakılmalıdır. İlaç endüstrisinde de bu amaç güdülerek çalışmalar yapılmaktadır. [54]

Sanayinin bir diğer önemli ilkesi de ürünün üretiminin planlanabilen, güvenilir ve belirli bir standarda sahip olmasıdır. Bunu farmasötik endüstrisine uyarladığımızda monoklonal antikorların üretilebilmesi açısından hücre kültürünün devamlılığı, üretkenliği ve güvenliği düzenleyici kuruluşların denetiminden geçebilecek optimum şekilde sağlanmalıdır. [52]

Üretilen bir mAbın herhangi bir hayvansal kaynaklı bileşen içermemesi çok mühimdir. Günümüzde serum, hayvansal bileşen ve protein içermeyen hücre kültürü yöntemleri tercih edilmektedir. Bu tür bir kültür yapabilmek için hücrelerin yeni kültür koşullarına adapte edilmesi gerekmektedir. Bu sayede maliyetler azaltılmış, ürünün

kontaminasyon riski en aza indirilerek güvenliği sağlanmış, son ürünün insan kullanımına uygun hale getirilmesi garanti altına alınmış olmaktadır. [55] [25] [56] [53]

1.1.2.8. Antibiyotikler ve Fungisitler

Hücre kültüründe olası bir bakteriyel ya da fungal kontaminasyonu engellemek için rutin olarak kullanılan antibiyotikler ve antimikotikler ile bunların çalışma konsantrasyonları aşağıdaki listede (Tablo 5) gösterilmektedir.

Tablo 5: Memeli hücre kültürü için kullanılan antibiyotik ve fungisit konsantrasyonları [57]

Antibiyotik	Tavsiye edilen konsantrasyon	Antibiyotik spektrumu	37°C'de kültür medyumundaki stabilitesi
Anti-PPLO Agent Tylosin	10 – 100 µg/ml	Mikoplazma ve gram pozitif bakteriler	3 gün
Amphotericin B	0.25 – 2,5 µg/ml	Mayalar ve küf mantarları	3 gün
Gentamicin Sulfate	5 – 50 µg/ml	Gram pozitif ve gram negatif bakteriler ve mikoplazma	5 gün
Kanamycin Sulfate	100 µg/ml	Gram pozitif ve gram negatif bakteriler ve mikoplazma	5 gün
Neomycin Sulfate	50 µg/ml	Gram pozitif ve gram negatif bakteriler	5 gün
Nystatin	100 U/ml	Mayalar ve küf mantarları	3 gün
Penicillin G	50 – 100 U/ml	Gram pozitif bakteriler	3 gün
Polymyxin B Sulfate	100 U/ml	Gram negatif bakteriler	5 gün
Streptomycin Sulfate	50 – 100 µg/ml	Gram pozitif ve gram negatif bakteriler	3 gün

1.1.3. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, bir canlıdan hücrelerin elde edilmesi ve uygun bir yapay ortamda büyütülmesi anlamına gelmektedir. Hücreler, kültürden önce doğrudan dokudan çıkarılıp,

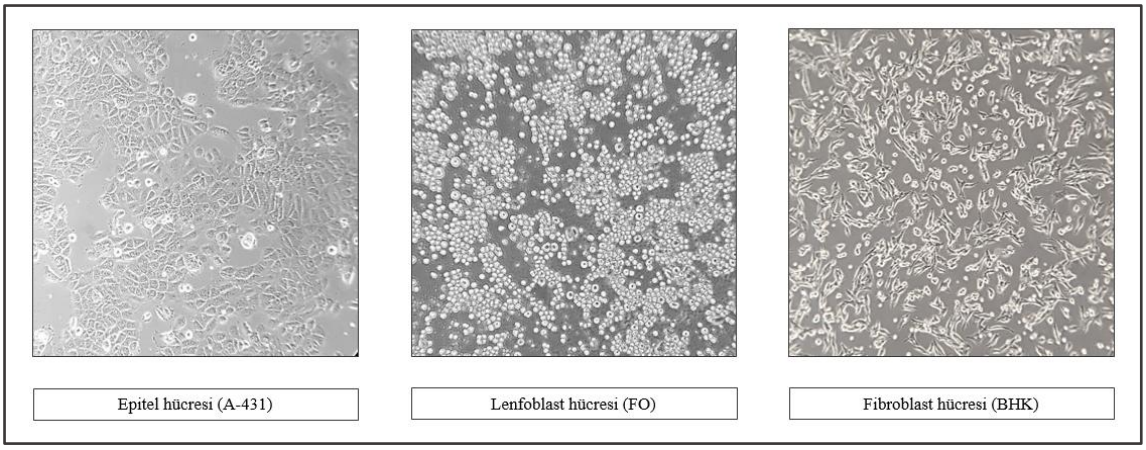
enzimatik veya mekanik yollarla ayrıştırılabilmektedir. Ayrıca hâlihazırda ticari olarak satın alınabilen bir hücre hattından veya hücre türünden türetilebilmektedir.

1.1.3.1. Birincil Hücre Kültürleri

Birincil kültürler dokulardan enzimatik ayrıştırma neticesinde doğrudan veya eksplant olarak adlandırılan doku parçalarından elde edilmiş olan hücrelerdir. Bu tür kültürler *in vitro* olarak ait oldukları dokunun hücre yapısını olduğu gibi yansıtması ve hücrenin tabii aktivitesini gerçekçi bir şekilde göstermesi açısından çalışmalarda öncelikli olarak tercih edilmektedir.

Fakat birincil kültürlerin birkaç dezavantajı bulunmaktadır. Bunlardan bahsedecek olursak, bu kültürler için hücre izolasyonu ciddi bir iş yükü oluşturmakta olup sıklıkla heterojen hücre popülasyonları üreyebilmektedir. Ayrıca birincil kültürlerin nispeten çok kısa bir yaşam süresi olması sebebiyle kültürün çok kısıtlı bir zamana sıkıştırılması gerekmektedir.

Birincil kültürler çok çeşitli dokulardan elde edilebilmektedir ve izole edilen hücre tipi, kaynak doku tarafından belirlenmektedir. Genel olarak kültürde üretilen hücreler morfolojilerine göre üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar; fibroblastik hücreler, epitel hücreleri ve lenfoblast hücreleridir. [58] Kan damarlarından elde edilebilen endotel hücreleri ve düz kas hücreleri morfoloji ve işlev açısından farklıdır ve genellikle endotel hücreleri tek bir tek tabaka olarak, bir parke taşı morfolojisi ile karakterize edilir. Düz kas hücreleri ise her iki ucunda iğ benzeri çıkıntılarla uzar ve kültürde tutulduğunda bile katmanlar halinde büyür. Bu hücre tiplerinin dışında çeşitli dokulardan türetilen ve yaygın olarak kullanılan birkaç başka birincil kültür bulunmaktadır, bunların bazıları bağ dokusundan elde edilen fibroblastlar, kandan ayrıştırılan lenfositler, sinir dokularından kaynak alan nöronlar ve karaciğer dokusundan alınan hepatositlerdir. [59] Şekil 6'da hücrelerin morfolojik görüntüleri bulunmaktadır.



Şekil 6: Morfolojilerine göre hücreler.

Solda epitel hücresini temsilen A-431 hücre hattı, ortada lenfoblast hücresini temsilen FO hücre hattı, sağda fibroblast hücresini temsilen BHK hücre hattı görülmektedir.

1.1.3.2. Sürekli Hücre Hatları

Hücre hatları, sınırsız bölünme yeteneği kazanmış tek bir hücre tipinden oluşmaktadır. Hücrelerin bu yeteneği kazanması genellikle, kanserojenlerle tedaviyi veya virüslere maruz kalmayı içeren çeşitli yollardan biriyle hücrelerin transforme edilmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Bu muameleler, hücrelerin bölünmeyi düzenleme yeteneklerini kaybetmelerine neden olmaktadır. Sonuç olarak, transforme edilmiş olan hücreler sürekli bölünmekte ve birincil kültürün aksine sonsuz bir ömre sahip ("ölümsüzleşerek") olmaktadır.

Bu işlemlerin en önemli dezavantajı, transforme edilmiş olan hücrelerin genellikle orijinal *in vitro* özelliklerinden bazılarını kaybetmesidir. Örneğin, günümüzde var olan belirli hücre hatları, belirli dokuya özgü genleri ifade etmemektedir. Bunun iyi bir örneği, karaciğer hücre hatlarının pıhtılaşma faktörleri üretememesidir.

Bununla birlikte, sürekli hücre hatları, özellikle ölümsüzleştirildikleri için, birincil kültürlere göre çeşitli avantajlara sahiptir. Bu hücreler büyüme için daha az seruma ihtiyaç duymakta olup, daha kısa iki katına çıkma süresine sahiptirler ve hücre kültürü şişesinin yüzeyine tutunmaya veya yapışmaya gerek duymadan büyüyebilmektedirler. Hâlihazırda çeşitli hücre bankalarında birçok farklı hücre hattı mevcut bulunmaktadır, bu da bu hücreleri üretmeye gerek kalmadan elde etmeyi kolaylaştırmaktadır.

1.1.3.3. Alt Kültür

Hücre hatları tek kültürde sonsuza kadar tutulamamaktadır. Bunun en mühim sebepleri hücrelerin büyüyüp bölünebilmek için medyum içindeki besin maddelerinin kullanımı ile

birlikte toksik metabolitlerin kademeli olarak artmasıdır. Besin maddeleri yetersiz kaldığında ve/veya toksik yan ürünlerin seviyesi arttığında inkübasyonu devam eden hücreler durağan faza geçmektedir. Bu fazda iken proliferasyon oldukça azalmakta ya da durmaktadır. [60] Eğer bu aşamadaki hücreler taze medyuma alınırsa, besinler hücrenin tekrardan büyümesini ve bölünmesini teşvik etmektedir ve bu sayede hücre bu yeni medyuma alışıp büyüme hızını artırarak bir sonraki faza geçmeye hazırlanmaktadır. En sonunda da hücrelerin bölünme hızı logaritmik faza çıkıp hücreler logaritmik olarak bölünmektedir. [39]

Alt kültüre başlanırken bu nedenle başlangıç kültüründen daha az yoğunlukta hücre kullanılmaktadır. Ayriyeten hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyüyebilmeleri için besi yerinin taze olması, pH değerinin belirli aralıkta olması ve hücrelerin metabolizması için gerekli besinleri içermesi gerekmektedir. [61] [62] Buna ek olarak memeli hücre hatlarında zaman içerisinde kromozomal anormallikler artış gösterebildiği için hücrelerin kültürde kaldıkları zaman boyunca sahip oldukları bölünme sayısını her pasajda ya da alt kültür işlemi sonrasında kaydetmek önemlidir. Buna pasaj numarası adı verilmektedir. [60]

Alt kültür işlemi belli bir hacimdeki bir kültürden eşit hacimli taze medyuma geçiş ile yapılmaktadır. Bu sayede hücre hattı uzun bir süre korunabilmektedir. Endüstriyel skalada bir üretim için yahut bilimsel bir deneyde kullanmak amacıyla çok fazla sayıda hücreye ihtiyaç duyulduğunda daha büyük hacme sahip olan bir büyüme ortamına alt kültür yapılmaktadır. [60]

1.1.3.4. Yapışan Kültür ile Süspansiyon Kültürü

Günümüzde kullanılan birçok hücre kültür tekniği bulunmaktadır. Genel olarak bakıldığında *in vitro* hücre kültür teknikleri yapışan kültür ve süspansiyon kültürü olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yapışan hücre kültürleri, birincil hücre kültüründe hücrelerin katı bir desteğe bağlanıp çoğalabildikleri kültürlerdir. Hücrelerin bağlanabilmeleri için hücre kültür şişesinin tabanı özel bir tür substrat ile kaplanmaktadır. Bu yüzey üzerinde hücreler tek tabaka oluşturacak şekilde bölünüp çoğalmaktadır.

Fakat hücreler kültür şişesinin tüm yüzeyini kapladıktan sonra daha fazla yer kalmadığı için alt kültür yapılması gerekmektedir. Hücrelerin kültür şişesinin yüzeyinden kaldırılabilmesi için iki yöntem kullanılmaktadır. Mekanik yöntem olarak adlandırılan ilk yöntemde hücrelerin kültür şişesinin tabanından ayrılmalarını sağlamak için fiziksel bir güç uygulanmaktadır. Bu amaçla spatula veya kazıyıcılar kullanılmaktadır. Her ne kadar dikkatli ve nazik olunursa olunsun, bu yöntem ile kap tabanından kaldırılan hücrelerin büyük

çoğunluğu canlılığını kaybetmektedir. Bu sebeple diğer bir yöntem olan kimyasal metot daha sık kullanılmaktadır. Tripsin adlı proteolitik enzim ile hücrelerin kap tabanına yapışmasını sağlayan proteinler yıkılarak tabandan ayrılmalarını sağlayan tripsinizasyon işlemi sayesinde hücrelerin canlılığı korunmaktadır.

Süspansiyon kültürü ise hücrelerin sıvı ortamda herhangi katı bir yüzeye bağlanma zorunluluğu olmadan çoğalabildikleri kültürlerdir. Hücreler sıvı besi yeri içerisinde oldukları için serbest halde yüzmekte ve çoğaldıkça agregalar haline gelmektedir. Hücrelerin pasajlanması için süspansiyon kültürünün gerekli medyum ile seyreltilmesi yeterli olmaktadır. Süspansiyon kültürü ticari amaçlı büyük hacimli kültürlerde vazgeçilmez bir yöntemdir. Hücrelerin yeterli gaz alışverişi ve besin alımı yapabilmesi için kültür şişelerinin, hücrelere mekanik olarak zarar vermeyecek bir hızda çalkalanması gerekmektedir.

1.1.3.5. Hücre Sayımı

Hücrelerin sağlıklı bir şekilde çoğalabilmesi ve uygun bir biçimde stoklanabilmesi için pasajlanmadan önce sayılması gerekmektedir. Bu amaçla birçok boyama ve hücre sayım yöntemi kullanılmaktadır. Hücre kültürü laboratuarında en çok kullanılan yöntem hemositometre ile hücrelerin sayılmasıdır. Bu yöntemde de en çok kullanılan boyama yöntemi Trypan mavisi ile boyamadır. Trypan mavisi canlı hücreleri boyamayan, fakat ortamda hücrelerin belli olmasını sağlayarak ölü hücreleri ve medyumu mavi renge boyayan özel bir boyadır. Böylelikle canlı hücreler ile ölü hücreler de birbirlerinden ayrılmış olmaktadır.

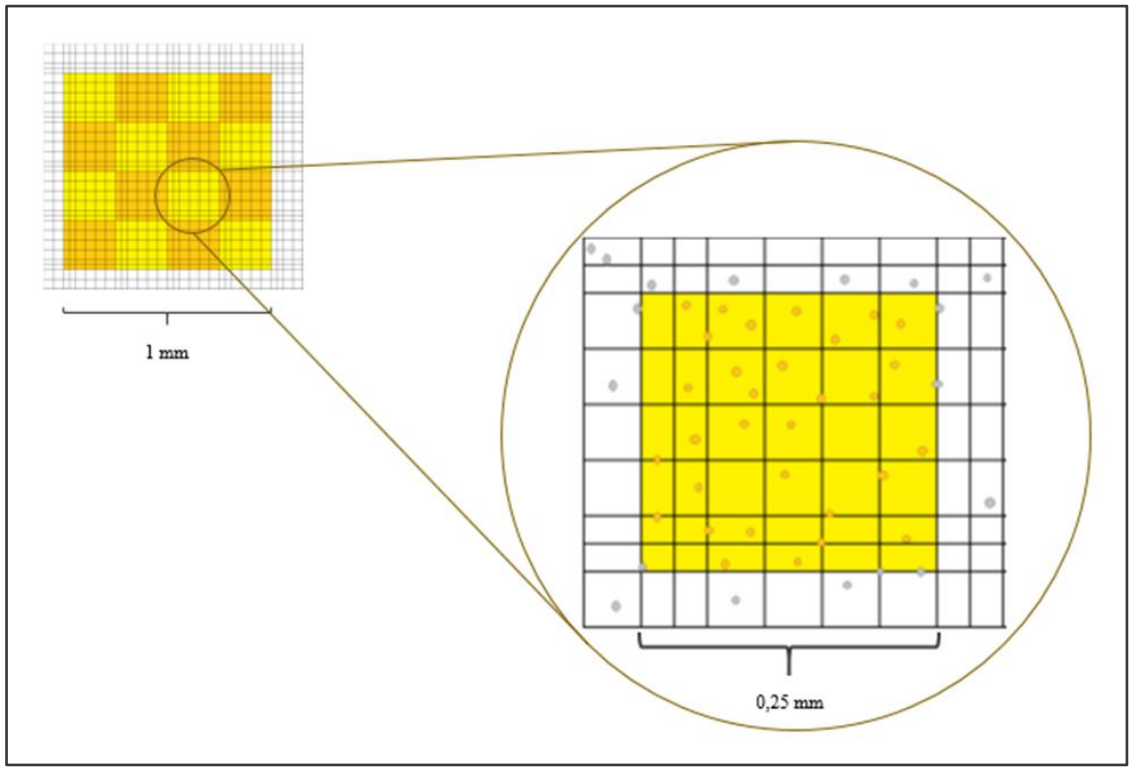
Hemositometre lamı olan Thoma lamında hücre sayımı için kullanılan çerçeve, ışık mikroskobunun 10X objektifinde rahatlıkla görülebilmektedir. Bu çerçevenin içerisinde 25 küçük boy kareden oluşan 16 orta boy kare ve bunlardan meydana gelen büyük bir kare (1 mm^2) bulunmaktadır. Her 25 küçük boy karenin 9 tanesi ortadan ikiye ayrılmıştır.

Hücre sayımı için hücre solüsyonu şu şekilde hazırlanır:

Tripsinize edilip kaldırıldıktan sonra santrifüjlenen hücrelerin süpernatantı uzaklaştırıldıktan sonra pellet 1 mL medyum ile resüspense edilir. Bu solüsyon iyice homojenize olduktan sonra bu karışımdan 10 µL bir eppendorf tüpüne alınır. Üzerine 50 µL Trypan mavisi ve 40 µL Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) eklenir ve pipetaj yapılarak homojenizasyonu sağlanır. Son karışımdan Thoma lamı üzerine her iki odacığa 10 µL damlatılıp lamel ile kapatılır.

10 µL hacimdeki örnek Thoma lamı üzerindeki alanda yayıldığında ve üzerine lamel kapatıldığında, yüksekliği 0,1 mm olmaktadır. 1 x 1 x 0,1 mm = 10-1 mm^3 = 10^{-4}mL hacmine ulaşılmaktadır.

Hücreler sayılırken belirli bir kurala uyulması gerekmektedir. Her bir orta karenin içindeki ve karenin alt ve sol taraflarının üzerindeki hücreler (kısmen dışarıda olsalar bile) sayılır. Bu yaklaşıma göre Şekil 7'de turuncu renk ile gösterilen hücreler sayılmalı, ancak gri renkli olan hücreler sayılmamalıdır.



Şekil 7: Hücre sayımının yapıldığı Thoma lamının yakından görüntüsü

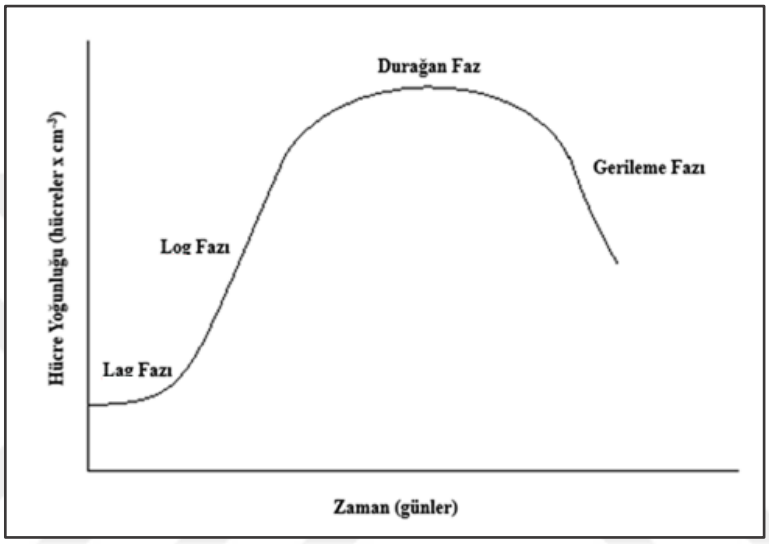
Sayılan hücrelerin N kadar olduğu varsayıldığında, dilüsyon hazırlanırken 10 kat seyreltildiği ve ilk başta hücre pelletinin 1 mL'de resüspense edildiği hesaba katılarak, şu şekilde 1 mL'deki hücre sayısı hesaplanmaktadır:

N x 10 x 10^4 = hücre/mL

1.1.3.6. Büyüme Kinetiği

Hücreler en uygun kültür koşullarında belli bir büyüme karakteristiği göstererek çoğalmaktadır. Buna göre pasajlandıktan sonra hücreler en başta çoğalma eğiliminde olmasalar bile canlılıkları açısından ve metabolik faaliyetleri bakımından bir artış göstermektedirler. Bu faza lag fazı (başlangıç fazı) denmektedir. Bu aşamadan sonra hücre

sayısında logaritmik olarak bir artış gözlemlenmektedir. Bu faza log fazı (logaritmik üreme fazı) denmektedir. Hücre pasajlamak ve stok almak için en iyi faz log fazıdır. Eğer bir işlem uygulanmazsa, bu aşamadan sonra medyum içeriği hücre artıkları, toksinler ile değişmekte ve medyumun asiditesi artmakta olup hücrelerin daha fazla çoğalabilmeleri için hücre kültürü şişesinde alan kalmamaktadır. Bu şekilde bir müddet daha canlılığını koruyan hücreler durağan faza girmiştir. Durağan fazdan sonra hücreler çok fazla dayanamadıkları için ölmeye başlamaktadır. Bu faza da gerileme fazı denmektedir (Şekil 8).



Şekil 8: Kültürde üretilen hücrelerin büyüme fazlarını gösteren grafik

1.1.3.7. Kriyoprezervasyon

Laboratuarda hücrelerin çoğaltılmasını durdurmak / tekrar yeniden başlatmak için ve hücreleri yedeklemek amacıyla kriyoprezervasyon yöntemi kullanılmaktadır. [63] Kriyoprezervasyon ayrıca hücrelerin metabolik ve fizyolojik olarak değişime uğramalarının, senesense girmelerinin ve kontaminasyonun da önüne geçmek için kullanılmaktadır. Sağlıklı bir hücre stoku yapabilmek için hücrelerin logaritmik üreme fazında iken kriyoprezervasyon yapılması gerekmektedir. Bu da T-75 hücre kültür şişesinde yaklaşık olarak %70 hücre doluluk oranına ulaşmış olan ve sayıldığında mL'de ortalama 1-10 x 10^6 olan hücre miktarına tekabül etmektedir. Genel bir kural olarak hücrelerin yavaşça dondurulması ve hızla çözdürülmesi gerekmektedir. Bunun sebebi hücrelerin parçalanmasına neden olabilecek buz kristallerinin oluşmasını engellemektir. [43]

Hücre süspansiyonunun dondurulabilmesi için soğuktan koruyucu bir maddenin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla sıklıkla kullanılan maddeler gliserol ve dimetil sülfoksittir (DMSO). Koruyucu maddenin konsantrasyonu %5 ila 20 arasında değişmekle

birlikte sıklıkla %10 oranında kullanılmaktadır. Ayrıca dondurma işlemi için hücre solüsyonuna genellikle %50 hatta nadiren %100 konsantrasyonda FBS de eklenmektedir. [64]

Soğutma işleminin kademeli olarak yapılabilmesi için hücre solüsyonu hazırlandıktan sonra önce -20°C'de dondurulduktan sonra 6 aya kadar -80°C'de, daha uzun vadede stoklamak için -150°C'de saklanmalıdır. Donma işleminin uzatılması için yalıtımlı köpük kutular kullanılmalıdır. Hücre tamamen donduktan sonra normal stok kutusuna alınarak muhafaza edilmektedir. Hücre hattının adı, pasaj numarası, stoklanma tarihi mutlaka kriyoprezervasyon tüpünün üzerine not edilmelidir.

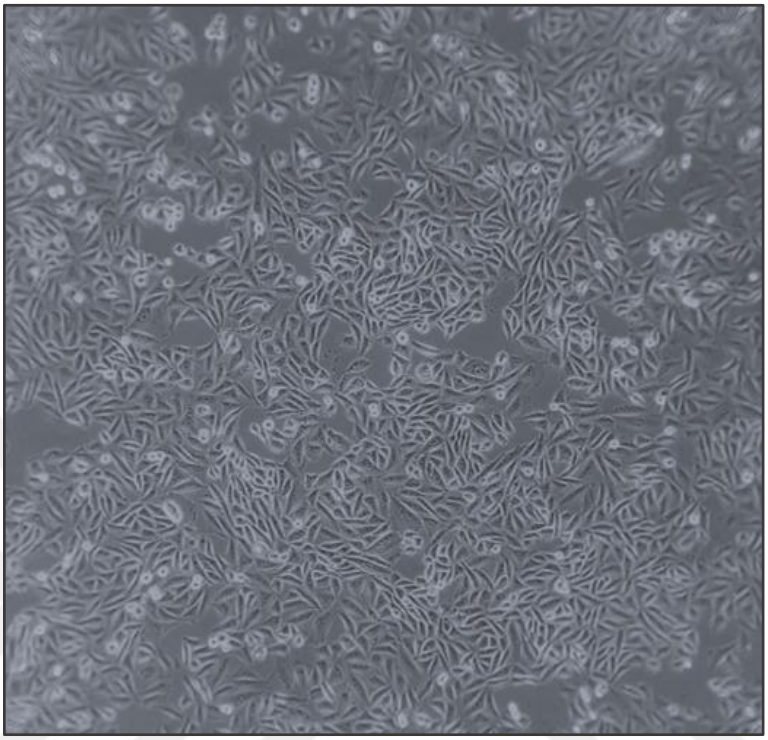
1.1.4. Memeli Hücre Hatları

Birçok hücrenin laboratuar ortamında kültürü yapılabilmektedir. Özellikle memeli hücreleri yaşam bilimleri için çok büyük bir öneme sahiptir. Bunun sebepleri arasında memeli hücrelerin kanser, immünoloji, insansı mAb üretimi ve ilaç çalışmalarında rahatlıkla kullanılabilmesi, model olarak çalışmalara uyarlanabilmesi ve hızlı çoğaltılabilmesi bulunmaktadır.

1.1.4.1. CHO-K1 hücreleri

Chinese Hamster Ovarian (CHO/ Çin hamsteri -*Cricetulus griseus*- yumurtalık hücreleri) 1957 yılında Theodore T. Puck ve arkadaşları tarafından Colorado Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Departmanı'nda, dişi bir hamsterin yumurtalığından geliştirilmiş bir hücre hattıdır. [65] CHO-K1 hücre hattı ise bir çeşit alt-klon olarak CHO hücrelerinden türetilmiştir. Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection / ATCC) CCL-61 kodu ile bu hücre hattını ticari olarak satmaktadır. Epitel benzeri yapışan hücreler üç boyutlu kültürde, endüstriyel biyoteknoloji alanlarında, biyolojik ürünlerin temininde ve benzer amaçlarla çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. [66] Özellikle yüksek miktarda büyüme faktörleri, hormonlar, interferonlar, enzimler ve mAblar gibi biyolojiklerin üretilmesinde, kanser çalışmalarında, kolay kültürlenebildikleri için sıklıkla tercih edilmektedir. [67] Bu hücre hattı ile üretilen biyolojiklerin insan-benzeri kompleks glikozilasyon ve translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirmeleri, farmasötik aktivite ve biyo-uyumluluk açısından çok önemlidir. Bu hücreler ile çok fazla çalışmanın yapılmış olması 2,45 Gb genomik sekanstan meydana gelen gen haritasının, hangi genlerin ifade edildiğinin, metabolik aktivitesinin, üretim karakteristiğinin bilinmesine de imkan vermektedir. [68] Ayrıca bir hamsterden köken alan bu hücreler, birçok insan patojenine karşı bulaş riskinin azalmasını ve buna bağlı olarak yüksek miktarda biyolojik ürünün herhangi bir kayıp olmaksızın

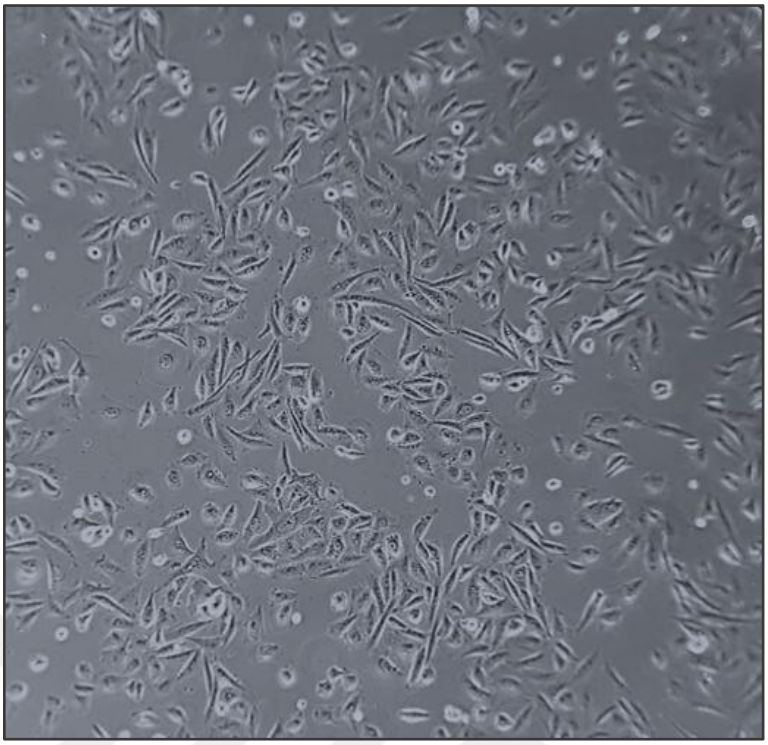
üretilebilmesini sağlamaktadır. [69] [70] Şekil 9'da bu hücre hattının kültürdeki görüntüsü bulunmaktadır.



Şekil 9: CHO-K1 hücrelerinin kültürdeki görüntüsü

1.1.4.2. MAb Üreten CHO-K1 hücreleri

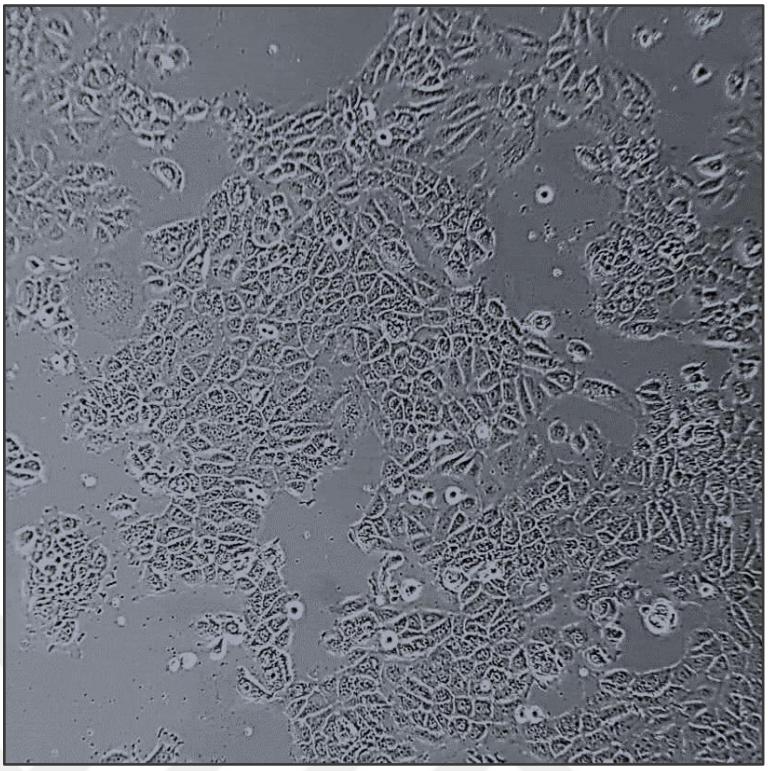
2019 yılında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Beykoz Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde (YABBE) Prof. Dr. Mehmet Ziya Doymaz, Dr. Mohammadreza Nassiri ve MSc. Nesibe Selma ÇETİN tarafından yapılan 12.2018/11 numaralı "Production and Evaluation of Activities of Cetuximab as a Biosimilar Molecule." BAP projesinde CHO-K1 hücrelerine aktarılan genler ile Cetuximab adlı ticari mAba ait ağır ve hafif zincirlerin kalıcı olarak üretilebilmesi için yeni bir hücre hattı oluşturulmuştur. Bu hücreler de epitel hücre yapısında ve yapışan kültürde çoğalma eğiliminde olan hücrelerdir. Çalışmamızda kullanılan hücreler bu hücrelerdir (Şekil 10).



Şekil 10: Mutant CHO-K1 hücrelerinin kültürdeki görüntüsü

1.1.4.3. A-431 hücreleri

Kültürde epitelyal morfoloji gösteren adherent A-431 hücre hattı D.J. Giard ve arkadaşları tarafından tümörlerden elde edilen bir grup hücre hattı ile birlikte, 85 yaşındaki epidermoid skuamöz karsinomdan mustarip bir kadın hastanın epidermisinden izole edilmiştir. ATCC tarafından CRL-1555 kodu ile ticari olarak satışa sunulmaktadır. Üç boyutlu hücre kültürü, toksikoloji, kanser immünolojisi ve kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmakta olan bir hücre hattıdır. [71] Bu tür araştırmalarda tercih edilmesinin sebepleri arasında; EGFR'yi çok fazla ifade etmesi, p38 mitojeni tarafından aktive edilmiş protein kinazın apoptoza etkilerinin araştırılması, CD44 reseptörü taşıması sayesinde melanomaya özgü yolakların çalışılması, anti-kanser aktivitesi olan biyolojiklerin test edilmesi bulunmaktadır. [72] Şekil 11'de bu hücrelerin kültürdeki görüntüsü yer almaktadır.

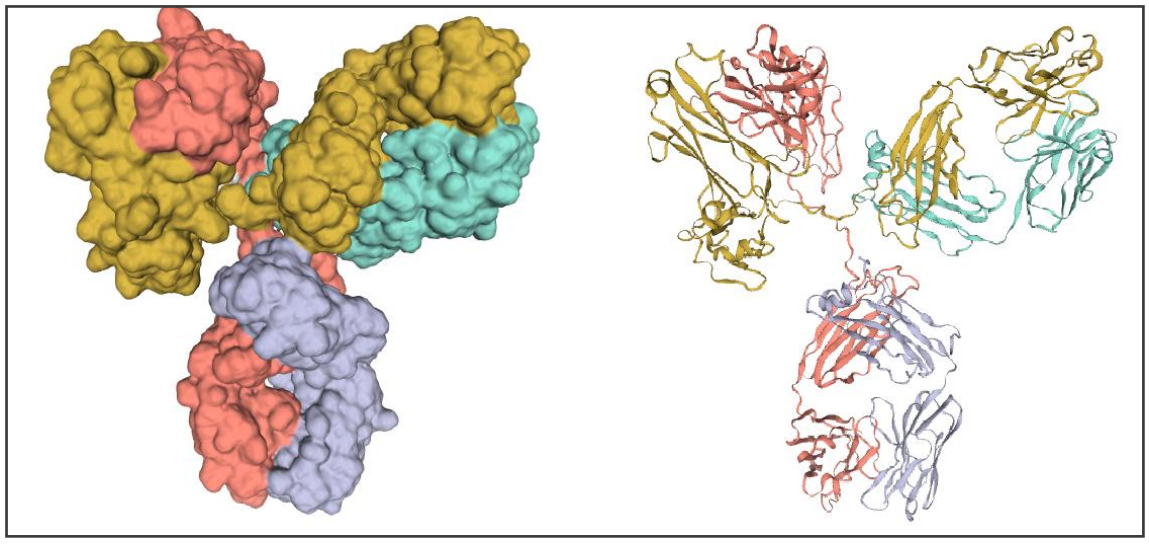


Şekil 11: A-431 hücrelerinin kültürdeki görüntüsü

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. Monoklonal Antikorlar

Vücudumuzun bir savunma mekanizması olarak, edinilmiş bağışıklık sistemimizin bir üyesi olan B lenfositlerin bir antijen ile karşılaştıktan sonra olgunlaşması ile oluşan plazma hücreleri tarafından büyük miktarlarda salgılanan antikorlar, oldukça özgül bir yanıt meydana getirmektedir. Antikorların bu kadar spesifik bir yanıt oluşturabilmelerinin temelinde antikorun antijen tanımada görevli fonksiyonel (Fab-fragment antigen binding) bölgesinde bulunan değişken zincirlerin önemi büyüktür. Epitopa bağlanan amino-terminal tarafta iki Fab bölgesi ve her Fab bölgesinde değişken ve sabit olmak üzere iki ağır ve iki hafif zincir bulunmaktadır. Antikorun kuyruk kısmı olarak da bilinen karboksi-terminal tarafta kristalize olan bölgede (Fc-fragment crystalline) sabit ağır zincir bulunmaktadır. Zincirleri bir arada tutan disülfit bağlarıdır (Şekil 12). Bu durum fare, tavşan, at gibi diğer memeli canlılarda da meydana gelmekte ve bu sayede bu canlılara inoküle edilen antijene karşı yüksek bir spesifisite ile bağlanan antikorlar oluşturulmaktadır. [73] Doğal olarak gerçekleşen bu mekanizma ile tıpta, biyolojide ve ilaç sanayisinde kullanılmak üzere hedefe yüksek özgüllükle bağlanan antikorlar üretilebilmektedir.



Şekil 12: Antikorun üç boyutlu yapısı.

Organizma *Mus musculus*, IgG1 antikor MAb61.1.3.[74] Üç boyutlu yapı analizi Swiss-Model aracı ile yapılmıştır. [75]

Bu amaçla önceleri en sık kullanılan yöntemlerde immünize edilen deney hayvanının dalak ve lenflerindeki plazma hücreleri izole edilerek bu hücrelerin ölümsüz melanoma hücreleri ile hibridizasyonu veya Epstein-Barr virüsü ile enfekte edilmesi ile sürekli hücre hatları haline getirilerek sınırsız antikor salgılamaları sağlanmaktaydı. [76] [77] [78] Günümüzde ise moleküler biyoloji ve genetik alanlarında gelişen teknoloji ile gen sekansları bilinen insana ait immünoglobülinlerin sabit bölgesi ile spesifik antikor üretilmesi istenen antijen ile immünize edilmiş fareye veya sıçana ait sekansı bilinen immünoglobülin değişken bölgeleri, halihazırda ticari olarak satın alınabilen bir hücre hattına klonlanarak kimera adı verilen, insan ve fareye/sıçana özgü protein bölgelerinin ifade edilmesi ile oluşan ve sadece tek bir epitopa özgül bağlanan "insansılaştırılmış" mAblar üretilebilmektedir. [79] [80] [81] [82]

MAbların kullanım alanı çok geniştir. Hızlı tanı testlerinde virüslerin varlığının gösterilmesi; bakterilerin hücre duvarı, flagella gibi antijenik yapılarına göre hangi antikorla aglutine olduklarının anlaşılması; hemaglütinasyon, enzim immüno assay (EIA), immüno-floresan assay (IFA), Western Blot (WB) gibi proteine özgü etiketli mAblarla tanı yapma veya titre belirlemede; terapötik amaçlarla özellikle kanser, Ebola virus, Dengue ateşi gibi hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılması bunlara örnek olarak verilebilir. [83]

Terapötik mAblar günümüzde özellikle onkoloji, immünoloji ve organ nakli alanlarında iyi kabul görmüş bir ilaç sınıfıdır. MAbların çeşitli kanserlerin tedavisinde, geleneksel sitotoksik ilaçlardan daha az yan etki taşıdığı kanıtlanmış ve hasta yaşam kalitesinin artmasını sağladığı gösterilmiştir. [84]

2.1.1. Cetuximab

ErbB ailesine ait bir tirozin kinaz reseptörü olan EGFR doku gelişimi ve homeostazı sağlamak için sağlıklı hücrelerde olduğu gibi tümör hücrelerinde de bulunmaktadır. Çok fazla ifade edilmesi durumunda kansere sebebiyet vermekte olan bu reseptör rekombinant olarak üretilen, Cetuximab adı verilen, kimerik bir insan/fare IgG1 mAbı sayesinde rekabetçi bir bağlanma ile epidermal büyüme faktörünün (EGF) bu reseptöre bağlanmasını inhibe edilebilmektedir. [85] [86] [87]

Cetuximab 2004 yılında, ERBITUX markası altında, FDA tarafından onaylanmıştır. Özellikle BRAF V600E mutasyonuna sahip metastatik kolorektal kanser, skuamöz baş ve boyun kanserleri ile metastatik KRAS yabanıl tip kolorektal kanserlerde tedavi amacıyla

kullanılmaktadır. Cetuximab damar içi olarak infüzyon yoluyla tek başına uygulanan ve gerekli durumlarda diğer kanser tedavi yöntemleri ile de kombine edilebilen bir mAbdır. [87]

2.1.1.1. Çalışma Mekanizması

EGFR, ErbB reseptör ailesine ait bir üyedir. Aktif olmadığı zaman, EGFR bir monomer olarak bulunmaktadır. Ancak EGF veya dönüştürücü büyüme faktörü-alfa (TGF-α) ile bağlandığında EGFR yolu ile hücre içi tirozin kinaz aktivasyonunu başlatmak üzere, ErbB reseptör ailesinin başka üyeleri ile homodimer veya heterodimer oluşturmakta ve EGFR otofosforilasyonu gerçekleşmektedir. Bu olay neticesinde hücre içinde zincirleme reaksiyonlar başlatılmaktadır. EGFR sinyal yolağı hücrelerin farklılaşması, çoğalması, anjiyogenezi, göçü ve en önemlisi apoptozu gibi tümü kanser hücrelerinde düzensiz hale gelen mekanizmaları düzenlemektedir. Cetuximab, EGFR'ye EGF veya TGF-α'dan daha yüksek bir özgüllük ve daha yüksek bir afinite ile bağlanmakta, böylece EGFR'nin ligand kaynaklı fosforilasyonunu bloke etmektedir. [88] [89] [90] [91]

2.1.1.2. Uygulanması

Cetuximab haftada bir kez olmak suretiyle, damar içi infüzyon yoluyla iki saatin üzerinde yükleme yapılarak uygulanmaktadır. Takip eden bir saat boyunca hastanın müşahede edilmesi gerekmektedir. Başlangıç dozu 400 mg/m^2 olacak şekilde iki saate yayılarak ve devam eden tedavi süresince 250 mg/m^2 olacak şekilde bir saate yayılarak uygulanması gerekmektedir. [89] [92]

2.1.1.3. Yan Etkileri

Olası yan etkileri vücut sistemlerine göre kategorize edilmiştir. Merkezi sinir sisteminde genellikle yorgunluk, halsizlik, ağrı, periferik duyusal nöropati; nadiren baş ağrısı, uykusuzluk, algıda bulanıklık, titreme, kaygı ve depresyona sebep olduğu gösterilmiştir. Dermatolojik olarak döküntü, akneiform, radyodermatit ve kseroderma sık görülen; kaşıntı, tırnaklarda değişim, cilt fissürü nadir görülen yan etkileridir. Metabolizmada kilo kaybına, magnezyum eksikliğine; gastrointestinal sistemde ishal, bulantı, karın ağrısı, kabızlık ve kusmaya daha ciddi semptomlar olarak anoreksiyaya yol açtığı gösterilmiştir. Nötropeni ve lökopeni onkolojik, zayıflık ve kemik ağrısı kas ve iskelet sisteminin yan etkileridir. Bazı hastalarda dispne, öksürük, farenjit, ateş ve infüzyona bağlı reaksiyonlar meydana gelmektedir. [93] [89]

2.1.1.4. Sekansı

>Cetuximab ağır zincir

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIW
SGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYE
FAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

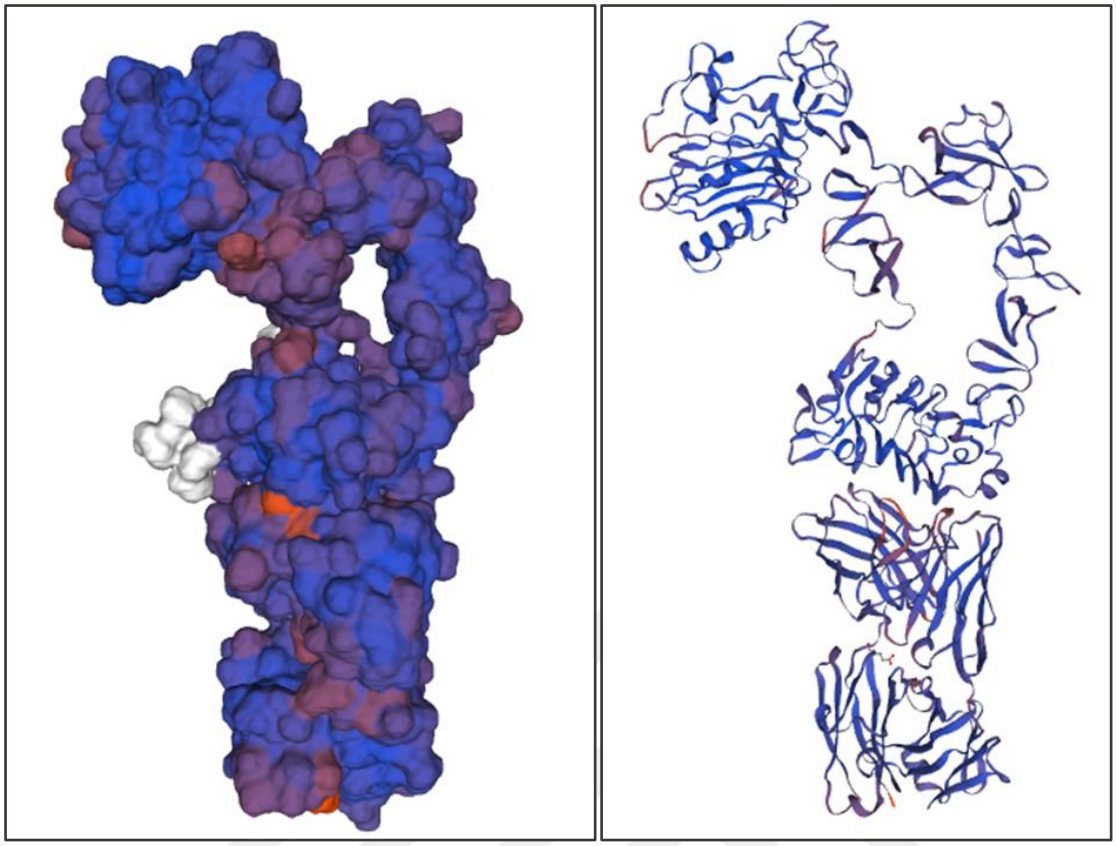
>Cetuximab hafif zincir

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTV
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[94] [95]

2.1.1.5. Proteinin Üç Boyutlu Yapısı

Proteinin üç boyutlu yapısı, FASTA formatındaki sekansları ile SwissModel kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 13).



Şekil 13: Cetuximab'ın üç boyutlu yapısı. [96]

2.1.1.6. Proteinin Kimyasal Formülü

C6484H10042N1732O2023S36 [8]

2.1.1.7. Proteinin Ortalama Ağırlığı

145781.6 Da [8]

2.2. Apoptoz

Canlılar doğar, yaşar, büyür ve ölür. Tüm canlıların yapı taşı olan hücreler de bir zaman sonra canlılıklarını kaybetmekte ve ölmektedir. Bu ölüm bazen başka hücreler veya faktörler tarafından bazen de hücrenin kendisi tarafından gerçekleşmektedir. Hücrenin kendi ölümüne (bir diğer deyişle intiharına) karar vererek hücre içinde bir dizi kaskadı başlatması ile apoptoz gerçekleşmektedir. Apoptoz birçok kaynakta programlı hücre ölümü olarak geçmektedir. Programlanmış hücre ölümü, bir organizmaya ait hücre sayısının düzenlenmesi için önemli bir mekanizma olmakla beraber, istenmeyen ve/veya potansiyel olarak tehlikeli hücreleri ortadan kaldırmak için de bir savunma mekanizması olarak hizmet etmektedir. [97] [98] [99] [100] [101]

Metazoanlar tarafından organizma için tehdit oluşturan istenmeyen veya hasarlı hücreleri ortadan kaldırmak için kullanılan sıkı bir şekilde düzenlenmiş hücre intihar süreci olarak bilinen apoptoz sürecini tanımlamak için genel olarak farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağlı biyokimyasal yollar kullanılmaktadır. Apoptozun, sağlıklı hücre döngüsü, bağışıklık sistemi gelişimi ve işlevi, hormona dayalı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal olarak indüklenen hücre ölümü dahil olmak üzere bir dizi aktivitede çok önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır. [102] [103]

Apoptoza uğrayan hücrelerdeki belirgin morfolojik değişiklikler şunlardır:

- hücre küçülmesi
- kromatin hiper-yoğuşması
- kromozomların nükleozomal parçalara bölünmesi
- plazma zarının yoğun kabarması
- 'apoptotik cisimler' olarak adlandırılan zar oluşumu

Apoptotik cisimler, hücresel içeriğin kapalı veziküller içinde paketlenmesiyle sıralı olarak karakterize edilmektedir. Bunlar daha sonra makrofajlar tarafından fagosite edilmektedir. Apoptozun düzenli bir şekilde yürütülmesi, solucanlardan memelilere evrimsel olarak korunan bir yol aracılığıyla koordine edilmektedir. [107]

Apoptoz, doğal olarak gelişme ve yaşlanma sırasında homeostazı sağlamak için ortaya çıkmaktadır. Apoptoz ayrıca savunma mekanizması olarak bağışıklık reaksiyonlarında veya hücrelerin hastalanma ya da zararlı maddeler sebebiyle hasar görme durumlarında da ortaya çıkmaktadır [177] . Aynı anda birçok hücre apoptozu tetikleyebilen hem fizyolojik hem de patolojik çok çeşitli uyaran ve koşullara maruz kalmasına rağmen, bu uyaranlara yanıt olarak tüm bu hücreler mutlaka ölmek durumunda değildir. Örneğin ışın veya kanser kemoterapisi için kullanılan ilaçlar, bazı hücrelerde DNA hasarına neden olup p53'e bağlı bir yoldan apoptotik ölüme yol açabilmektedir. Kortikosteroidler gibi bazı hormonlar, bazı hücrelerde (örneğin timositler) apoptotik ölüme yol açabilmektedir. Ancak bu uyaranlardan bazı hücreler etkilenirken diğer hücreler etkilenmemekte ve hatta uyarılmamaktadır. [104]

Bazı hücreler, çeşitli mekanizmalarla apoptoza yol açabilen *Fas* veya TNF reseptörlerini (TNFR) ifade etmektedir. Diğer hücreler, bir hormon veya büyüme faktörü sayesinde hayatta kalmanın inhibe edilmesi gereken bir ölüm aşamasına geçmektedir. Bu

arada apoptozu nekrozdan ayırt etme sorunu bulunmaktadır. Apoptoz ve nekroz birbirinden bağımsız, sıralı ve aynı anda meydana gelebilen iki ayrı süreçtir [178] [179] . Bazı durumlarda, hücrelerin apoptoz ile mi yoksa nekroz ile mi öleceğini belirleyen şey uyaranların türü ve/veya uyaranların derecesi olmaktadır. Düşük dozlarda ısı, radyasyon, hipoksi ve sitotoksik anti kanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyaranlar apoptozu indükleyebilir, ancak aynı uyaranlar daha yüksek dozlarda nekroza neden olabilmektedir. [104]

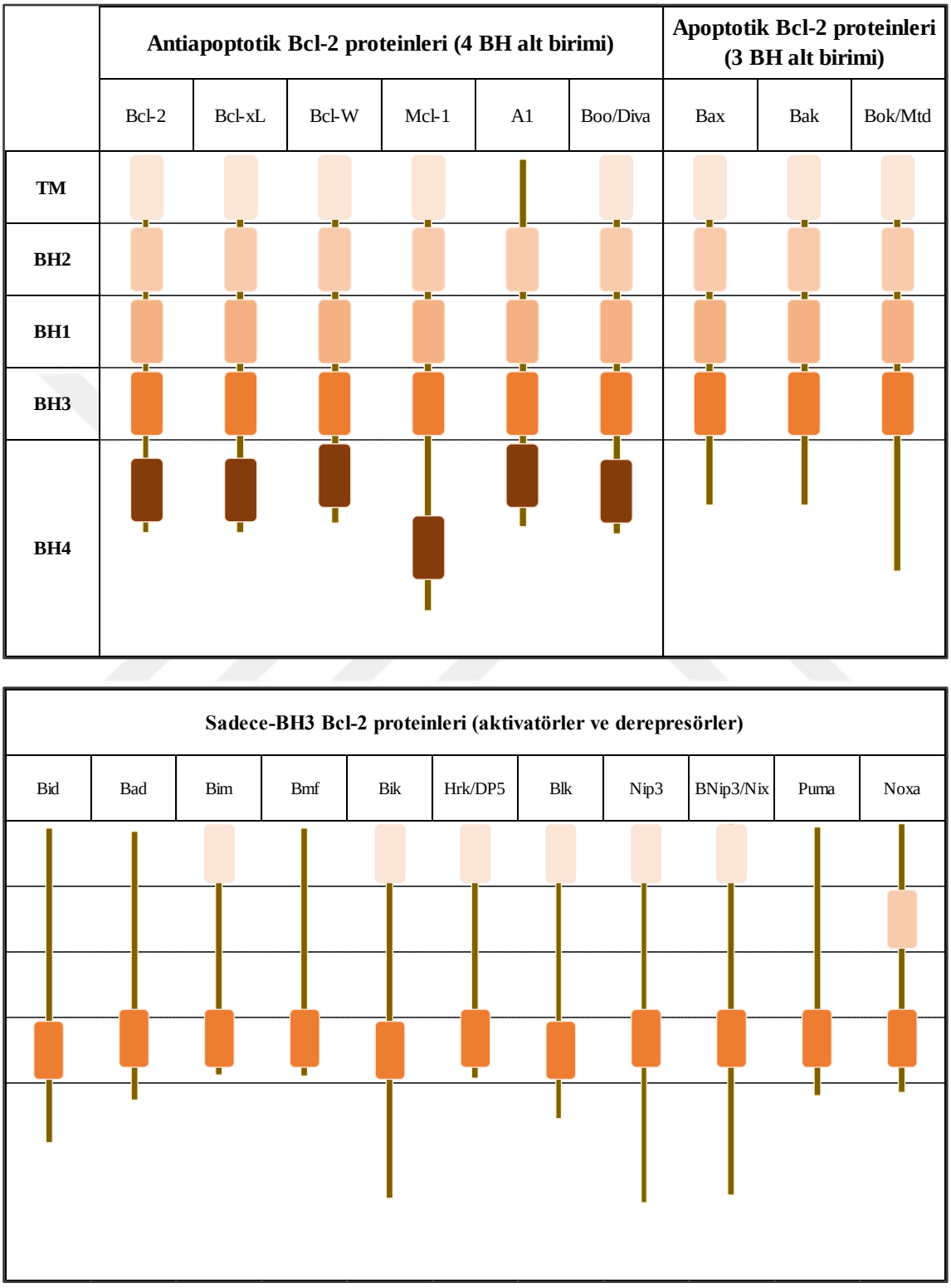
Sistin aspartat spesifik proteazlar (kaspazlar), apoptozu başlatmaktan ve yürütmekten sorumlu özel proteolitik enzimlerdir. Apoptoz geçiren ölmekte olan hücredeki birçok fizyolojik ve metabolik değişiklik, kaspazlar tarafından düzenlenmektedir. Kaspazlar, hayvan hücrelerinin çoğunda aktif olmayan zimojenler olarak zaten mevcuttur, bu nedenle apoptoz tetiklendiğinde yeni üretilmeleri gerekmemektedir. Yürütücü/efektör (executioner/effector), başlatıcı (initiator) ve enflamatuar (inflammatory) kaspazlar, her biri hücrelerde belirli bir görevi yerine getiren üç ana kaspaz türüdür. Apoptozda efektör ve başlatıcı kaspazlar görev almaktadır. Bu kaspazlar iki farklı sinyal yolu ile aktive edilebilmektedir: (1) Bcl-2 ailesi proteinlerinden oluşan ve ciddi hücre bozulması için dahili sensörler tarafından başlatılan hücreye özgü yol (intrinsic pathway); ve (2) hedef hücrelerin yüzeyindeki aynı kökenli ölüm reseptörleri yoluyla hücre dışı ligandlar tarafından tetiklenen hücre dışı yol (extrinsic pathway). [103] [98]

Apoptoz mekanizmasında mitokondri odak noktasında bulunmaktadır. Sitokrom c gibi kaspaz aktivatörlerinin salınması, elektron taşınmasındaki değişiklikler, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybı, değişmiş hücresel oksidasyon-indirgenme ve pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin katılımı apoptozdaki mitokondri üzerinde yoğunlaşmış anahtar olaylardan sadece birkaçını oluşturmaktadır. Fizyolojik hücre ölümünde, bu olayları başlatmak veya önlemek için mitokondri üzerinde birleşen çeşitli sinyaller ve ayrıca olay sonrası sonuçları ile tanımlanan çok sayıda önemli yolak bulunmaktadır. [104]

2.2.1. Apoptozda Görevli Proteinler

Tüm kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak bulunmaktadır. İhtiyaç duyulduğunda zimojenler aktive edilmektedir. Efektör kaspazların (kaspaz-3, -6, -7) aktivasyonu için büyük ve küçük alt ünitelerinin başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, -9) tarafından ayrılması gerekmektedir. Ancak başlatıcı kaspazlar da çok kompleksli bir olaylar zinciri neticesinde apoptoz başlayacağı zaman otomatik olarak aktive olmaktadır. Kaspazlar apoptoz inhibitör (inhibitor-of-apoptosis (IAP)) ailesi proteinleri tarafından inhibe edilmektedir.

IAPlerin özellikle başlatıcı kaspaz-9 ve efektör kaspaz-3 ve-7'yi inhibe etme potansiyeli yüksektir. [105] [106] [104] [107]



Şekil 14: Bcl-2 ailesine ait proteinler

Bcl-2 proteinleri dörde kadar Bcl-2 homoloji (BH) alt birimini paylaşmaktadır. Bu proteinler anti-apoptotik veya pro-apoptotik olabilirler. Pro-apoptotik proteinler iki gruba ayrılmaktadır, 3 BH alt birimi içeren apoptotik proteinler ve sadece BH-3 alt birimini içeren Bcl-2 proteinleri. [108]

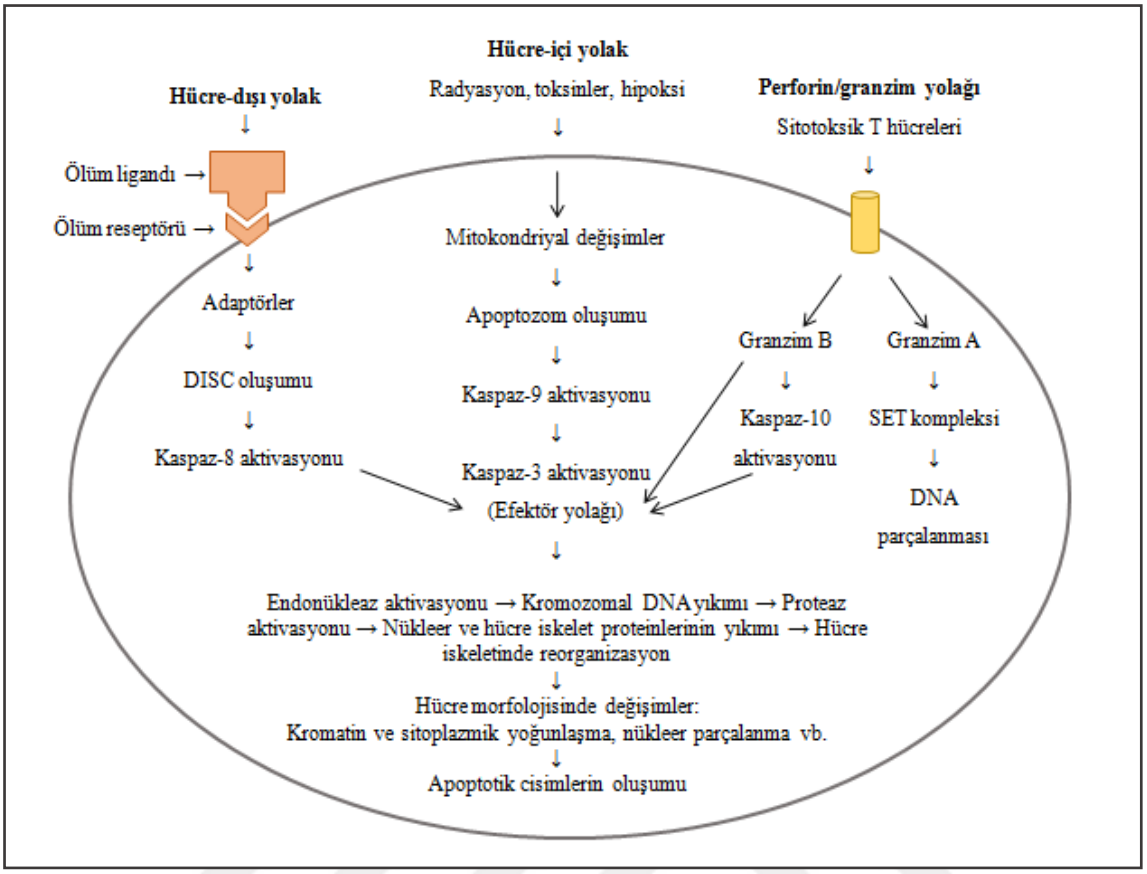
2.2.2. Apoptotik Yolaklar

Kaspaz aktivasyonu bir takım apoptoz yolakları ile tetiklenmektedir. Özellikle ölüm reseptörü yolağı (hücre-dışı yolak) ve mitokondriyal yolak (hücre-içi yolak) apoptozun başlatılmasında önemli rol oynamaktadır. Başlangıç olarak birbirlerinden farklılıkları bulunsa da sonuç olarak her iki yolak da apoptoz ile sonuçlanmaktadır.

Ölüm reseptörleri tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü (TNFR) ailesine aittir ve TNFR1, CD95 (*Fas* veya APO-1 olarak da bilinir) ve tümör nekroz faktörü ilişkili apoptoz başlatıcı ligand (TRAIL) reseptörlerini içermektedir. Bu reseptörler, spesifik ligandlara bağlanarak apoptozu tetikleyebilmektedir. Bu ligandlar bağışıklık hücreleri tarafından bir enflamatuvar durum neticesinde yanıt olarak üretilmektedir.[108]

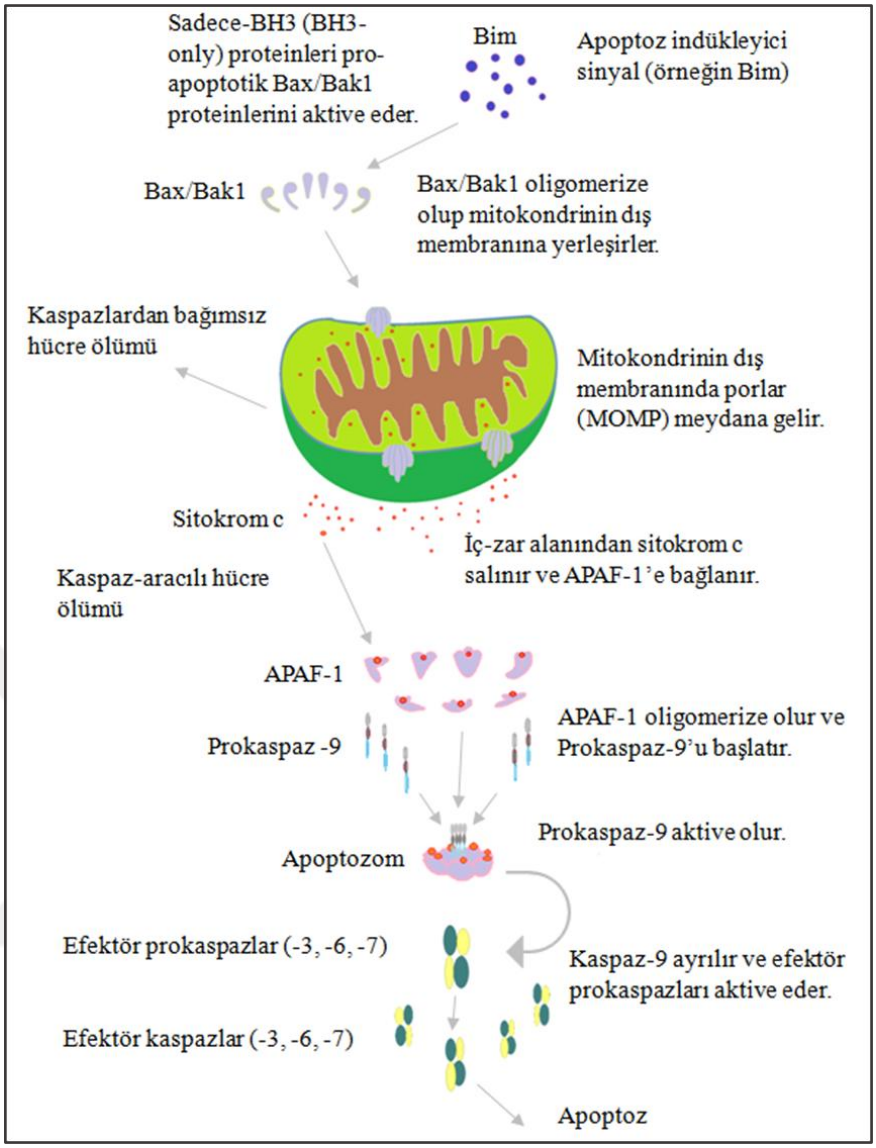
Omurgalılarda genellikle mitokondriyal yolla apoptoz meydana gelmektedir. Apoptozu uyarıcı sinyaller neticesinde hücrenin kaderini apoptozu engelleyen (anti-apoptotik) veya destekleyen (pro-apoptotik) Bcl-2 ailesine ait proteinlerdeki (Şekil 14) değişimler belirlemektedir. Eğer pro-apoptotik genler aktive olursa, hücre içindeki tüm mitokondrilerin dış zarları geçirgenleşmektedir (MOMP-mitochondrial outer membrane permeabilization). MOMP, apoptotik proteaz aktifleştirici faktör-1'i (APAF-1 (Apoptotic protease activating factor-1)) aktive eden sitokrom c gibi zarlar arası boşluktaki proteinlerin sitoplazmaya saçılmasına sebep olmaktadır. Böylece, başlatıcı kaspaz-9 görevlendirilerek aktive edildikten sonra bunlar ile efektör kaspazların aktivasyonu gerçekleştirilmektedir. [108]

Sitotoksik T lenfositleri (CTL) tarafından virüsle enfekte olan hücrelerin eliminasyonu için kullanılan yolak perforin/granzim apoptoz yoludur. [109] Granzim A ve Granzim B perforin ile hedef hücrelere iletildiklerinde birbirlerinden bağımsız olarak apoptozu indüklemektedir. Granzim A tek zincirli DNA hasarı, mitokondrinin disfonksiyonu ve hücre zarının bütünlüğünün bozulması ile Granzim B ise kaspazların ve önemli kaspaz yolağı substratlarının aktivasyonu ile karakterize edilerek apoptoza neden olmaktadırlar. [110] [111] Şekil 15'te apoptoz yolakları gösterilmektedir.



Şekil 15: Apoptotik yolaklar

Apoptozun hücre-içi ve hücre-dışı olmak üzere iki ana yolağı vardır. Bu yolakların haricinde bir de perforin/granzim yolağı bulunmaktadır. Bu olayların hepsinde enerjiye bağlı moleküler kaskadların başlatılabilmesi için tetikleyici sinyallerin bulunması gerekmektedir. Her yolakta kendisini başlatacak olan kaspaz aktive edilmektedir. Neticede en son Kaspaz-3 aktive edilir ve efektör yolağa girilir. Bir dizi olaydan sonra apoptotik cisimler oluşturulur ve bunlar makrofajlar tarafından fagositozla ortadan kaldırılır. Kaspaz bağlantısı olmadan apoptoza girilmesine neden olan granzim A yolağı endoplazmik retikulum (ER) ilişkili kompleks (SET kompleksi) oluşumu ve DNA'nın parçalanması ile neticelenmektedir. [112] Şekil 16'da hücre-içi apoptoz yolağı gösterilmektedir.



Şekil 16: Hücre-içi apoptoz yolağı

Bcl-2 ailesi proteinlerinin etkileşiminden sonra mitokondriyal geçirgenlik artmaktadır. Mitokondrinin dış zarında geçirgenlik oluştuğunda ve zarlar arası boşlukta bulunan proteinler (sitokrom c gibi) salındığında mitokondriyal apoptoz yolağı tetiklenir. APAF-1 apoptozom oluşumunda görev alan proteinlerdendir.

2.2.3. *Bax* ve *Bak1*

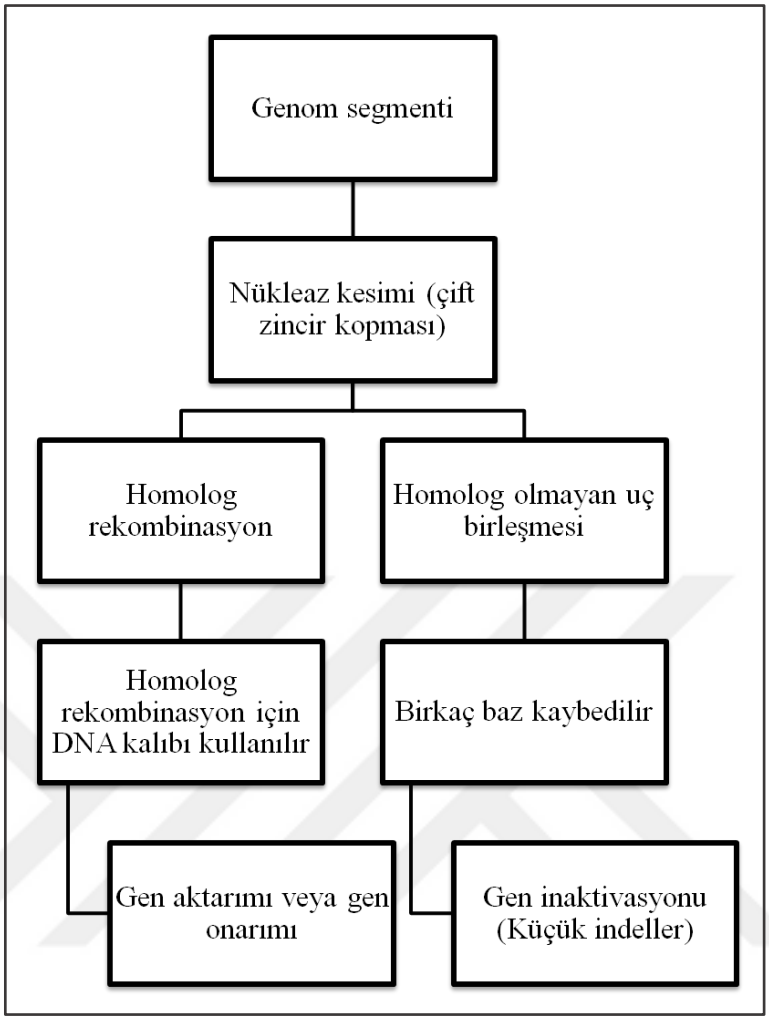
Bcl-2 protein ailesinin üyelerinde sadece-BH3 Bcl-2 proteinleri pro-apoptotik *Bax* ve *Bak1* proteinlerini aktive edip mitokondriyal yolla apoptoza sebep olmaktadırlar. Fakat bu proteinlerin *in vitro* olarak nasıl bir mekanizma ile çalıştıkları tam olarak bilinmemektedir. Bu konunun anlaşılması için bilim insanları fareler üzerinde yaptıkları deneylerde bu genleri etkisiz hale getirerek MOMP'taki rollerini anlamaya çalışmışlardır. Bu çalışmalarda tek başına nakavt edilen *Bax* ve tek başına nakavt edilen *Bak1* proteinlerinin apoptoz yolağında

pek fazla değişime yol açmadıklarını ancak hem *Bax* hem de *Bak1*'in aynı anda nakavt edildiği hücrelerin apoptotik uyaranlara karşı başarısız oldukları gözlemlenmiştir. [113] [114]

Ayrıca, bu hücrelerin, mitokondriyal fonksiyonun bozulması yoluyla oluşan staurosporin, ultraviyole (UV) ışın, büyüme faktörü yoksunluğu, etoposid ve ER stres uyaranları gibi birçok apoptotik uyarana karşı dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, *Bax* ve *Bak1*'in aktivasyonu, çeşitli uyaranlara yanıt olarak apoptoz için gerekli olan mitokondriyal geçirgenliğe sebep olan temel bir geçit gibi görünmektedir. [114]

2.3. Gen Düzenleme ve Gen Nakavtı

Gen düzenlemesi sayesinde belirli bir gen bölgesi içinde hedef DNA dizisinde kesin ve önceden hesaplanabilen değişiklikler yapılabilmektedir. Gen düzenleme araçları ile çok çeşitli genetik değişiklikler yapılabilmektedir. İstenen değişiklik bir dizi içinde belirli bazların silinmesi, düzeltmelerin yapılması, büyük bir gen sekansının çıkartılması veya eklenmesi olabilmektedir. [115] Gen düzenleme teknikleri transgenik canlıların üretilmesini, genlerin fonksiyonel olarak analiz edilmesini, belli hastalıklar için model geliştirilmesini ya da ilaç geliştirilmesini ve daha birçok çeşitli alanda çalışmaların yapılabilmesini mümkün kılmıştır. MAblar, enzimler, hormonlar gibi büyük proteinlerin üretilmesindeki zorlukların aşılmasında gen düzenleme araçlarının çok büyük rolü bulunmaktadır. Geliştirilmiş olan stratejiler ile programlanabilen nükleazlar, son elli yılda genom düzenlemede canlı hücrelerin genetik yapısını değiştirebilecek metotlar sunmuştur. Meganükleazlar, çinko-parmak (Zinc-finger) nükleazları (ZFN), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar (TALEN) ve düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar (CRISPR)/CRISPR aracılı protein 9 (Cas9) (CRISPR/Cas9) mevcut bulunan nükleazlardır (Tablo 7). [116] Şekil 17'de gen düzenlemede olası sonuçlar gösterilmiştir.



Şekil 17: Gen düzenlemede olası sonuçlar.

Nükleazlar DNA'da çift iplik kırılmalarına neden olmaktadır. Kırılmalar iki şekilde meydana gelmektedir. Eğer DNA kalıbı varsa homolog rekombinasyon (HR) şeklinde, eğer DNA kalıbı yoksa homolog olmayan uç birleşmesi (NHEJ) şeklinde kırılmalar oluşur. HR sonucunda kalıp DNA'nın (tek zincirli oligonükleotid veya çift zincirli plazmid) hedef bölgeye bütünleşmesi ile gen üzerinde modifikasyonlar, yeni bazların eklenmesi ile çerçeve kaymaları meydana getirilebilmektedir. NHEJ sonucunda genin işlevinin bozulmasına sebep olan bir indel veya çerçeve kayması ile neticelenen birkaç baz ekleme ya da çıkarma oluşabilmektedir. [117][116]

Genlerin negatif geri bildirim mekanizmaları ile hücrenin kaderini belirleyen genlerin ifadesini düzenleyerek canlı hücrelerin metabolik aktivitelerini ve organizmanın hayati fonksiyonlarını kontrol etmeye gen susturma denmektedir. [118] Gen susturma (gene-silencing) amacıyla kullanılan teknikler arasında RNA interferans (RNAi), mikro RNAlar (miRNAlar), ribozimler, mesajcı RNAların (mRNA) 3' translasyon olmayan bölgeleri (3' UTRler) ve rehber (antisense) oligonükleotidler ile yapılan gen baskılama çalışmaları bulunmaktadır (Tablo 6). Teknolojinin ilerlemesi ile bu teknikler yerlerini daha modern ve

genler üzerinde kalıcı değişikliklerin yapılmasına olanak veren gen düzenleme tekniklerine bırakmışlardır. [119]

Tablo 6: Gen susturma teknikleri [120] [121]

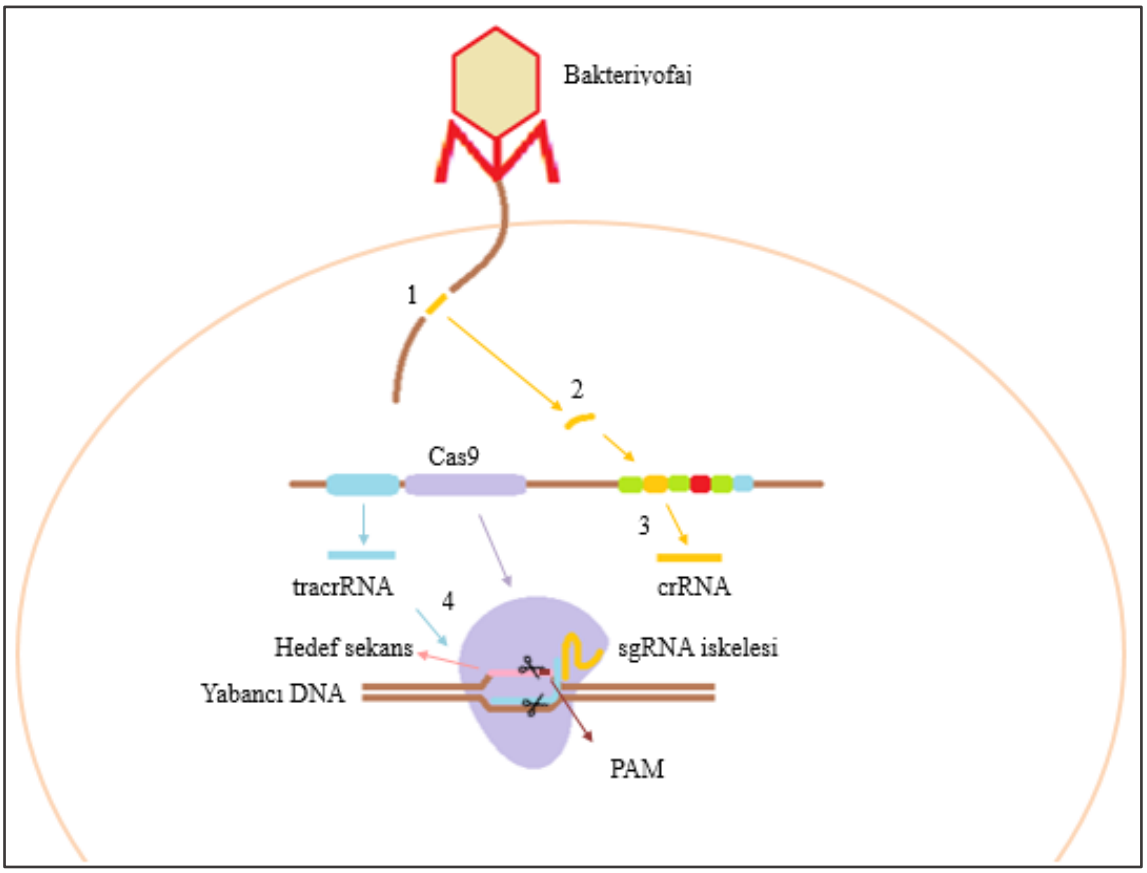
Gen susturma teknikleri	Avantajları	Dezavantajları
RNAi	Özgüldür. Nispeten kolaydır.	Transfeksiyona ihtiyaç duyulmaktadır ve knock-down oluşumuna sebep olur.
Antisens oligonükleotidler	Kolay ve ucuzdur.	Özgüllük ve efektivite duruma göre değişiklik göstermektedir.
siRNA	Hücrelere yüksek etkinlikle kolayca tanıtılabilmektedir. Hızla ve kolayca üretilebilmektedir. Hedef-dışılık kimyasal modifikasyonlarla azaltılabilmektedir.	Kaynak yenilememektedir. Her hücre siRNA ile transfekte edilemeyebilir. Geçici bir etki söz konusudur. Dizileme (array) formatı gerekmektedir.
miRNA	Yüksek kalıt-aktarımı başarısı bulunmaktadır. Raportör genler ve antibiyotik direnç genleri ile gen aktarımı yapılan hücreler seçilebilmektedir. Uzun dönemli etkinlikleri vardır. Havuzlanabilmekte veya dizilenebilmektedir. Birçok biyolojik işlem için keşfedilmemiş kullanım alanları bulunmaktadır.	Biyogüvenlik Seviye II birimleri gerekmektedir. Teknolojik olarak zorlayıcı olabilmektedir. Hataya açık veya tamamlanmamış kütüphaneler olasıdır.

Tablo 7: Gen düzenleme teknikleri [122]

Gen düzenleme teknikleri	Avantajları	Dezavantajları
Meganükleazlar	14-40 bp boyutundaki uzun bölümlerin tanınmasını sağlayarak gen düzenlemede etkinliği artırmıştır.	Her enzimin kendine has bir tanıma bölgesi bulunmaktadır. Bu nedenle hedef bölgeye yüksek ihtimalle bağlanan bir meganükleaz bulmak problemlidir. Çift zincir kırılmalarının NHEJ ile onarımı esnasında DNA'ya rastgele baz eklenmesi veya silinmesi meydana gelebilmektedir.
ZFNler	Model organizmalar ve insan hücrelerinde hedeflendirilmiş homolog rekombinasyon iyileştirilmiştir.	DNA tanıma bölgesi proteine özgüdür. Her hedef bölgesi için özel dizayn edilmiş DNA tanıma bölgeri hazırlamak zahmetli bir iştir.
TALENler	TALE proteinlerinin *FokI* DNA ayrılma bölgesi ile füzyonu sayesinde üç baz yerine bir baz tanıma kabiliyeti ile TALENler gen düzenleme aracı olarak etkili bir mekanizmadır.	DNA tanıma bölgesi proteine özgüdür. Her hedef bölgesi için özel dizayn edilmiş DNA tanıma bölgeri hazırlamak zahmetli bir iştir.
CRISPR/Cas9	Yüksek etkinliği, basitçe dizayn edilebilmesi ve kullanımdaki kolaylığı ile sıklıkla tercih edilmektedir. Sadece genom düzenleme aracı olarak değil, aynı zamanda transkripsiyonel analiz, epigenetik, modülasyon ve genom görüntülemede de kullanılmaktadır.	Hedef dışı bölgede beklenmeyen mutasyonlara sebep olabilmektedir.

2.4. CRISPR/Cas9 Sistemi

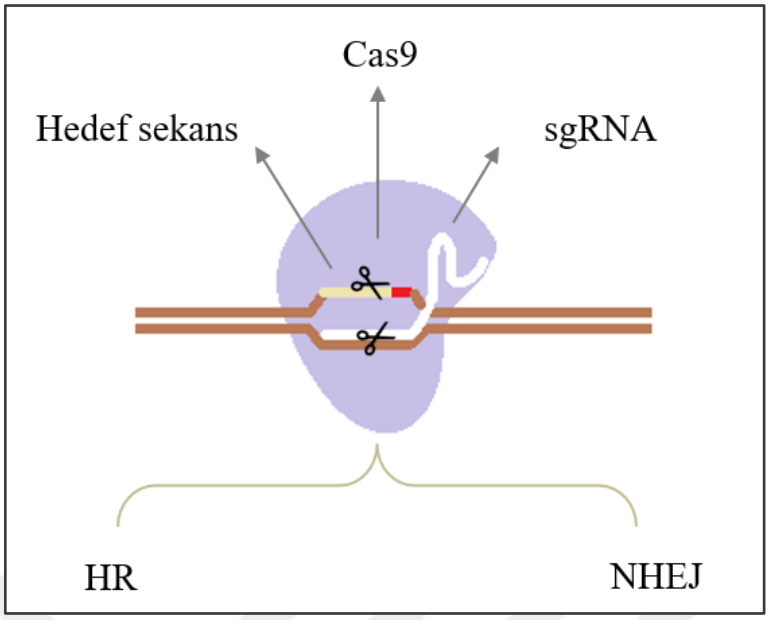
CRISPRlar ilk defa Francisco Mojica tarafından arkelerde ve sonrasında da bakterilerde keşfedilmiştir. Bakteriyel bağışıklık sisteminin bir parçası olarak, istilacı bakteriyofajlara karşı savunmada kullanıldığı anlaşılan CRISPRlar daha önce enfekte olunan virüslerden kalan genetik kod kalıntıları olan "aralayıcı" (spacer) dizilerle kesintiye uğrayan ve tekrar eden, virüse ait DNA veya RNA sekanslarından oluşmaktadır. Bu sistem, bakteriyofajların, tekrar hücre içine girdiklerinde, tespit edilip yok edilmesine yardımcı olmaktadır (Şekil 18).[123]



Şekil 18: Bakteriyel bağışıklık sistemi [124]

2.4.1. Genetik bir araç olarak CRISPR/Cas9

CRISPR aralayıcı sekansları, transkripsiyon ile kısa RNA dizilerini (CRISPR RNAları ya da crRNAlar) oluşturup bağışıklık sistemini DNA üzerinde eşleşen sekanslara yönlendirmektedir. Eğer hedef gen dizisi bulunursa, Cas9 DNA'ya bağlanarak çift zincir kırılması ile DNA'yı keser (Şekil 19). Bu şekilde hedeflenen gen etkisiz hale getirilmektedir. [123]



Şekil 19: CRISPR/Cas9 sistemi [124]

Bilim insanları Cas9'un farklı versiyonlarını kullanarak sadece DNA'yı kesmenin yanında yeni genlerin ifadesini de sağlayabilmektedir. Bu teknikler ile genlerin işlevleri de incelenebilmektedir. [123] Rehber RNA (sgRNA) olmadığı zaman Cas9 inaktif olarak bulunmaktadır. [125]

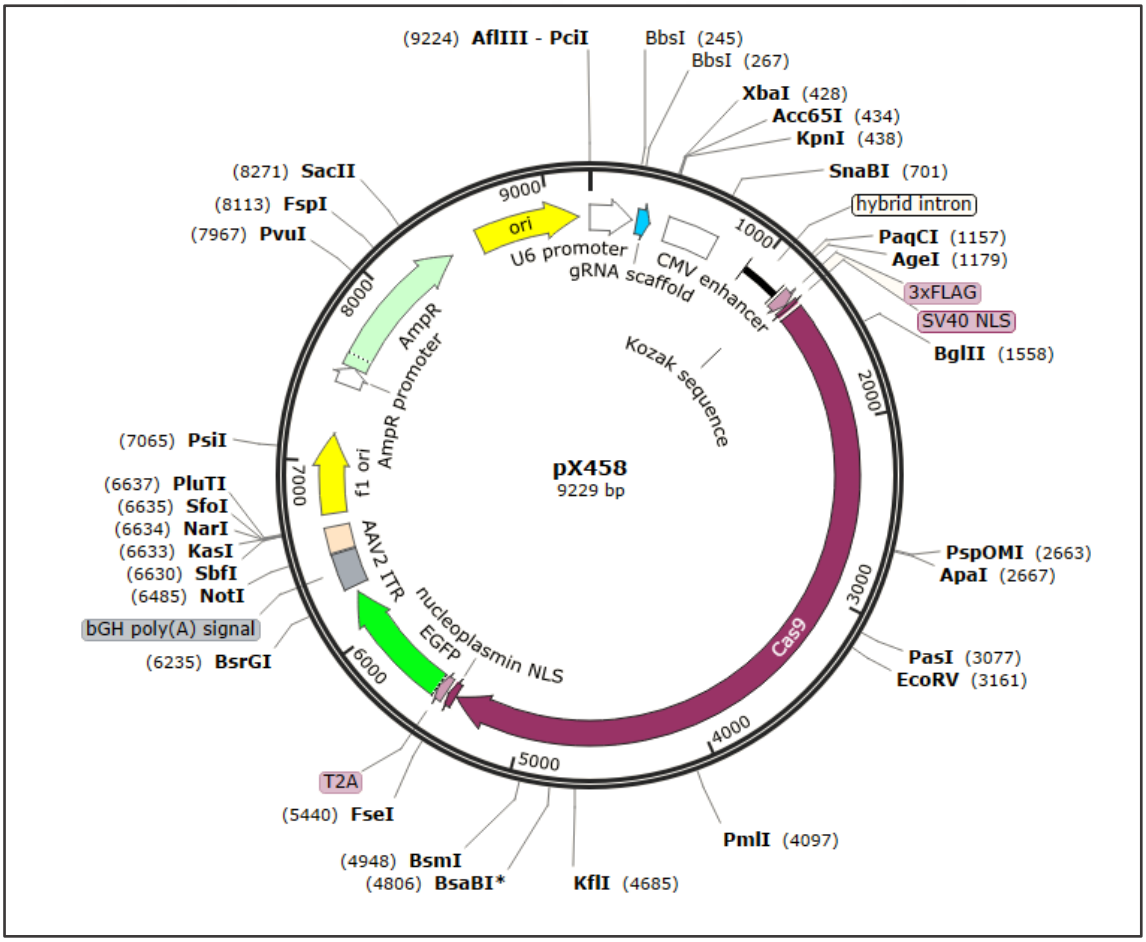
SgRNA Cas9 proteininine bağlandığında proteininin konformasyonel yapısında değişim meydana gelerek aktif forma dönüşmesine neden olmaktadır. SgRNA tek zincirli RNA'dan oluşan ve T-şeklinde bir beşli halka ile iki veya üç kök halka şekli almaktadır. [126]

Cas9 aktive olduğunda öncül-aralayıcı (protospacer) komşu motif (PAM) dizisi ile eşleşen dizilere bağlanarak hedef DNA'yı stokastik olarak aramaktadır. [127] PAM sekansı iki ya da üç bazdan oluşan sgRNA'nın komplementer olduğu hedef diziye bir baz mesafede olan ve bu bölgenin alt akımında bulunan bir sekanstır. Bilinen tüm CRISPR sistemlerindeki PAMlar saptanmıştır. Her CRISPR sistemine özgü spesifik PAM sekansları mevcuttur. [128] Cas9 uygun PAM ile olası hedef sekansı bulduğunda, PAM'ın üst akım bölgesindeki DNA'nın çift zinciri açılarak sgRNA ile ona komplementer olan sekansı birbirine eşlemektedir. [129] Eğer eşleşme düzgün bir şekilde gerçekleşirse, PAM'ın üst akım bölgesindeki üçüncü nükleotid bazından sonra hedef DNA sekansı kesilmektedir. [130] [131]

2.4.1.1. Plazmidlerin yapısı

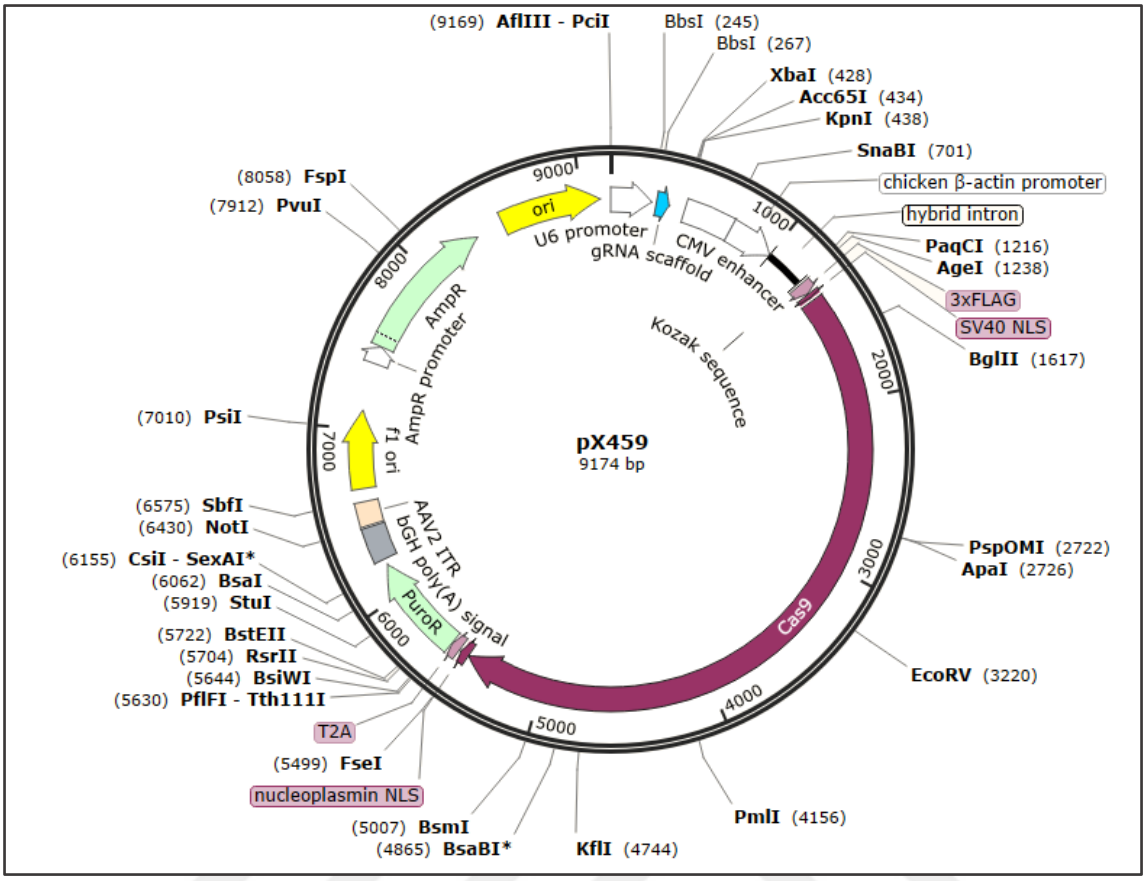
CRISPR/Cas9 sistemi kolaylığı ve ulaşılabilirliği sebebiyle gen düzenleme amacıyla günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Kar amacı gütmeyen birçok firma tarafından üretilmiş

"hepsi bir arada" (all-in-one) olarak adlandırılan CRISPR/Cas9 vektör plazmidleri bulunmaktadır. Bu plazmidlerde sgRNA sekanslarının yerleşeceği kısım, Cas9 geni, bu genin transkripsiyonunu sağlayan nükleer lokalizasyon sinyalleri ve promotorlar bulunmaktadır. U6 promotoru sgRNAların ifadesini, CBh (Chicken β-Actin hybrid) promotoru veya CMV (*Cytomegalovirus*) promotoru ve Kozak sekansı Cas9'un ifadesini başlatır. sgRNA iskele dizisinden sonra terminasyon sinyali bulunmaktadır. Plazmid hücre içine aktarıldığında eğer ifade oluyorsa bunun anlaşılabilmesi için raportör genler de bulunmaktadır. Bazı plazmidlerde belirli antibiyotiklere karşı direnç genleri bulunurken, bazılarında yeşil floresan proteini (GFP) gibi ışıma yapan genler kullanılmaktadır (Şekil 20 ve Şekil 21). 2A peptidi sayesinde hem Cas9 hem de raportör gen aynı CBh promotoru ile üretilmektedir. [132]



Şekil 20: Addgene tarafından üretilen pX458 vektörü

Raportör gen GFP'nin ifade edilmesini sağlamaktadır.

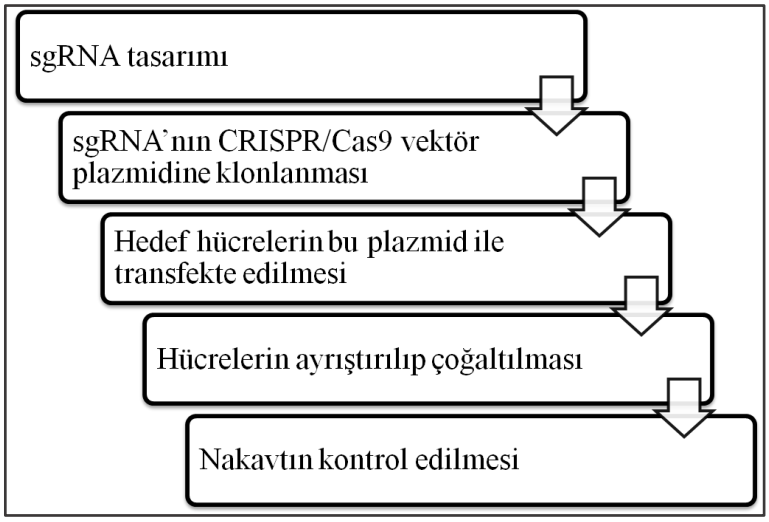


Şekil 21: Addgene tarafından üretilen pX459 vektörü

Raportör gen puromisin direnç geninin ifade edilmesini sağlamaktadır.

2.4.1.2. sgRNA dizaynı

Bir organizmanın genomunu düzenlemede en temel adım, belirli bir bölgenin seçici olarak hedeflenmesidir. CRISPR/Cas9 sisteminde Cas9 proteini ile sgRNA hedef sekansları yüksek seçicilikle tanıyıp işlem yapmak için etkileşime girerek bir kompleks oluşturmaktadır. [131] Bu nedenle sgRNA tasarımı CRISPR/Cas9 gen düzenleme mekanizmasında en önemli aşamadır. Yaklaşık 20 nükleotidden oluşan sgRNA'nın tasarlanması için günümüzde birçok biyoinformatik aracı bulunmaktadır. Bunların vasıtasıyla hedef gen sekansına komplementer, hedef-içi ve hedef-dışı oranları belirlenmiş, skorlamaları yapılmış sgRNAlar içerisinden en uygun olanlar seçilerek gen düzenlemesi için gerekli adımlar takip edilmektedir (Şekil 22).



Şekil 22: CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme metoduna ait basamaklar

Hedef gen bölgesine komplementer sgRNAlar tasarlandıktan sonra sgRNAlar CRISPR/Cas9 vektör plazmidine klonlanarak hedef hücreye gen aktarımı yapılmaktadır. Daha sonra hedef hücrelerin genomunda istenen düzenlemenin yapıldığının anlaşılması için vektör plazmidde bulunan raportör genler sayesinde hücreler ayrıştırılıp, monoklonal olarak çoğaltılmaktadır ve sekanslama yöntemleri ile nakavt gen düzeyinde kontrol edilmektedir.

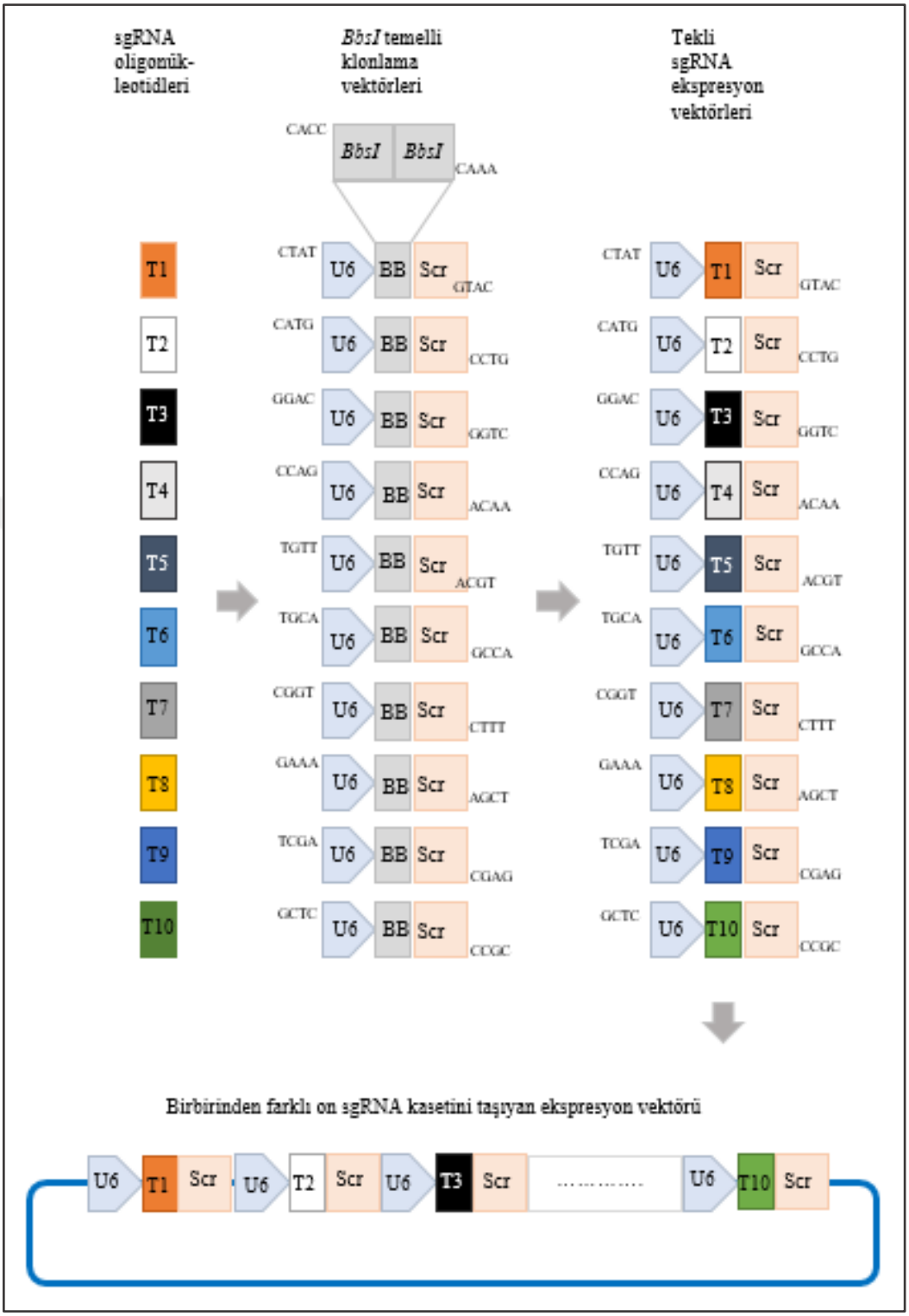
2.4.1.3. Birden fazla gen bölgesini aynı anda hedef alan farklı sgRNAların tek vektör üzerinde ifade edilmesi

Günümüzde plazmid tabanlı CRISPR/Cas9 ekspresyon sistemi kar amacı gütmeyen kaynaklardan temin edilebilmektedir. Bu plazmid sistemleri ile tek bir sgRNA kolaylıkla hücre içine iletilebilmektedir. [133] [183]

Literatürde başarılı bir nakavt için hedef gen üzerinde eksonun 5' ucuna yakın kısmından başlayarak en az üç ayrı sgRNA tasarlanması tavsiye edilmektedir. [134] Fakat her sgRNA için farklı bir vektör kullanılarak eş transfeksiyon yapıldığında bu vektörlerden hangilerinin hedef hücreye gen aktarımı yaptığını kestirmek zordur ve vektör sayısı arttıkça efektivite azalmaktadır.

Bazı çalışmalarda tek seferde, bir vektör üzerinde farklı genlere spesifik birden fazla (on taneye kadar) sgRNA ile yapılan nakavtların başarılı sonuçlar oluşturduğu gösterilmiştir. Tüm bu çalışmalarda sgRNAlar birbirleri ardına belirli bir kurala göre Golden Gate birleştirme adı verilen yöntemle vektör plazmide eklenmiştir. Normalde vektör plazmidde yer alan U6 promotor bölgesi ile sgRNA iskele (scaffold) bölgesi (Scr) arasında *BbsI* enzimi kesim bölgesi bulunmaktadır ve enzim kesiminden sonra sgRNA oligonükleotidi, U6 ve Scr arasına yerleşerek ligasyonu sağlanmaktadır. Bunun için her bir sgRNA bir ekspresyon plazmidine klonlandıktan sonra birden fazla genin aynı anda nakavt edilebilmesi için U6

promotorunun üst akım bölgesi ve Scr'nin alt akım bölgesinden aynı restriksiyon enzimi kullanılarak kesilir. Daha sonra her biri maksimum on sgRNA içeren birer kaset oluşturacak şekilde birbiri ardına eklenir. Multipleks sgRNA ifadesi için birinci U6 promotorunun alt akım bölgesine getirilmek üzere birinci sgRNA dan sonra birinci Scr, ikinci U6 promotoru ardından ikinci sgRNA ve ikinci Scr, üçüncü U6 promotorundan sonra üçüncü sgRNA ve üçüncü Scr şeklinde son sgRNA'ya kadar ekleme yapılıp vektör plazmide klonlamak için Golden Gate Assembly yöntemi ile ligasyon yapılmaktadır (Şekil 23). Daha sonra bu ekspresyon plazmidi ile CRISPR/Cas9 plazmidi eş zamanlı olarak hedef hücrelere transfekte edilmektedir. [133] [135] [133]



Şekil 23: Multipleks sgRNA

Multipleks sgRNA ifadesi için birinci U6 promotorunun alt akım bölgesine getirilmek üzere birinci sgRNA dan sonra birinci Scr, ikinci U6 promotoru ardından ikinci sgRNA ve ikinci Scr, üçüncü U6 promotorundan sonra üçüncü sgRNA ve üçüncü Scr şeklinde son sgRNA'ya kadar ekleme yapılıp vektör plazmide klonlamak için Golden Gate Assembly yöntemi ile

ligasyon yapılmaktadır. sgRNA transkripsiyonu için U6, U6 promotoru; BB, *BbsI* restriksiyon enzimi; Scr, SpCas9 sgRNA iskele dizileri. [133]

2.4.2. CHO-K1 hücrelerinde *Bak1* ve *Bax* genlerini nakavtla ilgili çalışmalar

CHO-K1 hücreleri mAb üretmek için en sık tercih edilen memeli hücre hatlarından biridir. Bu hücrelerin insan benzeri translasyon sonrası modifikasyonlar yapmaları, diğer memeli hücrelere nazaran daha fazla miktarlarda rekombinant mAb üretebilmeleri ve süspansiyon kültürüne daha rahat adapte edilebilmeleri tercih edilmelerinin ardındaki en önemli kabiliyetleridir. Fakat bu hücre hattı da canlılık ve büyüme yönünden protein üretimini kısıtlamaktadır. Bu durumda hücrenin apoptoza girmesine engel olmak, hücrelerin canlılığını yüksek seviyede tutmaya yardımcı olabilmektedir. Literatürde bulunan bazı çalışmalar da bunu ispat etmektedirler.

Lim Sing ve arkadaşları RNAi yöntemini kullanarak *Bax* ve *Bak1* genlerin baskılamışlar ve bu hücrelerin sitotoksik lektinlerle UV ışınlara karşı dirençli olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca kesikli-beslemeli (fed-batch) sistemde *Bax* ve *Bak1* baskılanmış hücrelerin canlılık oranının daha yüksek olduğunu ve hücrelerin ömürlerinin uzadığını söylemişlerdir. [19] Daha sonra Gregory J. Cost ve arkadaşları CHO hücrelerinde bu genleri silmek için ZFNleri kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmalarda *Bax* ve *Bak1* genleri ikili nakavt (double-knockout (DKO)) hücrelerin açlık ve sodyum bütirat ile staurosporin maruziyetine rağmen hayatta kaldıklarını göstermişlerdir. [20] Aynı yöntem kullanılarak hazırlanmış DKO CHO-K1 hücrelerinin geçici olarak mAb üretmeleri için transfekte edildiklerinde, yabanıl tip CHO-K1 hücrelerine nazaran yaklaşık üç ila dört kat daha fazla antikor titreleri ifade ettikleri Macaraeg ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada görülmektedir. [136] Tek seferde CHO hücrelerine ait *FUT8*, *Bak1* ve *Bax* genlerinin fonksiyonunu CRISPR/Cas9 genom düzenlemesi ile bozmuş olan Grav ve arkadaşları GFP raportör genin ifadesi sayesinde nakavt edilmiş hücreleri izole etmiş ve apoptotik uyaranlara karşı dirençli olduklarını ve bu yöntemin bir emsal teşkil edeceğini vurgulamaktadır. [21] Apoptoz direncini CHO hücreleri ile modellemek isteyen MacDonald ve arkadaşları ise *Bak1*, *Bax* ve *Bok* genlerini CRISPR yöntemi aracılığıyla nakavt etmiş her ne kadar *Bok* nakavtı anlamlı bir sonuç oluşturmasa da *Bak1* ve *Bax* nakavtının hücrelerin ölüm oranında azalmaya, apoptozun başlamasında gecikmeye ve bu gecikmenin doğrudan gözlemlenmesine izin vererek bu yöntemle biyolojik modelleme ile bir örneklem oluşturarak büyük çaplı biyo-işleme için bir çıkarım oluşturulmasına katkı sağlamışladır. [137] Son olarak Kai Xiong ve arkadaşları CRISPR interference (CRISPRi) yöntemini kullanarak CHO hücrelerinde apoptozu azaltarak kaspaz

aktivitesini düşürmüşler ve mitokondriyal zar bütünlüğünün muhafaza edilmesini sağlamışlardır. [138]

2.5. Süspansiyon Kültürü

Yapışan hücrelerle kıyaslandığında süspanse hücrelerin daha yüksek verim sağladığı bilinmektedir. Bu nedenle biyolojik ürünlerin yüksek miktarda üretilebilmesi için genellikle süspanse kültürlere başvurulmaktadır. Fakat bilinen birçok hücre hattı yapışan hücre özelliği göstermekte olduğu için sanayiye geçişte bu hücrelerin süspanse kültüre adapte edilmesi gerekmektedir. [139]

Süspanse hücre kültürüne adaptasyon beraberinde avantajlar ve dezavantajları da getirmektedir. Öncelikle her hücre hattı mükemmel bir şekilde bu adaptasyonu gerçekleştiremeyeceği için üretimi yapılacak mAb için seçilecek memeli hücre seçeneği azalmaktadır. Bazı durumlarda, mikro-taşıyıcılar gibi, kültür ortamına eklemeler yapılması gerekebilirken, bazı durumlarda hücrelerin büyümesini ve tabana yapışmasını destekleyen serum gibi maddelerin ortamdan uzaklaştırılması gerekebilmektedir. Seçilen her yöntemin belirli sonuçları olmaktadır.

Ticari üretime geçilmesi durumunda üretilen ürün her ne olursa olsun, belirli bir standarda uygun olması, her seferinde beklentileri karşılaması ve deneyler her tekrar edildiğinde aynı çıktıların alınması gerekmektedir. Bu sebeple, normal hücre kültür şişelerinde gerçekleştirilen kültürler, tekrar edilen deneylerde kültür şişesinin büyüklüğü, geometrisi, medyum içeriği, inkübasyon koşulları, çalkalayıcının hızı, dönüş yönü gibi sonuçları etkileyecek parametrelerle bu beklentiyi karşılayamadıklarından sorun teşkil etmektedir.

2.5.1. Biyoreaktörler

Her canlı hücre birer biyoreaktördür. Hücrelerin dışında, laboratuarlarda sıklıkla kullanılan, içerisinde kültür yapılan petri kapları, hücre kültürü şişeleri, erlen şişeleri ve endüstriyel fermentörler de birer biyoreaktördür. [140] Memeli hücre hatları, bitki hücreleri, kök hücreler ve böcek hücreleri gibi hücreleri ve bakteri, alg, maya ve mantarlar gibi mikroorganizmaları çoğaltmak/üretmek amacıyla kullanılan tüm kültür sistemlerine de genel itibariyle biyoreaktör/fermentör denilmektedir. Bu canlı hücrelerden veya organizmalardan ürün elde etmeye de biyo-işleme denilmektedir. [141] [142]

Eğer daha yüksek verimlilikle, daha fazla hücre kullanarak, daha iyi üretim yapılmak isteniyorsa biyoreaktörler ve fermentörler birçok çeşidi ile bu ihtiyacı karşılamaktadır. [141] Biyoreaktörler hücrelerin ve enzimlerin içinde bulundukları sistemdeki kimyasalları kullanarak ürün oluşturmalarını ve dolayısı ile arzı karşılayacak boyutta biyo-işleme yapmalarını sağlayan optimize edilmiş kültürleme platformlarıdır. [143] [140] Bu kapalı sistemler motorlu çarklarla, sıcaklık ve pH kontrolü yapan sensörlerle, gaz iletimi ve sıvı iletimi yapan iticilerle donatılmıştır. Uygulamaya özgü kullanılacak olan parametreler ilgili yazılıma kaydedildiğinde, sistem otomatik olarak biyoreaktör kültürünü takip etmekte ve buna uygun kontrolleri yapmaktadır. [144]

Biyoreaktörlerin donanım olarak ne kadar basit veya üst düzey olduğu yapılacak olan çalışmaya göre belirlenmektedir. Biyoreaktör seçiminde önemli olan unsur, istenen ürünü üretebilme kabiliyetine sahip olmasıdır. Çevresel, tarımsal, tıbbi ve endüstriyel uygulamalar için kullanımda olan birçok biyoreaktör bulunmaktadır. [140] Hücre kültürü, gıda üretimi, doku mühendisliği, protein-enzim sentezi, süt işleme gibi çok farklı işlemler için kullanılan birçok farklı biyoreaktör ve bunlara özgü uygulamalar literatürde bulunmaktadır. [143]

Biyoreaktör kullanımından önceki safhada hücrelerin süspanse kültüre adapte edilmesi, ortamın hazırlanması, parametrelerin belirlenmesi de dahil biyoreaktör kültürüne başlamak için gerekli tüm hazırlıkların yapıldığı süreç üst akım biyo-işlemesi olarak adlandırılmaktadır. Bundan sonra hücre kültürü ile biyorektörden elde edilen ürünün saflaştırılması, yoğunlaştırılması ve piyasaya sunulmak üzere hazır hale getirilmesi için yapılan tüm işlemler de alt akım biyo-işlemesi olarak adlandırılmaktadır. Başından sonuna kadar biyo-işleme sırasında yapılan tüm uygulamaların, İyi Üretim Uygulamaları (GMP) standartlarına riayet edilerek yapılması gerekmektedir. [145] [146] [147] [148] [149] [150]

2.5.2. Kazanımlar

Biyoreaktörler tamamen kapalı sistemler oldukları için, herhangi bir kontaminasyonun meydana gelme riskini oldukça düşürmektedir. Bunun yanı sıra sensörleri ve kontrolleri sayesinde hücreler için daha iyi bir kültür ortamı sağlamaktadır. Hücrelerin büyürken ve çoğalırken geçtikleri aşamaların daha iyi takip edilmesi ve gerekli uygulamaların eşzamanlı olarak gerçekleştirilmesini mümkün kılmaktadır. Böylelikle kesintisiz bir üretimin yapılmasını kolaylaştırmaktadır. Tüm bunlara ek olarak kayıpların yaşanmasının önüne geçerek üretim maliyetlerini de azaltmaktadır.[144]

2.6. TEZİN AMACI

Günümüzde bilinen birçok mAbın endüstriyel ölçekte üretilebilmesi için sıklıkla CHO (Chinese Hamster Ovary) hücreleri kullanılmaktadır. [84] [151] CHO hücreleri insan benzeri translasyon sonrası modifikasyonlar ile rekombinant proteinleri ifade edebilme yeteneğine sahiptir. [151] Bu çalışmanın amacı CHO hücrelerinin K1 suşu kullanılarak Cetuximab üretiminin ve verimliliğinin arttırılması için: adherent hücre kültüründen süspansiyon kültürüne geçiş yapılması, vasatta bulunan serum miktarı azaltılarak CHO hücrelerinin serum içermeyen kültüre adapte edilmesi, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak programlı hücre ölümüne neden olan pro-apoptotik *Bak1* ve *Bax* genlerinin kalıcı olarak inhibe edilmesi ile zorlu kültür koşullarına dayanıklı yeni bir hücre hattı oluşturulmasıdır.

Bu çalışma sırasında kullanılan yöntemler arasında bulunan CRISPR/Cas9 sistemi literatürde bulunan emsallerinden farklı olarak *Bak1* ve *Bax* genlerini nakavt etmek amacıyla çoklu sgRNA kasetini "Golden Gate" birleştirme yöntemi kullanılmadan "hepsi bir arada" CRISPR/Cas9 vektörüne direkt klonlama yöntemi kullanılarak ilk defa Cetuximab üreten CHO-K1 hücrelerine uygulanmıştır. [20] [138] [21]

Çalışma sonucunda elde edilen DKO *Bak1*/ DKO *Bax* CHO-K1 hücreleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesine kazandırılmıştır. Bu hücre hattı süspansiyon kültüründen, ticari amaçlı biyoreaktörlere geçişle verimli bir şekilde monoklonal antikor üretmeye elverişli olacak şekilde tasarlanmıştır. Literatür taraması sırasında öğrenilen ve yapılan deneylerde uygulanan yöntemler sayesinde çalışmayı gerçekleştiren araştırmacı; Yüksek Lisans Öğrencisi Burcu Nur AYDIN CRISPR/Cas9 sistemi konusunda tecrübe ve bilgi kazanmıştır. İleriki akademik çalışmalarında da bu bilgileri kullanma ve öğretme becerisine sahip olması temenni edilmektedir.

3. YÖNTEM

3.1. Gereçler

Tablo 8: Malzemeler

CHO-K1 hücreleri (# ATCC-CCL-61)
Mutant CHO-K1 hücreleri (BVU)
A-431 hücreleri (# ATCC- CRL-1555)
FBS (Gibco)
RPMI 1640 (Gibco)
DMEM (Gibco)
DMEM F12 medyumu (Gibco)
EXCELL CD Hybridoma (Sigma-Aldrich Co. LLC)
Dimetil sülfoksit (DMSO) (1264ML100) (BioFroxx, neoLab, Heidelberg, Germany)
Sığır Serum Albümin (BSA) (786-086) (G-Biosciences Geno Technology Inc., USA.)
Triton X (Thermo Scientific)
Penisilin-Streptomisin (Gibco)
T-25 cm2 havalandırmalı kapaklı doku kültürü şişeleri (NEST®)
T-75 cm2 havalandırmalı kapaklı doku kültürü şişeleri (NEST®)
125 mL'lik çalkalama şişeleri (Isolab)
Eppendorf tüpler (1,5 ml, 2 mL) (NEST®)
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ADB Buffer, Zymo Research Corp., Irvine, USA)
Nükleaz içermeyen su (MGW) (Thermo Fisher Scientific, Catalog #AM9932)
T4 ligaz enzim kiti (400,000 U/ml, New England BioLabs)
TOP10, *Stbl3*, *DH5α* kimyasal olarak kompetan *E. coli* suşları
Süt tozu (Sigma-Aldrich Co., MO, USA, Product of Switzerland)
Tween20 (Thermo Scientific)
Tris–HCl (Merck)
$Na_2HPO_4 \cdot 7H2O$ (Sigma-Aldrich Co, MO, USA)

KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich Co, MO, USA)
KCl (Sigma-Aldrich Co, MO, USA)
Ampisilin (BioShop, Burlington, CANADA)
LB besi yeri (LB Broth with Agar, Sigma-Aldrich Co, MO, USA)
SOC
Tripton
Maya özütü
NaCl
50 mL konik santrifüj tüpü (NEST®)
15 mL konik santrifüj tüpü (NEST®)
300 mL erlen meyer şişesi (Isolab)
Mikrosantrifüj tüpü (200 µL) (NEST®)
iNtRON's DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotech., KOREA)
QIAamp DNA Mini Genomic DNA Purification Kit (QIAGEN, USA)
İzopropanol
Etanol
Metanol
Polietilenimin (PEI 25K™, Polysciences, Inc., Warrington, USA)
Tripsin-EDTA (%0,25, Fenol kırmızısı içerir) (Gibco)
Puromisin, Santa Cruz, Catalog #sc-108071
pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene)
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Addgene)
pUC19_4sgRNA (GENEWIZ)
6 kuyulu hücre kültürü plakası, (NEST®)
24 kuyulu hücre kültürü plakası (NEST®)
96 kuyulu hücre kültürü plakası, düz dipli (NEST®)
10, 200, 1000 µL pipet uçları (NEST®)
5, 10, 25 mL serolojik pipet (NEST®)
10, 50 mL şırınga (Beybi)
Petri kapları (90 mm çap) (Isolab)

Kriyojenik Tüpler (1,5 ve 2 mL) (NEST®)
1X PBS (Thermo Fisher Scientific)
DNAz içermeyen ddH2O
dNTPler (Thermo Invitrogen)
DreamTaq DNA polimeraz kiti (Thermo)
Phanta Max Super-Fidelity DNA Polimeraz (Vazyme Biotech Co., Ltd., Nanjing, China)
$MgCl_2$ 25mM (Thermo)
Bradford reaktifi
Coomassie® Brilliant blue G 250 (C.I. 42655) (115444 Sigma-Aldrich)
Pierce™ Protein A Agarose (20334) (Thermo Fisher Scientific Pierce Biotech., USA)
Pierce™ Protein A Columns (20356) (Thermo Fisher Scientific Pierce Biotech., USA)
Restriksiyon enzimleri (*AvrII, BsrBI, EaeII, NheI, BbsI*) (New England Biolabs, NEB)
CytoScan LDH Kit (GBiosciences)
Ficoll-Paque® PREMIUM Medium, 1.084 (Cytiva, USA)
rCutSmart Tamponu (NEB #B6004)
Agaroz (Sigma-Aldrich Co, MO, USA)
Etidyum bromür
TBE tamponu
Tris (Hidroksimetil) Aminometan
Tris Baz
Borik asit
EDTA
Tripsin
Sodyum dodesil sülfat
Proteinaz K (#P8044) (Sigma-Aldrich Co, MO, USA)
Sodyum azid
Keçi anti İnsan IgG poliklonal : FITC (Abcam, USA)
Keçi anti İnsan IgG (H+L):HRP (Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, California, USA)
Sülfürik asit
TMB solüsyonu (Thermo Scientific)

Hoechst boyası (Invitrogen, Ltd. Paisley, UK (H3570))
Glisin
Formaldehit

Tablo 9: Cihazlar

37°C CO_2'li inkübatör (Thermo Scientific)
Agaroz jel elektroforezi görüntüleme sistemi (BioRag GelDoc XR+)
Buharlı sterilizatör (Eryiğit)
Buz makinesi (Scotsman)
Dikey SDS-PAGE jel elektroforez sistemi (BioRad)
Hassas terazi (Ohaus)
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (BioRad)
Kemilüminesans görüntüleme sistemi (Fusion Solo S)
Kuru ısı bloğu (Thermo Scientific)
Laminer hava akışlı steril kabin (Thermo Fisher Scientific)
Mikroplaka yıkayıcı (Thermo Scientific)
Mikroplaka okuyucu (BioRad)
Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific)
Orbital çalkalayıcı
pH ölçer (Milwaukee)
Pipetler (1-10 µL, 1-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL) (Gilson)
Pipet pompası (1-25 mL) (Isolab)
Rocker (Külbütör) çalkalayıcı (Benchmark)
Soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter)
Su banyosu (Witeg)
Termal döngüleyici (BioRad)
Ters mikroskop (Zeiss)
Tezgah-üstü soğutmalı santrifüj (Thermo Scientific)
UV lambası
Vakum pompası (KNF Neuberger)

Vorteks (VWR)
Western Blot transfer sistemi (BioRad)
Yatay agaroz jel elektroforez sistemi (BioRad)

Tablo 10: Çözeltiler

%0,7 (w/v) Agaroz çözeltisi	0,7 g Agaroz + 100 mL 0,5X TBE tamponu
LB Sıvı medyum (pH:7.0)	1 g Tripton + 1 g NaCl + 0,5 g Maya Özütü + 100 mL'ye kadar saf su (Otoklavlandıktan sonra kullanılmalıdır.)
LB Katı medyum (pH:7.0)	2 g Agar + 1 g NaCl + 1 g Tripton + 0,5 g Maya Özütü + 100 mL'ye kadar saf su (Otoklavlandıktan sonra petri kaplarına paylaştırılıp, dondurulduktan sonra kullanılmalıdır.)
SOC	2 g Tripton + 0,5 g Maya Özütü + 10 mM NaCl + 2,5 mM KCl + 10 mM $MgCl_2$ + 20 mM Glukoz + 100 mL'ye kadar saf su ($MgCl_2$ ve Glukoz otoklavlandıktan sonra eklenmelidir.)
1X PBS (pH:7.4)	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na_2HPO_4 + 0,245 g KH_2PO_4 + 1 L'ye kadar saf su (Otoklavlandıktan sonra kullanılmalıdır.)
PBST	0,5 mL Tween 20 + 999,5 mL 1X PBS
%5 Yağsız süt çözeltisi	5 gr Yağsız süt tozu + 100 mL PBST tamponu
EIA Kaplama Tamponu (pH:9.6)	3,03 g Na_2CO_3 + 6 g $NaHCO_3$ + 1 L'ye kadar saf su
Bradford reaktifi	0,1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 + 50 mL %95 Etanol + 100 mL %85 (w/v) Fosforik asit + 1 L'ye kadar saf su (Kullanmadan önce filtre kağıdı ile filtre edilmelidir, ışıktan saklanmalıdır.)
1mg/mL PEI (pH:7.0)	500 mg lineer PEI + 400 mL Saf su (PEI'nin tamamen çözünmesi için HCl ile pH 2'nin altına düşürülmelidir.) pH NaOH ile 7'ye çıkartıldıktan sonra 500 mL'ye kadar saf su (0,22 µm filtre ile filtrelenmeli ve alikotlanarak -20 °C'de muhafaza edilmelidir.)
dNTP karışımı	100 mM dATP+ 100 mM dCTP + 100 mM dGTP + 100 mM dTTP (her birinden 25 µL eklenmelidir.) + 900 µL MGW (-20 °C'de muhafaza edilmelidir.)
Etil alkol çözeltisi	700 mL Etanol + 300 mL saf su
Bağlama Tamponu (pH:9.0)	1,5 M Glisin-NaOH + 3 M NaCl

Elüsyon Tamponu (pH:3.0)	0,2 M Glisin-HCl
Nötralizasyon Tamponu (pH:9.0)	1 M Tris-HCl
%10 (w/v) Sodyum azid çözeltisi	10 g NaN_3 + 100 mL'ye kadar saf su
5X TBE Tamponu	121,1 g Tris baz + 61,8 g Borik asit + 7,4 g EDTA + 2 L'ye kadar saf su
%37 Formaldehit	1,85 g Paraformaldehit + 3,5 mL saf su + 90 µL 1 N NaOH (su banyosunda kaynayan suda ısıtılarak yapılmadır. Soğuduktan sonra 0,22 µm filtre ile filtrelenmelidir.)
%4 Formaldehit	1,081 mL %37 Formaldehit çözeltisi + 10 mL'ye kadar saf su

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

A431 ve önceden "Cetuximab" üretmek için transfekte edilmiş CHO-K1 hücre hatları kullanılmıştır. EGFR'yi aşırı ifade eden A431 hücreleri, Dulbecco'nun modifiye Eagle/F12 1X (DMEM ve F12) (Gibco by Life Sciences, EU Approved (Hollanda)) medyumunda, %10 FBS (Gibco by Life Sciences, EU Approved (Güney Amerika)) ve %1 Penisilin-Streptomisin(PES) (Gibco by Life Technologies, Paisley, Birleşik Krallık) ile desteklenerek kültürlenmiştir.. Hücreler 37°C'de %5 CO2 ile inkübe edilmiştir. Stabil olarak 'Cetuximab' ifade eden monoklonal CHO-K1 hücreleri, %10 FBS ve %1 PES ile takviye edilmiş RPMI 1640 (Gibco by Life Technologies, Paisley, UK) kültür medyumunda 75 cm2 hücre kültürü şişelerinde kültürlenmiştir.

3.2.2. Serum Azaltma

Hücrelerin serumsuz ortama adaptasyonu Lonza firmasının yayınladığı hücreleri serum içermeyen medyuma hazırlama protokolleri rehberindeki talimatlarına göre yapılmıştır [152] Kısaca kültürlere 4 x 10^5 hücre/mL ile başlanmış ve %10 FBS (Fetal bovine serum)(Gibco by Life Sciences, EU Approved (Güney Amerika)) ve %1 Penisilin-Streptomisin(PES) (Gibco by Life Technologies, Paisley, Birleşik Krallık)içeren RPMI 1640(Gibco by Life Technologies, Paisley, UK)medyumu ile hücreler desteklenmiştir. Seyreltme işlemine, hücrelerin içinde bulundukları medyumdaki serum içeriğine tamamen uyum sağladıktan sonra geçilmiştir. Hücre yoğunluğu %85'in üzerinde iken ve hücreler içinde

bulundukları medyumdaki serum seviyesine adapte olmuşken, serum seviyesi azaltılmıştır. Seyreltici olarak serum içermeyen vasat kullanılarak 1:2 oranında seyreltme yapılmıştır (%10 FBS, %5 FBS, %2,5 FBS şeklinde). Her pasajlamada hücrelerden stok alınmıştır. Bu amaçla hücreler 500 µL Tripsin-EDTA (%0,25, Fenol kırmızısı içerir) (Gibco by Life Technologies, Kanada) ile 5 dakika 37ºC'de inkübe edilmiş ve hücre kültürü şişelerinin tabanından ayrılmaları sağlanarak 15 mL Falcon tüpe (NEST®) alınmıştır. Tripsinize edilen hücreler 3000 x rpm'de 3 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Çöktürülen hücrelerin üzerine 500 µL vasat eklenerek nazikçe süspanse edilmiştir. Hücre miktarı %40 olacak şekilde %50 FBS ve %10 DMSO ile hücreler -80ºC'de daha sonra da -150ºC'de stoka kaldırılmıştır.

3.2.3. CRISPR/Cas9 ve pUC19_4sgRNA Vektörlerinin Hazırlanışı

pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) ve pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) CRISPR/Cas9 plazmidleri vektör plazmid olarak kullanılmıştır. Bu plazmidler Cas9 enzimini kodlayan gen bölgesine ek olarak değişmeyen sgRNA scaffold kısmı ve plazmidle klonlanacak olan sgRNA (insert) için klonlama bölgesi içermektedir. Klonlama bölgesinin bulunduğu kısımda *BbsI* restriksiyon enziminin kesim bölgesi bulunmaktadır. Bu sayede CRISPR/Cas9 plazmidi restriksiyon enzimi ile kesilip lineer hale getirilir.

pUC19 küçük, ampisilin direnç genini kodlayan, vektör omurgası olarak kullanılan bir plazmiddir. Bu plazmidin kullanılış amacı, seçilmiş olan 4 tane sgRNA'nın art arda eklenip tek seferde, CRISPR/Cas9 plazmidine aktarımını sağlamak amacıyla, bu sgRNAları klonlamaktır. sgRNAların başında ve sonunda *BbsI-Hf* enzimi için kesim bölgeleri bulunmaktadır.

3.2.3.1. Restriksiyon Enzim Kesimi

BbsI (New England Biolabs(NEB)) restriksiyon enzimi kullanılarak 37°C'de CutSmart (10X) Buffer (NEB) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

pX458 ve pX459 plazmidlerinin kesiminde, 5 µg plazmid için 0,5 µL *BbsI* enzimi, 10 µL 10X CutSmart Buffer, 50 µL moleküler kalite su (MGW) kullanılarak total hacim 100 µL'ye getirilmiştir.

pUC19_4sgRNA plazmidinin kesiminde, 10 µg plazmid için 1 µL *BbsI* enzimi, 20 µL 10X CutSmart Buffer, 114 µL MGW kullanılarak total hacim 200 µL'ye getirilmiştir.

Kesim reaksiyonundan sonra ürünler %0,7 konsantrasyonundaki agaroz jelde yürütülerek kesim doğrulanmıştır. Ürünler tekrar jelde yürütülüp, Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (ADB Buffer, Zymo Research Corp., Irvine, USA) kullanılarak jelden elüe edilmiştir. Bu işlem neticesinde yaklaşık 25 ng/µLpX458 ve pX459 plazmidi ve yaklaşık 10 ng/µL 4sgRNA inserti elde edilmiştir.

3.2.3.2. T4 Ligaz Enzimi ile Ligasyon

Her 3 plazmid de *BbsI* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra insert, lineerize edilmiş CRISPR/Cas9 vektörüne komplementer olarak bağlanıp entegre edilmiştir ve T4 ligaz enzim kiti (400,000 units/ml, New England BioLabs) ile bu ürünlerin ligasyonu sağlanmıştır.

Bu işlem için 1 µL T4 DNA Ligaz ile 2 µL 10X T4 DNA Ligase Buffer kullanılarak, vektör:insert oranı 1:3 olacak şekilde 50 ng/µL (3 µL) vektör DNA (lineer pX458 ve lineer pX459) ve pX458 plazmidi için 18.21 ng/µL (3 µL), pX459 plazmidi için 18,50 ng (3 µL) insert (4sgRNA kaseti) ve toplam hacmi 20 µL'ye tamamlayacak kadar (11 µL) MGW eklenmiştir. Reaksiyon 16°C'de gece boyu inkübasyondan sonra 65°C'de 10 dakika ısı inaktivasyonu yapılmıştır.

Elde edilen ligasyon ürünlerine sırasıyla PX458_4sgRNA ve PX459_4sgRNA adları verilmiştir.

3.2.4. Transformasyon

Kompetan *Stbl3, Top10* ve *DH5α* suşları, pX458_4sgRNA ve pX459_4sgRNA plazmidleri ile transforme edildi.

Bu amaçla 50 ng/mL plazmid kullanılarak, 50 µL*Stbl3, Top10* ve *DH5α* suşları transforme edilmiştir. Öncelikle plazmidleri ve kompetan hücreler buz üzerinde 10 dakika bekletilmiş ve ardından, buzdan ayırmadan, her bir suş için 50 ng/mL plazmid 50 µL*Stbl3, Top10* ve *DH5α* suşları üzerine nazikçe eklenmiştir. Tekrar buz üzerinde 20 dakika inkübasyondan sonra 42°C'ye ayarlanmış su banyosunda 2 dakika ısı şoku uygulanmıştır. Hücreler hızlı bir şekilde tekrar buz üzerine alınmış ve 5 dakika buzda bekletildikten sonra SOC medyumundan her bir tüpe 250µL eklenmiştir. Hücreler 1 saat, 37°C'de ve 250 rpm'de çalkalandıktan sonra 100 µg/mL ampisilin (BioShop, Burlington, CANADA) içeren LB agar (LB Broth with Agar, Sigma-Aldrich Co, MO, USA) üzerine yayılarak gece boyunca 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Ertesi gün oluşan kolonilerden birer adet seçilerek miniprep için kültür başlatılmıştır.

DH5α suşu diğer 2 kompetan *E. coli* suşundan daha üretken bulunmuştur. Plazmidler, üreticinin protokolüne göre iNtRON's DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology by Lilif®, KOREA) ile izole edilmiştir.

3.2.5. İzole Edilen Plazmidlerin Restriksiyon Enzim Kesimi İle Doğrulamasının Yapılması

Vektör plazmid ile sgRNAların doğru bir şekilde birleştiğinden emin olmak için sadece vektör plazmid üzerinde bulunan ve plazmidi tek bir yerinden kesen *BglII* (NEB) enzimi ve sadece 4sgRNA kaseti içinde bulunan ve kaseti tek bir yerinden kesen *AvrII* (NEB) enzimi ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla 250 ng/mL plazmid için 0,5 µL *AvrII* enzimi ve 0,25 µL *BglII* enzimi üzerine 2,5 µL 10X 3.1 NEBuffer™ eklenip, 20 µL moleküler kalite su (MGW) ile toplam hacim 25 µL'ye tamamlanmıştır ve 37°C'de bir saat inkübe edilmiştir.

Reaksiyon sonucunda kesim ürünleri % 0,7 (0,5X TBE'de) konsantrasyonundaki agaroz (Sigma-Aldrich Co, MO, USA) jelde 120 V, 400 mA koşullarında 30 dakika yürütülmüş ve jel görüntülenmiştir.Bu deney sonucunda, hesaplandığı gibi doğru uzunluklarda parçaların oluştuğu gösterilmiştir. Bu sayede doğru insertin plazmide doğru şekilde entegre olduğu doğrulanmıştır.

3.2.6. PEI ile Transfeksiyon

Transfeksiyon için lineer PEI (PEI 25K™, Polysciences, Inc., Warrington, USA) solüsyonu (1 mg/mL) kullanılmıştır. 0,1 x 10^6hücre/mL, 6 kuyulu plağa pasajlanmıştır. Ertesi gün hücreler gözlenmiş ve hücrelerin %70 konfluansa ulaştığı görülmüştür. Medya uzaklaştırılmıştır ve hücreler DPBS ile 2 kere yıkandıktan sonra PES (Gibco by Life Technologies, Paisley, UK) içermeyen FBS (Gibco by Life Sciences, E.U. Approved (South American)) ile desteklenmiş RPMI 1640 (Gibco by Life Technologies, Paisley, UK) eklenmiştir. Bu arada PEI kompleksi hazırlanmıştır.

Bunun için, kuyu başına 3,3 µg plazmid DNA (pX458_4sgRNA ve pX459_4sgRNA), son hacmi 50 µL olacak şekilde 150 mM NaCl içinde seyreltilmiş, ardından karışım vortekslenmiştir ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 10 dakikalık inkübasyondan sonra 10 µg PEI (1:3 v/v, plazmid DNA:PEI) karışıma eklenmiştir ve bu kompleks yine vortekslenmiştir. 1 saat sonra, kuyulara PEI kompleksi ilave edilmiştir. Hücreler 4 saat

37°C'de %5 CO2 ile inkübe edildikten sonra, vasat uzaklaştırılmış ve kuyular DPBS ile yıkanmıştır, ardından PES içermeyen FBS ile desteklenmiş RPMI 1640 kuyulara eklenmiştir.

3.2.7. FACS

Transfeksiyondan sonra hücreler, daha fazla analiz için poliklonal hücre popülasyonunda bir yoğunluğa ulaşana kadar büyümeye bırakıldı. pX458_4sgRNA plazmidi ile transfekte edilen hücreler, akış sitometrisi ile seçilip ayrıştırılmıştır. Hücreler tripsinize edilerek toplanmış ve 3000 x rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir, ardından süpernatant uzaklaştırılmıştır ve hücre pelleti FACS tamponu (DPBS içinde %2,5 BSA) ile uygun şekilde yeniden süspanse edilmiştir. GFP ifade eden hücreler poliklonal hücre popülasyonundan izole edilmiş ve %50 FBS ve %2 PES ile takviye edilmiş RPMI 1640 ortamı ile doldurulmuş 5 mL'lik bir tüp içinde toplanmıştır. Bu işlem hücreler için yıpratıcı olduğu için hücreler, %20 FBS ve %1 PES ile takviye edilmiş RPMI 1640 kültür ortamında 75 cm^2'lik hücre kültürü şişelerinde pasajlanmıştır. Hücreler 1-2 x 10^6hücre/mL'ye ulaşana kadar kültürde bekletilmiştir.

3.2.8. Puromisin Öldürme Eğrisi

pX459_4sgRNA ile transfekte edilmiş hücrelerin izolasyonu için optimal antibiyotik konsantrasyonunu belirlemek için Puromisin öldürme eğrisi deneyi yapılmıştır. Bu amaçla, 2 x 10^5hücre/mL, 24 kuyulu bir plakaya pasajlanmıştır. Ertesi gün hücrelerin %60-80 konfluansa ulaşıp ulaşmadıkları kontrol edilmiştir. Daha sonra eski medyum uzaklaştırılmıştır ve hücreler iki kez DPBS ile yıkanmıştır. Medya 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 7,5, 10 µg/mL puromisin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA) çift kuyulara sırasıyla eklenmiştir. Çift NC (antibiyotik yok) ve PC (%0,1 Triton X) kuyuları dâhil edilmiştir. Medya 2 hafta boyunca her 2 günde bir değiştirilmiş ve kuyular kontrol edilmiştir. Hücreler gözlenmiş ve CHO-K1 hücre hattı için optimal doz 7,5 µg/mL puromisin olarak belirlenmiştir.

Daha sonra pX459_4sgRNA plazmidi ile transfekte edilmiş olan hücreler 7,5 µg/mL puromisinli tam RPMI 1640 medyumu kullanılarak iki gün 37°C'de %5 CO_2'li ve %5 nemli etüvde inkübe edilmiştir.

3.2.9. Tek Hücre Kültürü (Klonal İzolasyon)

Monoklonal hücre hatlarının üretilmesi için, 2 transfeksiyon deneyinin sonucunda elde edildikten sonra akış sitometrisi ve 7,5 µg/mL puromisin kullanılarak seçilmiş olan poliklonal hücre popülasyonlarının seyreltilmesi ile tek hücre kültürleri yapılmıştır.

Bunun için hücreler tripsinize edilip toplandıktan sonra 3000 x rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra hücreler Tripan mavisi ile boyanmış ve Thoma lamında sayılmıştır. Mililitrede üç hücre olacak şekilde bir konsantrasyon elde edilmiş, son kuyu dışında 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 100 µL bu hücre solüsyonundan dağıtılmıştır. Mikroskobu odaklayabilmek için son kuyuya 1 x 10^5 hücre/mL ekilmiştir. İlerleyen günlerde hücre büyümesi gözlemlenmiş ve tek hücreden köken alan koloniler seçilmiştir. Hücreler yeterli doluluk oranına ulaştığında, 24 kuyulu bir plakaya pasajlanmıştır. Daha sonra hücre kültürleri genişletilmiş ve hücreler 6 kuyulu plakalara pasajlanmıştır. Bu aşamada hücrelerin içinde büyüyüp %100 doluluk oranına ulaştıkları medyumlar toplanmıştır ve daha sonra yapılacak olan enzim immüno assay (EIA) deneyi için 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.10. CRISPR/Cas9 Aracılı Gen Nakavtının Değerlendirilmesi

3.2.10.1. EIA ile Transfekte edilen hücrelerin mAb üretimindeki değişimlerin belirlenmesi

Transfeksiyondan sonra hücrelerin süpernatantları toplanmıştır. Her bir örnekten 100 µL, 100 µL kaplama tamponu (coating buffer) ile karıştırılmış ve ardından 96 kuyulu plakaya yüklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyondan sonra kuyular 200 µL yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır. Bloklama %5 yağsız süt (5% skim milk (Sigma-Aldrich Co., MO, USA, Product of Switzerland) TBST içinde) ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle yapılmıştır. Daha sonra 96 kuyulu plaka 37°C'de 1 saat aspire edilmiştir. 100 µL Bio-Rad Goat anti Human IgG (H+L):HRP (1:2000) (Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, California, USA) eklenmiş ve örnekler 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra plaka, 200 µL yıkama tamponu ile üç kez tekrar yıkanmıştır. Kuyulara 100 µL Tetrametilbenzidin (TMB) (Thermo Scientific) yüklenmiş ve 10 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından reaksiyon 100 µL 2N sülfürik asit (H_2SO_4) ile durdurulmuştur. Sonunda 415 ve 450 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.10.2. PZR RFLP

Bu yöntem, nakavt edilecek *Bak1* ve *Bax* genlerine özgü primerlerle kurulan polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) sonucunda çoğaltılan amplikonların, sgRNAların dizaynı aşamasında, bu sgRNAların her birine özgü seçilen restriksiyon enzimleri ile kesilmesi temeline dayanmaktadır. Amplikon boyutunda meydana gelen değişimler ve restriksiyon enzimi kesiminin gerçekleşmesi, gen nakavtının göstergeleridir.

Bu deney için EIA sonucuna göre transfeksiyon öncesi mAb üretimine kıyasla daha fazla mAb üreten ikişer tane, daha az mAb üreten birer tane hücre kolonisine ait genomik DNA'lar kullanılmıştır. Genomik DNA'lar QIAamp DNA Mini Genomic DNA Purification Kit (QIAGEN, USA) kullanılarak, üreticinin talimatlarına göre izole edilmiştir. Gen bölgelerini çoğaltmak için hata düzeltme mekanizması olan Phanta Max Super-Fidelity DNA Polimeraz enzimi (Vazyme Biotech Co., Ltd., Nanjing, China) kullanılmıştır.

PZR değerlendirmesinde *Bax* geni için; 12,5 µL 2X Phanta Max Buffer, 0,05 U/µL Phanta Max Super-Fidelity DNA Polimeraz, 1 mM dNTP, 0,5 mM primer (f+r), 1 µL template DNA (~100 ng/µL), total hacmi 25 µL'ye tamamlayacak kadar MGW kullanılmıştır. Reaksiyon 35 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 15 saniye, 72°C'de 1 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. *Bak1* geni için; 12,5 µL 2X Phanta Max Buffer, 0,05 U/µL Phanta Max Super-Fidelity DNA Polimeraz, 1 mM dNTP, 0,5 mM primer (f+r), 1 µL template DNA (~100 ng/µL), total hacmi 25 µL'ye tamamlayacak kadar MGW kullanılmıştır. Reaksiyon 35 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 15 saniye, 72°C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 11: PZR değerlendirmesi için tasarlanan primer sekansları ve reaksiyon sonucunda oluşması beklenen amplikon boyutları

Genler	Primerler	Sekanslar	Amplikon Boyutu
Bax	İleri	5'-CCCCGCTTCCATTCACATC-3'	1777 bp
	Geri	5'-GATACACACCAACCACACCTC-3'	
Bak1	İleri	5'-CTGAGGAGAGAGTGGGGAAG-3'	4027 bp
	Geri	5'-AGGGGTGGGTTACAGAGTG-3'	

PZR'den sonra, ürünler %0,7'lik konsantrasyondaki agaroz jelde 120 V, 400 mA, 30 dk yürütülmüştür.

Agaroz jel elektroforezinden sonra PZR ürünleri, Zymo jel elüsyonu ve DNA saflaştırma kiti ile ayrıştırılmıştır. Daha sonra uygun restriksiyon enzimleri ile üreticinin talimatlarına göre kesilmiştir. Kullanılan tüm enzimler NEB markasına aittir. Son hacim 25 µL olacak şekilde MGW ile tamamlanarak; 250 ng/µL amplikon üzerine *Bax* geni için birer ünite *EaeI* ve *NheI* restriksiyon endonükleazları, *Bak1* geni için birer ünite *AvrII* ve *BsrBI* restriksiyon endonükleazları ve 10X CutSmart Buffer kullanılarak, kesim reaksiyonu gerçekleştirilmek üzere kullanılmıştır.Reaksiyon 37°C'de gece boyu inkübasyon sonrasında 65°C'de ısı inaktivasyonu ile enzimler etkisiz hale getirilerek durdurulmuştur. Kesim

reaksiyonundan sonra, örnekler %0,7'lik konsantrasyondaki agaroz jelde 120 V, 400 mA, 30 dk yürütülmüştür.

3.2.11. Medyum Replasmanı

Rodrigues, M.E. ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde yapılmıştır.[53] Serum seviyesi % 0,625'e çekildiğinde, kademeli olarak RPMI 1640 medyumundan, kimyasal olarak tanımlanan ve serum içermeyen EX-CELL® CD Hybridoma (EX-CD) (Sigma-Aldrich Co. LLC) medyumuna geçilmiştir. Kısaca; doluluk oranı %85'eulaşıldığında, hücrelerin 500 µL Tripsin-EDTA ile 37ºC'de 5 dakika inkübe edilerek, kap tabanından ayrılmaları sağlanmıştır. Hücre kültürü şişelerine 1:3 oranında (%0,625 FBS'li) RPMI 1640 medyumu ile seyreltilmiş EX-CD vasatına 8 x 10^5 hücre/mL eklenip, bu hücreler %5 CO_2'li ortamda, 37°C'de inkübe edilmiştir. Periyodik olarak 2-3 günde bir vasat değişimi yapılmıştır. Hücreler medyuma uyum sağladıktan sonra 1:1 oranında serum içermeyen (SF) RPMI 1640 medyumu (SFM) ve EX-CD karıştırılıp hücreler bu vasat içinde inkübe edilmiştir. Hücreler bu medyuma da uyum sağlandıktan sonra kademeli olarak EX-CD medyumu artırılıp, RPMI medyumu azaltılmıştır(3:1). Son adımda FBS içermeyen %100 EX-CD medyumu kullanılmış ve hücrelerin bu SFM EX-CD'ye tamamen adapte olması sağlanmıştır.

3.2.12. Süspansiyon Kültürüne Geçiş

Hücreler serum miktarı azaltıldıkça kültür şişesinin tabanından ayrılma eğilimi göstermektedir, serumun tamamen çekilmesinden önce kültürde yüzen hücrelerin gözlemlenmesi yaygındır. Bu nedenle süspansiyon kültürüne geçişten önce SFM adaptasyonunun gerçekleştirilmesi önerilmektedir. [53] Hücreler SFM'ye tamamen uyum sağladıktan sonra süspansiyon kültürüne geçiş yapılmıştır. 125 mL'lik çalkalama şişesine 30 mL vasat eklenip 3 tane T-75 cm^2'lik hücre kültürü şişesinde inkübe edilmiş hücreler (toplamda 5 x 10^6hücre/mL) bu çalkalama şişesine alınmıştır. Çalkalama şişeleri 80-120 rpm'de, 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücre doluluk oranı 2 katına çıktığında (10 x 10^6hücre/mL), 2 x 10^6 hücre/mL ile yeni pasajlar alınıp süspansiyon kültürü genişletilmiştir.

3.2.13. MAb Saflaştırma

Süspansiyon kültüründen elde edilen mAbların saflaştırılması için Pierce Protein A Agaroz çözeltisi kullanılmıştır. Üreticinin talimatlarına göre yapılmıştır. [153] Bağlama, elüsyon ve nötralizasyon tamponları Proteus markasına ait protein a antikor saflaştırma kaynağından faydalanılarak hazırlanmıştır. [184]

Kullanımdan önce tüm çözeltilerin oda sıcaklığına gelmesi gerekmektedir.

500 µL Protein A agaroz çözeltisi Protein A kolonunun üzerine eklendikten sonra üzerine 5 mL bağlama tamponu (1,5 M glisin/NaOH, 3 M NaCl pH 9.0) eklenmiş ve kolondan akıp gitmesi sağlanmıştır. Herhangi bir baloncuğun oluşmasına engel olmak amacıyla kolonun önce üst kapağı, çözeltiler eklendikten sonra alt kapağı açılmalıdır. Daha önce hücre kültüründen sonra toplanan medyum 1:1 oranında bağlama tamponu ile karıştırıldıktan sonra 10.000 x g'de 20 dakika santrifüjlendikten ve süpernatant 0,22 µm'lik filtre ile filtrelendikten sonra kolona aktarılmıştır. Örnek tamamen kolondan aktıktan sonra kolona 15 mL bağlama tamponu eklenmiştir. Bağlama tamponu tamamen aktıktan sonra mAbı elde etmek için elüsyon (0,2 M glisin/HCl pH 3.0) tamponu kullanılmıştır. Fizyolojik pH aralığına acilen getirilebilmesi için her 1 mL'lik elüsyon tamponu için toplama tüpünde 100 µL nötralizasyon tamponu (1 M Tris/HCl pH 9.0) kullanılmıştır. Elüsyon tamponu kolondan tamamen geçip toplama tüpünde nötralizasyon tamponu ile birleştiğinde içerisinde mAbların olduğu bir çözelti meydana gelmektedir. Sonraki aşamalarda kullanmak üzere elde edilen mAb 4°C'de muhafaza edilmiştir. Kolonu tekrar kullanabilmek amacıyla kolondan sırasıyla 12 mL elüsyon tamponu ve 12 mL bağlama tamponu akıtıldıktan sonra10 mL %0,02 sodyum azid çözeltisi eklenmiş, 5 mL kaldığı zaman kolonun her iki ucu da kapatılarak 4°C'de dik pozisyonda saklanmıştır.

3.2.14. MAb Kontrolleri

Süspansiyon kültürüne geçildikten sonra hücreler tarafından üretilen mAblar, gen düzeyinde, protein düzeyinde ve fonksiyonel olarak test edilmiştir.

3.2.14.1. PZR

PZR değerlendirmesinde *Bax* geni için; 12,5 µL 2X Phanta Max Buffer, 0,05 U/µL Phanta Max Super-Fidelity DNA Polimeraz, 1 mM dNTP, 0,5 mM primer (f+r), 1 µL kalıp DNA (~100 ng/µL), total hacmi 25 µL'ye tamamlayacak kadar MGW kullanılmıştır. Reaksiyon 35 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 15 saniye, 72°C'de 1 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. *Bak1* geni için; 12,5 µL 2X Phanta Max Buffer, 0,05 U/µL Phanta Max Super-Fidelity DNA Polimeraz, 1 mM dNTP, 0,5 mM primer (f+r), 1 µL kalıp DNA (~100 ng/µL), total hacmi 25 µL'ye tamamlayacak kadar MGW kullanılmıştır. Reaksiyon 35 döngü boyunca 95°C'de 15 saniye, 57°C'de 15 saniye, 72°C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ağır zincir (HC) için 2,5 µL 10x Dreamtaq Buffer,0,05 U/µL DreamTaq polimeraz (Thermo Scientific (5U/µL)), 0,6µL $MgCl_2$, 1 mM dNTP, 0,5 mM primerler (f+r),

1 µL kalıp DNA (~100 ng/µL), total hacmi 25 µL'ye tamamlayacak kadar MGW kullanılmıştır. Reaksiyon 35 döngü boyunca 95°C'de 1 dakika, 57°C'de 25 saniye, 72°C'de 1 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.Hafif zincir (LC) için 2,5 µL 10x Dreamtaq Buffer,0,05 U/µL DreamTaq polimeraz, 0,6µL $MgCl_2$, 1 mM dNTP, 0,5 mM primerler (f+r), 1 µL kalıp DNA (~100 ng/µL), total hacmi 25 µL'ye tamamlayacak kadar MGW kullanılmıştır. Reaksiyon 35 döngü boyunca 95°C'de 1 dakika, 58°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 12: PZR değerlendirmesi için tasarlanan primer sekansları ve reaksiyon sonucunda oluşması beklenen amplikonların boyutları

Genler	Primerler	Sekanslar	Amplikon Boyutu
Bax	İleri	5'-CCCCGCTTCCATTCACATC-3'	~900 bp
	Geri	5'-GATACACACCAACCACACCTC-3'	
Bak1	İleri	5'-CTGAGGAGAGAGTGGGGAAG-3'	~700 bp
	Geri	5'-AGGGGTGGGTTACAGAGTG-3'	
HC	İleri	5'-ACTCTGGTCACTGTCTCTGC-3'	831 bp
	Geri	5'-ATTGCTCTCCCACTCCACG-3'	
LC	İleri	5'-CCTCCGCTTACTCCGACATC-3'	523 bp
	Geri	5'-TCCTTAGAGTCCTGCTCGGT-3'	

PZR'den sonra, ürünler %0,7'lik konsantrasyondaki agaroz jelde 120 V, 400 mA, 30 dk yürütülmüştür. GelDoc XR+ jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

3.2.14.2. Bradford Testi

Bradford yöntemi ile antikorların miktarı belirlenebilmektedir. Bu yöntemin esasında proteinlerin asidik ve bazik grupları ile kimyasal reaksiyona giren organik boyaların meydana getirdiği renk değişiminin 595 nm dalga boyunda ölçülmesi bulunmaktadır. Böylelikle referans alınan bir pozitif kontrolün ve arka planda kirliliğe sebep olan bir kör (blank) kontrolün kullanılmasıyla miktarı belirlenmek istenen proteinin seri dilüsyonları hazırlanmaktadır. Organik boya içeren reaktif çözelti (50 mL %95 etanol çözeltisinde çözdürülmüş 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 üzerine 100 mL fosforik asit eklendikten sonra saf su ile bir litreye tamamlanarak elde edilmektedir.) ile örneklerin reaksiyonu sonucunda meydana gelen renk değişimi sonrasında 595 nanometrede ölçüm yapılmaktadır.

Öncelikle miktarı belirlenmek istenen örnek ve pozitif kontrol olarak kullanılan miktarı bilinen protein çözeltisi (1 µg/mL Cetuximab kullanılmıştır) (Cetuximab; Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Bilimler Bölümü Onkoloji Bilim Dalı, Prof. Dr. Hacı Mehmet Türk tarafından hediye edilmiştir.) seri olarak kör kontrol olarak kullanılan solüsyon (10:1 Protein A elüsyon tamponu:nötralizasyon tamponu) ile seyreltilerek on adet çözelti hazırlanmıştır. 96 kuyulu plakanın kuyularına her örnekten iki tekrar yapılarak (duplike) 150 µL yüklenmiş daha sonra üzerlerine 150 µL Bradford reaktif çözeltisi eklenip çalkalayıcı ile otuz saniye karıştırılıp on dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak 595 nm'de absorbans değerleri bir mikro-plaka okuyucusunda ölçülmüştür. Elde edilen değerlerin ortalamaları alınıp, kör kontrol değeri diğer örneklerin ortalamalarından çıkartıldıktan sonra, standart eğri hesaplaması yapılarak bir grafik oluşturulup protein miktarı belirlenmiştir.

3.2.14.3. EIA

Bir gün öncesinde kuyu başı 2 x 10^5A-431 hücresi 96 kuyulu plakaya yüklenmiştir. Ertesi gün 200 µL PBS ile 3 kere yıkanıp 100 µL %4formaldehit çözeltisi ile oda sıcaklığında bir saat fiksasyon yapılmıştır. Sonrasında 200 µL PBS ile 3 kere yıkanıp her bir örnekten (pozitif kontrol (Cetuximab), kör kontrol (1X PBS ve/veya Bradford ile aynı olan 1:9 Nötralizasyon:Elüsyon tamponu) ve saflaştırılmış mAb çözeltisi) 100 µL, 100 µL kaplama tamponu (coating buffer) ile karıştırılmış ve ardından 96 kuyulu plakaya yüklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyondan sonra kuyular 200 µL yıkama tamponu ile üç kez yıkanmıştır. Bloklama %5 yağsız süt (5% skim milk (Sigma-Aldrich Co., MO, USA,Product of Switzerland) TBST içinde) ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle yapılmıştır. Daha sonra 96 kuyulu plaka 37°C'de 1 saat aspire edilmiştir. 100 µL keçi anti insan IgG (H+L):HRP (1:2000) eklenmiş ve örnekler 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra plaka, 200 µL yıkama tamponu ile üç kez tekrar yıkanmıştır. Kuyulara 100 µL TMB yüklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında karanlık koşulda inkübe edilmiştir. Ardından reaksiyon 100 µL 2N sülfürik asit ile durdurulmuştur. Sonunda 415 nm ve 450 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.14.4. IFA

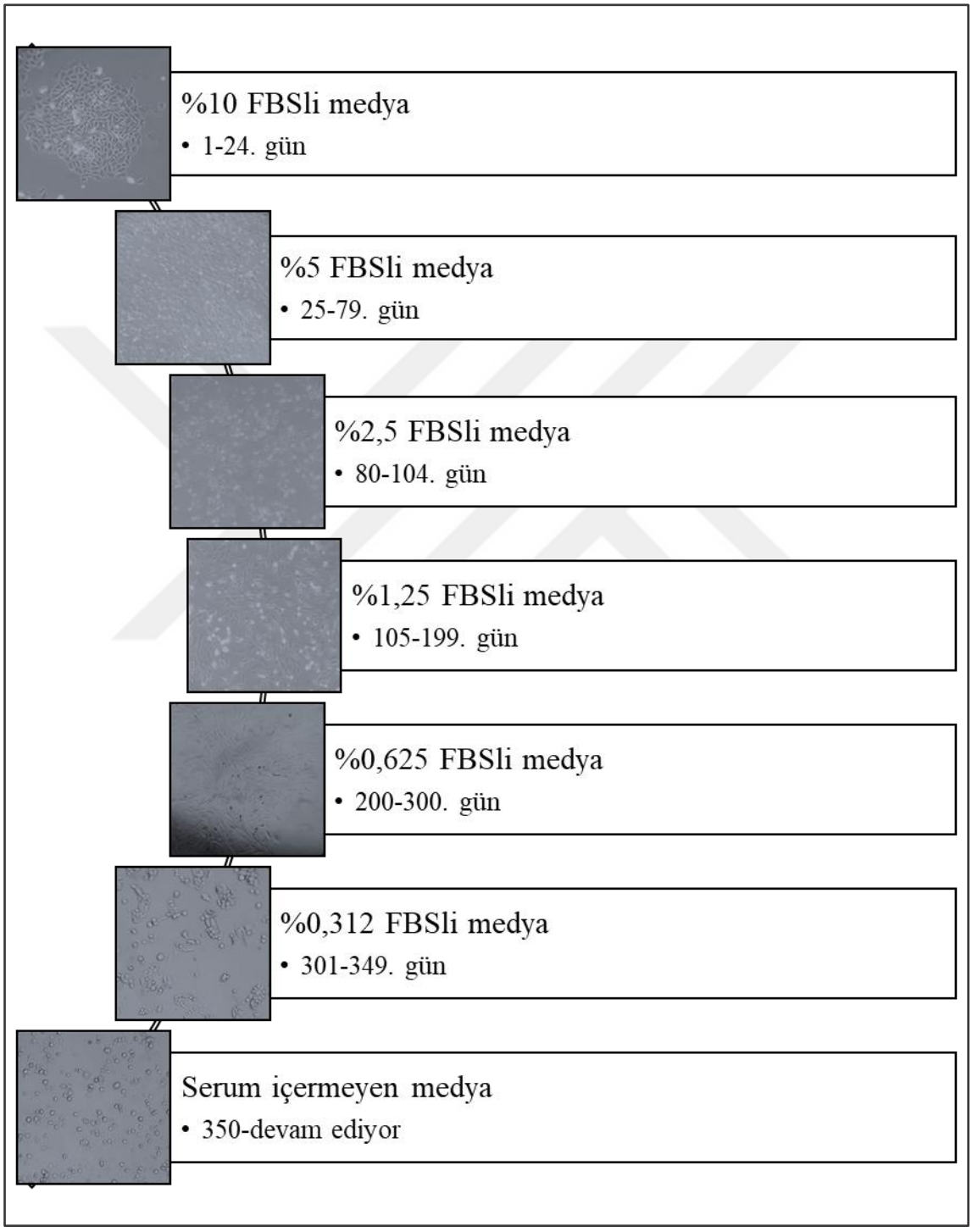
Bir gün öncesinde kuyu başı 1,5 x 10^5A-431 hücresi 96 kuyulu plakaya yüklenmiştir. Ertesi gün 200 µL PBS ile 3 kere yıkanıp 100 µL 4% formaldehit ile oda sıcaklığında bir saat fiksasyon yapılmıştır. Sonrasında 200 µL PBS ile 3 kere yıkanıp her kuyuya 200 µL bloklama tamponu (blocking buffer) (PBS içinde (%1 BSA, 22,52 mg/ml glisin, 0,1% Tween20))

eklenerek 37 °C'de 1 saat bloklanması sağlanmıştır. Sonra kuyular aspire edilip, numuneler kuyulara 100 µL olacak şekilde direkt yüklenmiştir. 1 saat 37°C inkübasyon sonrasında kuyular 3 kez üçer dakika PBS ile yıkanıp 100 µL 1/1000 keçi anti insan IgG FITC (FITC Goat polyclonal to Human IgG(ab81051) Abcam, United States) ile oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat inkübe edilmiştir. Kuyular tekrar 3 kez üçer dakika PBS ile yıkandıktan sonra her kuyuya 100 µL 10 µg/ml Hoechst boyası (Invitrogen, Ltd. Paisley, UK (H3570)) (1x PBS içinde) eklenip görüntüleme yapılmıştır.

3.2.14.5. Sitotoksisite

Antikor bağımlı hücresel sitotoksisite (ADCC) ve kompleman bağımlı sitotoksisite (CDC), üreticinin protokolüne göre CytoScan LDH Kiti (GBiosciences) kullanılarak incelenmiştir. ADCC aktivitesinin ölçülmesi için, sağlıklı gönüllülerden Ficoll-Paque® PREMIUM Medium, 1.084 (Cytiva, ABD) ile periferik kan mononükleer hücreleri izole edilmiş ve bu hücreler efektör hücreler olarak kullanılmıştır. Hedef hücreler (A-431), RPMI medyumunda süspanse edilmiş ve 5 x 10^3 hücre/kuyu oranında U tabanlı 96 kuyulu mikro plakaya yüklenmiştir. Monoklonal antikorlar 0,001 ila 100 µg/mL arasındaki çeşitli konsantrasyonlarda her bir kuyuya iki kopya halinde eklenmiş ve efektör hücreler, 10:1'lik bir efektör : hedef hücre oranında kullanılmıştır. CDC aktivitesinin ölçülmesi için, kompleman kaynağı olarak sağlıklı bir gönüllüden insan serumu alınmıştır. 1:3 son konsantrasyon oranını sağlamak için kuyulara 34 µL insan serumu eklenmiştir. Plakalar 4 saat 37°C'de inkübe edilmiş ve reaksiyon durdurulmuştur, ardından laktat dehidrojenaz salınımını belirlemek için 490 nm ve 680 nm'de süpernatantların absorbansı ölçülmüştür. Hesaplamalar Kimura ve arkadaşlarının [189] açıkladığı şekilde regresyon analizi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR



Şekil 24: Hücre kültürü zaman çizelgesi

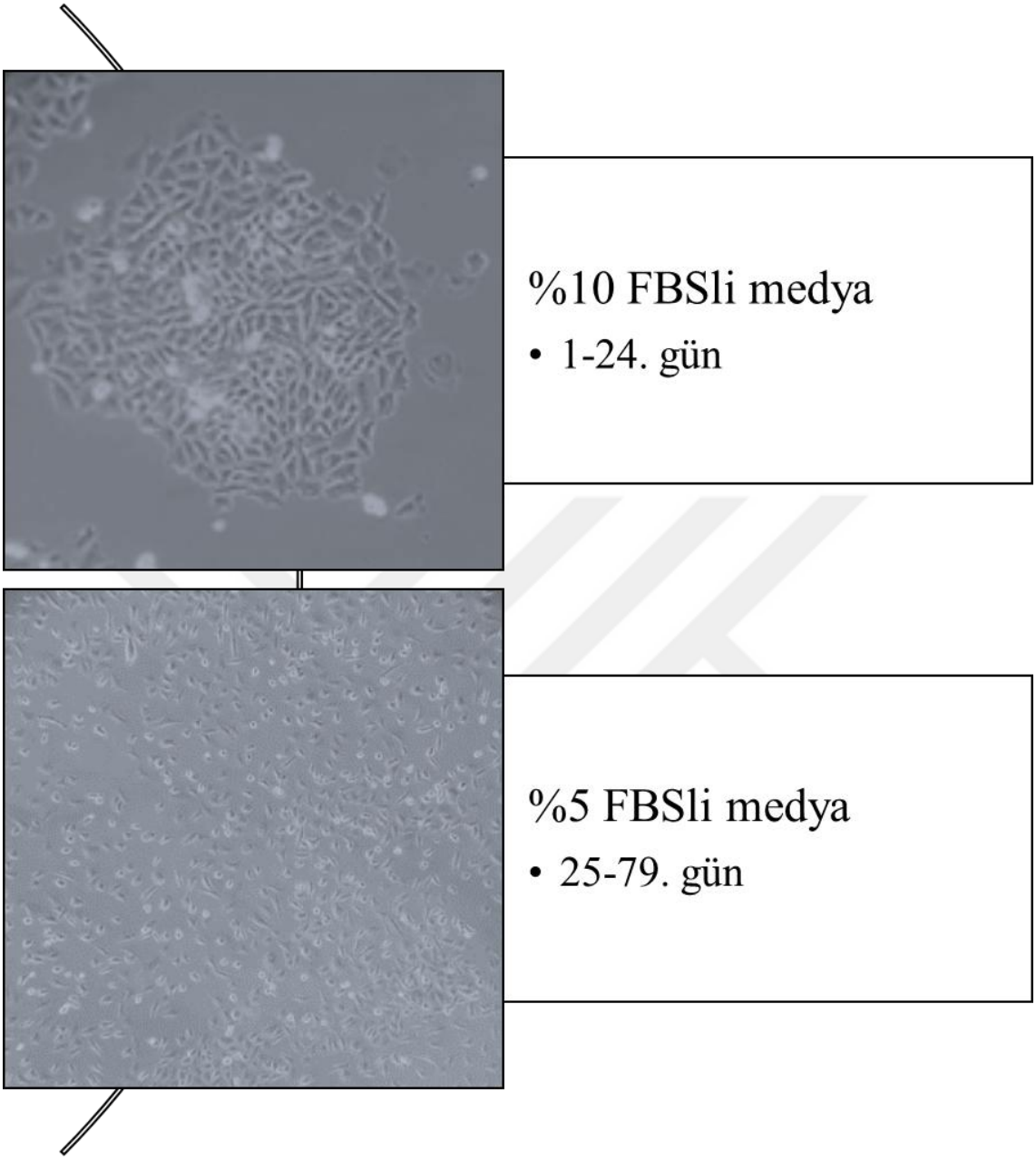
4.1. Serum Azaltma

Monoklonal antikor üretiminin miktarını artırabilmek amacıyla hücre kültürünün genişletilmesi ve süspansiyon kültürü ile biyoreaktörlere geçiş için hazırlığın sağlanması amaçlanmaktadır. Bunun ilk adımı olarak hücrelerin içinde bulundukları hücre kültürü şişesine yapışmalarını (adherens) ve tek tabaka (monolayer) olarak üretilmelerini teşvik eden, bazı büyüme faktörlerini içermesine karşın lottan lota farklılık gösterdiği gerekçesi ile standardizasyonu bozan ve hayvansal kaynaklı bir ürün olan serumun bu sistemden uzaklaştırılması gerekmektedir.

Hücrelerin serum içermeyen ortama adapte olması için daha önce de bahsedilen Lonza firmasının yayınladığı hücreleri serum içermeyen medyuma hazırlama protokolleri rehberindeki talimatlar uygulanmıştır. Buna göre 4 x 10^5 hücre ile kültüre başlanmış, %10 FBS ve %1 PES içeren RPMI medyumu ile hücreler desteklenmiştir.

Hücrelerin kültüre adaptasyonu ve belirli bir çoğalma hızına ulaşmasından sonra medyumdaki FBS oranı %5'e düşürülmüştür. Hücrelerin bu medyuma tamamen uyum sağlaması yaklaşık iki ay kadar sürmüştür. %5 FBS içeren medyum içerisinde hücrelerin çoğalma hızının bir miktar azalmasına rağmen, 3-4 pasajdan sonra tekrar eski hızına ulaştığı gözlemlenmiştir.

Hücrelerin fenotipinde ufak tefek değişimlerin meydana gelmeye ve normal koşullarda çok kutuplu ve yuvarlağa yakın (parke taşı gibi) bir görünümde olmalarına rağmen serum miktarı azaldıkça hücre şekillerinin ovalleşmeye başladığı gözlemlenmiştir. Şekil 25'te hücrelere ait görüntüler bulunmaktadır.

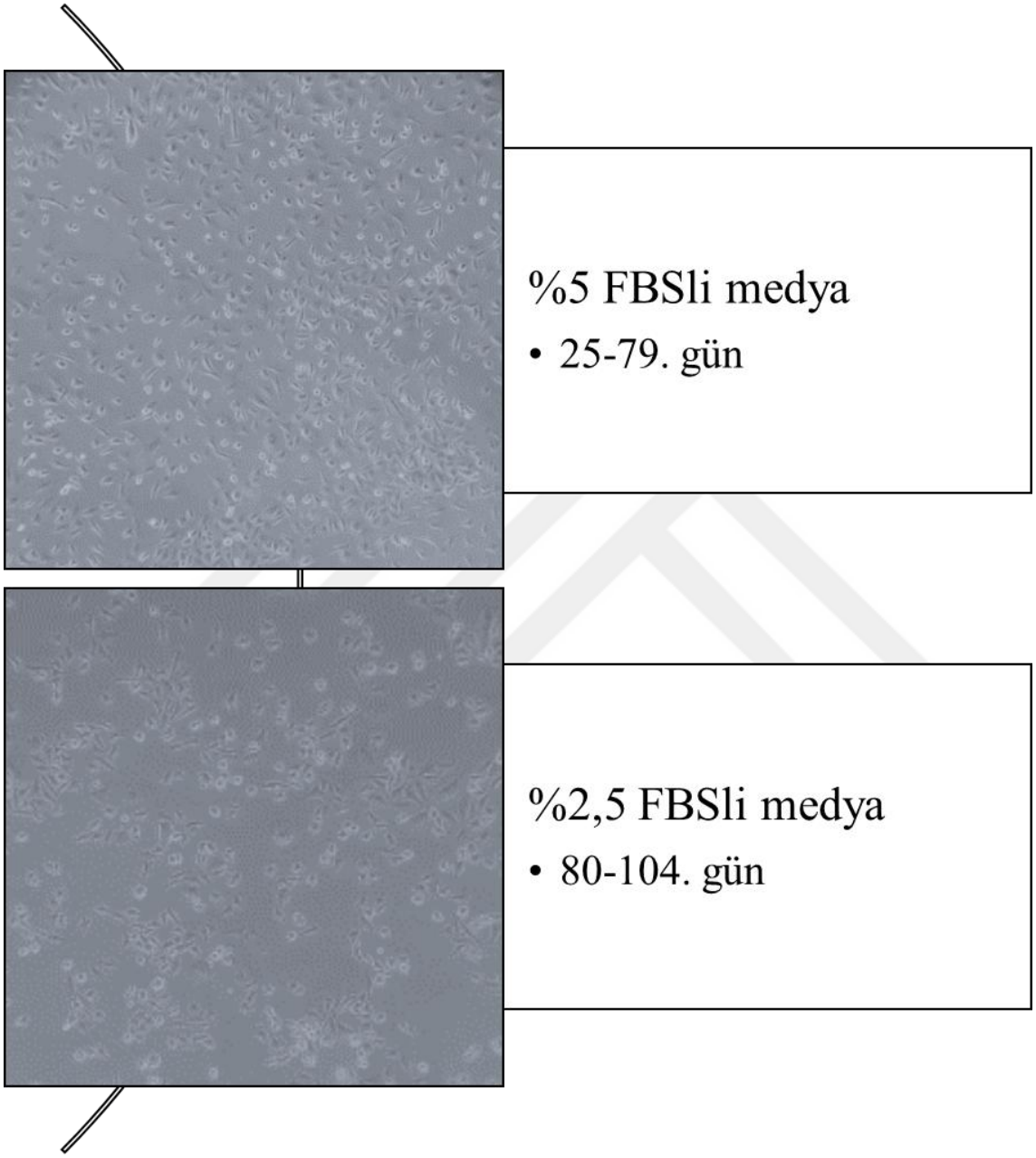


Şekil 25: Serum azaltılması (%10'dan %5'e)

Serum seviyesi %10'dan %5'e düşürülmüş medyum kullanılarak kültürü yapılan mAb üreten CHO-K1 hücrelerine ait görüntü. Hücrelerin ovalleşmeye başladıkları gözlemlenmiştir.

Yaklaşık üç ayın sonunda %5 FBS içeren medyuma uyum sağlayan hücreleri, bir sonraki aşama olan %2,5 seviyesinde FBS içeren medyuma adapte etme çalışmalarına başlanmıştır. Hücrelerin bu serum seviyesine bir önceki adıma göre yaklaşık yirmi beş gün içerisinde, nispeten daha hızlı uyum sağladığı gözlemlenmiştir.

Hücre morfolojisindeki değişimler daha da belirgin hale gelmeye başlamıştır. Bazı hücrelerin iki kutuplu ve sivrilmiş halde uzamış olan şekillerde bulunduğu görülmüştür. Şekil 26'da hücrelere ait görüntüler bulunmaktadır.

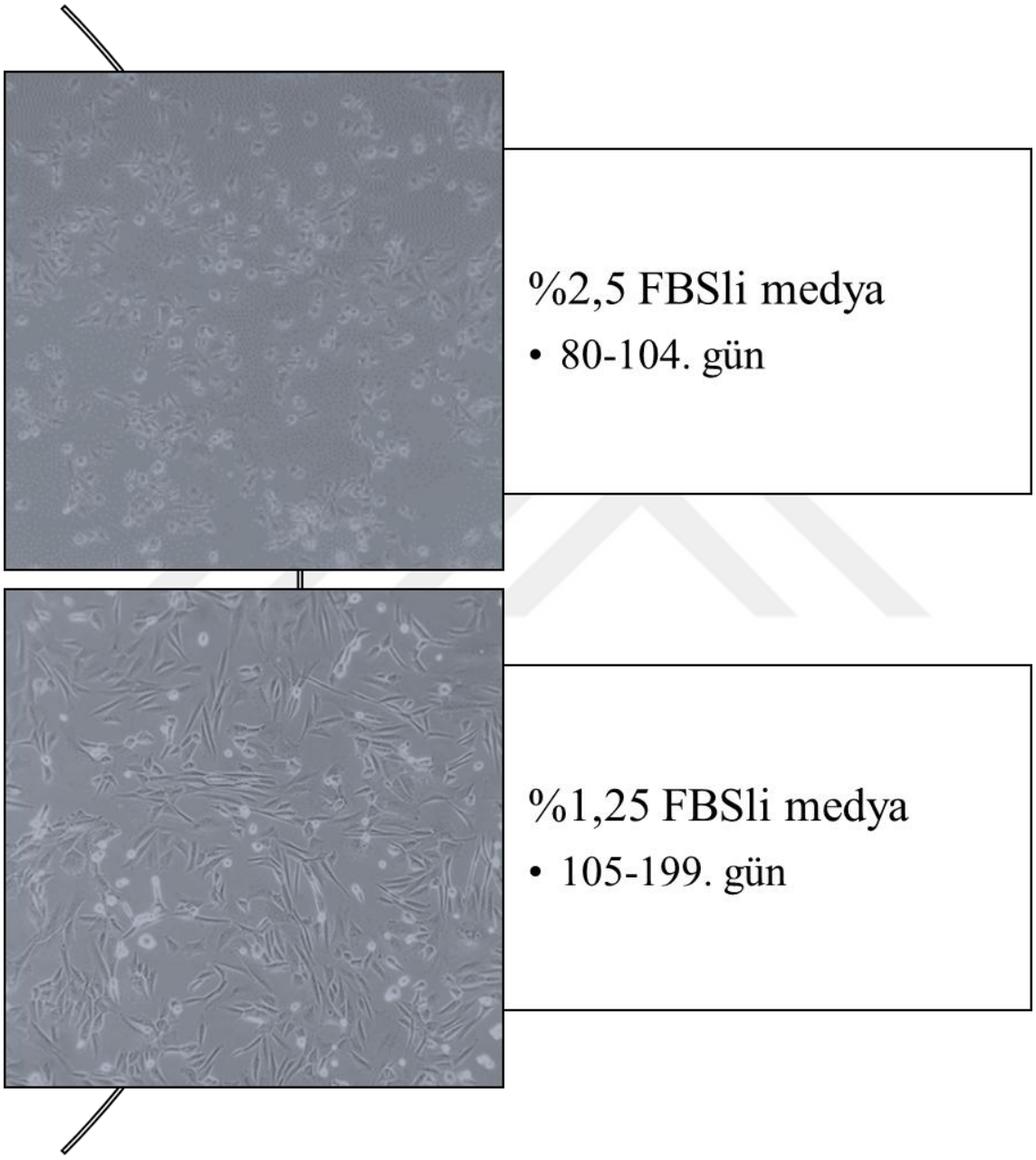


Şekil 26: Serum azaltılması (%5'ten %2,5'e)

Serum seviyesi %2,5'e düşürülmüş olan medyum ile kültürü yapılan mAb üreten CHO-K1 hücrelerinin görüntüsü. %2,5 FBS oranına sahip medyuma birkaç pasajlamadan sonra hızlıca uyum sağlayan hücrelerin şekilleri değişmeye başlamıştır.

Bir sonraki serum seviyesine hücrelerin alışması yaklaşık üç ay kadar sürmüştür.

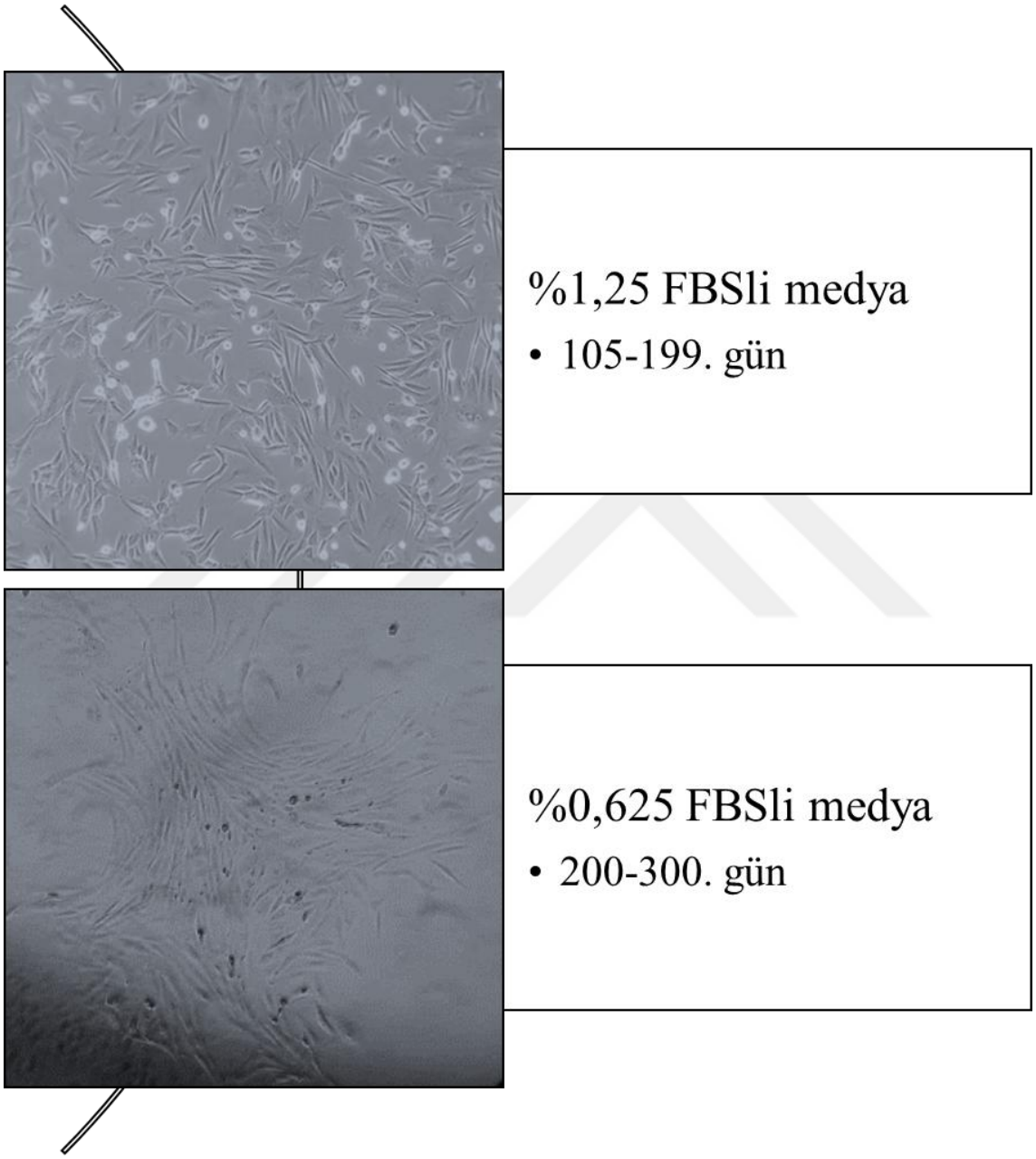
Hücrelerin morfolojisindeki değişim serum seviyesi azaldıkça devam etmiştir. Serum miktarı medyumun %1,25'i olduğu zaman hücrelerin şekillerinin daha belirgin olarak sivri bir hale geldiği ve epitel benzeri hücre görüntüsünden, fibroblastik hücre görüntüsüne geçtiği gözlemlenmiştir. Şekil 27'de bu hücrelere ait görüntüler bulunmaktadır.



Şekil 27: Serum azaltılması (%2,5'ten %1,25'e)

%1,25 FBS içeren medyuma adapte olan CHO-K1 hücrelerine ait görüntü. Hücrelerin uzayıp inceldiği gözlemlenmiştir.

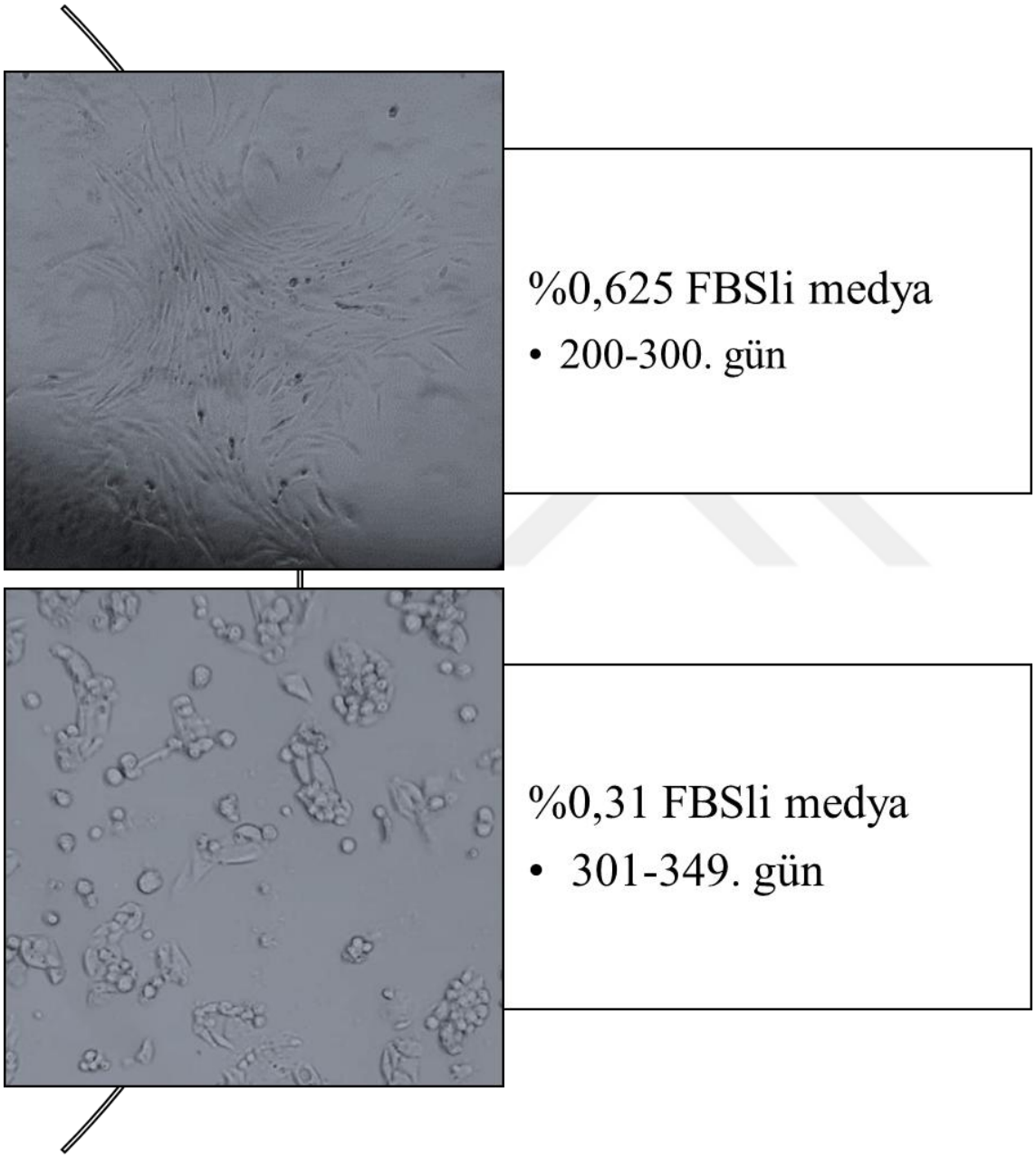
Yedinci ayın sonunda serum seviyesi tekrar yarıya düşürülerek %0,625'e getirilmiştir. Hücrelerin serum seviyesi azaldıkça fenotipik olarak değişime uğramalarının yanında üreme hızlarında da yavaşlama meydana gelmiştir. Şekil 28'de bu hücrelere ait görseller bulunmaktadır.



Şekil 28: Serum azaltılması (1,25'ten %0,625'e)

Onuncu ayın sonunda serum seviyesi %0,625 olan medyum içinde büyüyen CHO-K1 hücrelerinin görüntüsü. Hücre morfolojisinin değişimi belirgin bir şekilde görülmektedir.

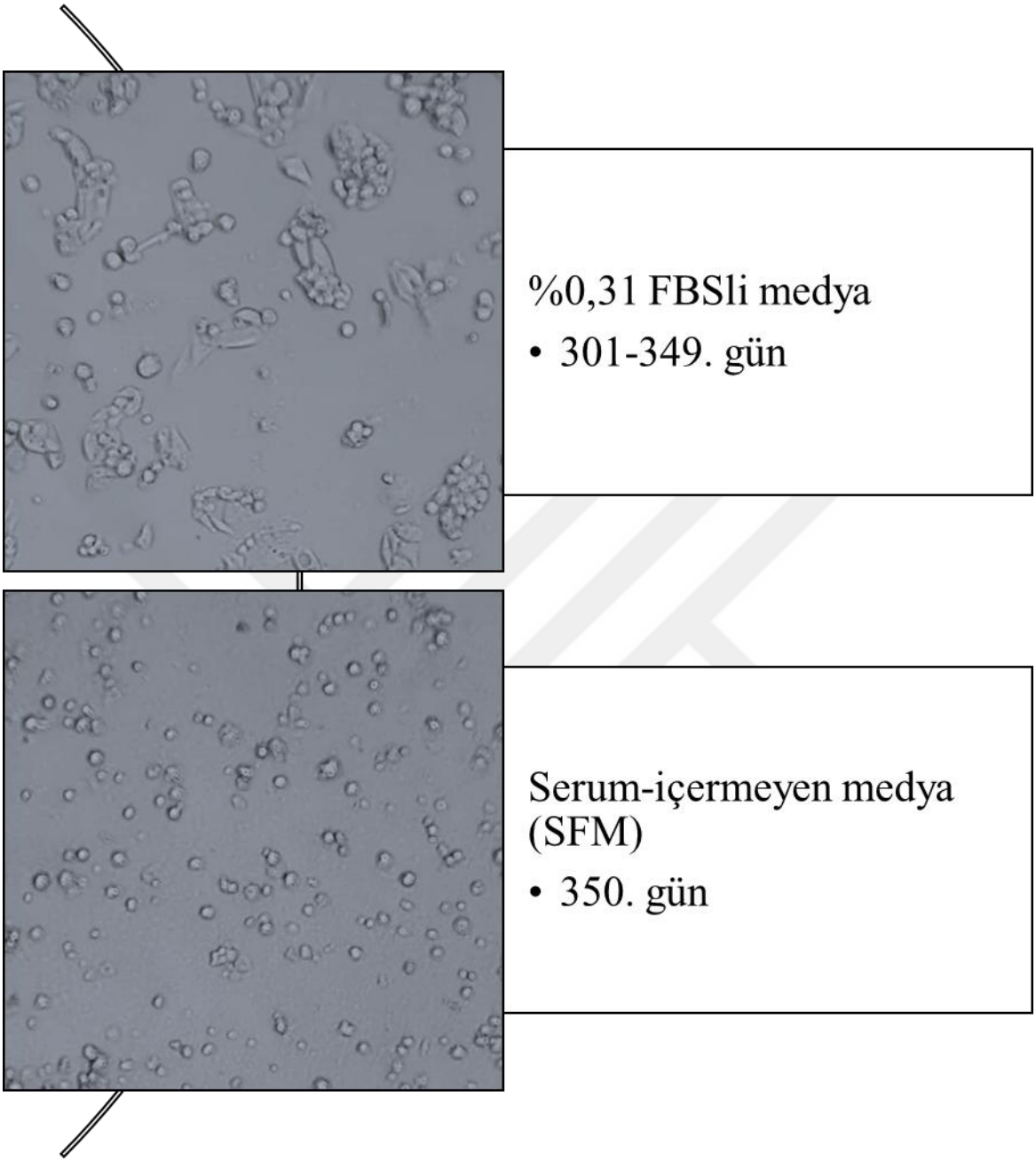
Bir sonraki adımda serum seviyesi yarıya düşürülmeye başlanırken medyum replasmanı da yapılmıştır. RPMI 1640 medyumu ile EX-CD medyumu sırasıyla üçe bir (3:1) oranında karıştırılarak ve FBS oranı % 0,31'e düşürülerek devam edilmiştir. Bunun neticesinde hücrelerin bir kısmı tabana yapışık olarak çoğalırken, bir kısmının süspanse hale geldiği görülmüştür (Şekil 29 ve Şekil 30).



Şekil 29: Serum azaltılması (%0,625'ten % 0,31'e)

Serum oranı %0,31 olan RPMI 1640 : EXCELL CD Hybridoma (3:1) vasatına uyum sağlayan hücrelere ait görüntü. Hücrelerin büyük bir kısmının zaman içerisinde kap tabanından ayrılarak süspanse oldukları gözlemlenmiştir.

Medyum replasmanı esnasında tamamen serumsuz medyuma geçiş sağlanmıştır. SFM'ye geçişte hücrelerin canlılıkları ile ilgili bir sorun yaşanmamıştır. Ancak EX-CD medyumuna tamamen geçildiğinde, bu medyum hücrelere ilk etapta toksik gelmiş ve hücrelerin canlılık oranlarında azalma ile birlikte bölünme hızlarında da yaklaşık iki günlük uzama neticesinde yavaşlamanın olduğu fark edilmiştir.



Şekil 30: Serum azaltılması (%0,31'den serum içermeyen medyuma)

Serum içermeyen EXCELL CD Hybridoma medyumu ile kültürlenen hücrelere ait görüntü. Hücrelerin serumsuz medyuma uyum sağladıktan sonra kap tabanından tamamen ayrılarak sıvı medyum içerisinde yüzen halde, asılı kalarak, yer yer öbekler oluşturarak çoğaldığı ve süspanse olduğu gözlemlenmiştir.

Hücrelerin büyümesini desteklemek amacıyla medyuma 1X konsantrasyonunda L-glutamine ve son konsantrasyonu 200 mM olacak şekilde HEPES tamponu eklenmiştir.

SFM'ye adaptasyon sonuncunda tüm hücrelerin süspanse olduğu ve hücrelerin çoğalma hızının başlangıca göre ortalama 24 saat uzadığı görülmüştür.

4.2. CRISPR/Cas9 Gen Nakavtı

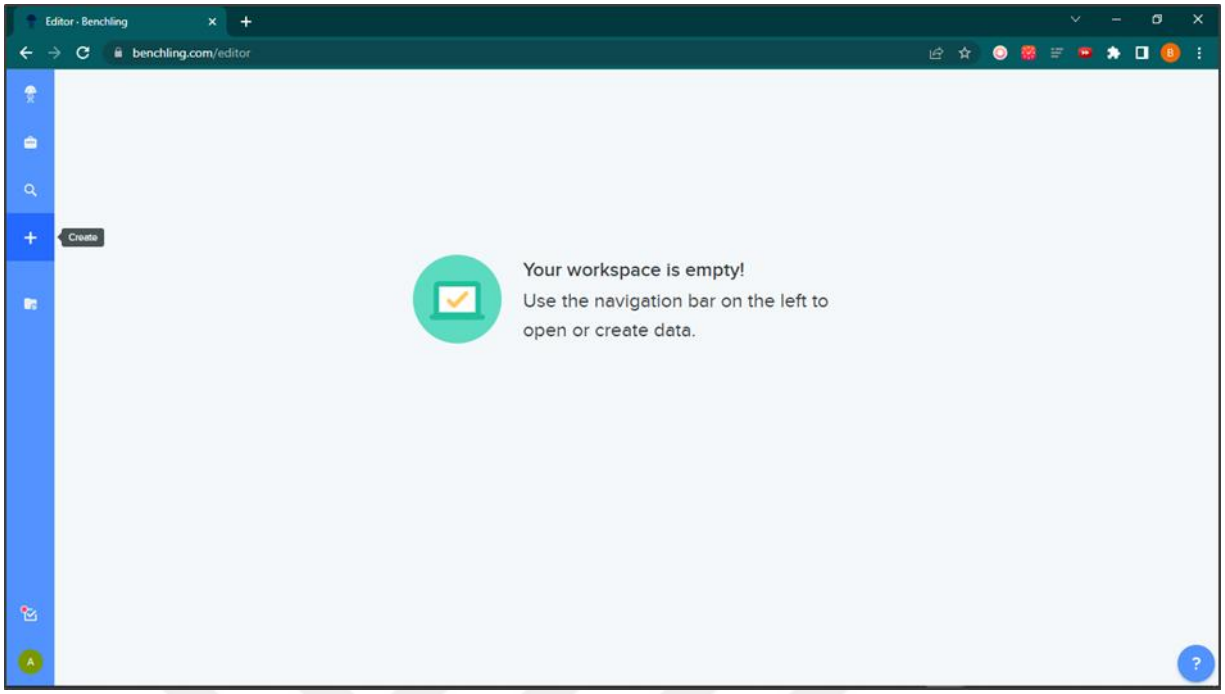
Medya içindeki serum oranı %1,25'e çekildiğinde CRISPR/Cas9 tekniği ile pro-apoptotik *Bak1* ve *Bax* genleri nakavt edilmiştir. Bu amaçla öncelikle sgRNA dizayn edilmiş ve dizayn edilen sgRNA'lar pX458 ve pX459 ekspresyon plazmidlerine üretici tarafından belirtilen şekilde entegre edilmiştir. Plazmidlerin hazırlanmasından sonra ilk önce bakteriyel transformasyon, daha sonra da CHO-K1 hücrelerine transfeksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon sonucunda nakavtın kontrol edilmesi için hücreler akış sitometrisi ve floresan mikroskobu altında analiz edilmiştir.

4.2.1. SgRNA Tasarımı

CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenlemesinde en kritik adım sgRNA tasarımıdır. Nakavt edilmesi planlanan genin işlevini başarılı bir şekilde bozabilmek için bu genin 5' ucunun yakınında olan bir eksonun hedeflenmesi gerekmektedir. Bu sayede meydana gelecek çerçeve kayması neticesinde baştan sona kadar tüm gen sekansı değişmiş olmakta ve proteinin fonksiyonelliği zarar görmektedir. Nakavt edilmesi istenen gen sekansı ile sgRNA arasındaki uyum Cas9'un nükleaz etkinliğini değiştirebilmektedir. Bu nedenle, ilgilenilen her bir gen için üç ayrı sgRNA ile gen düzenlemesi önerilmektedir. [134]

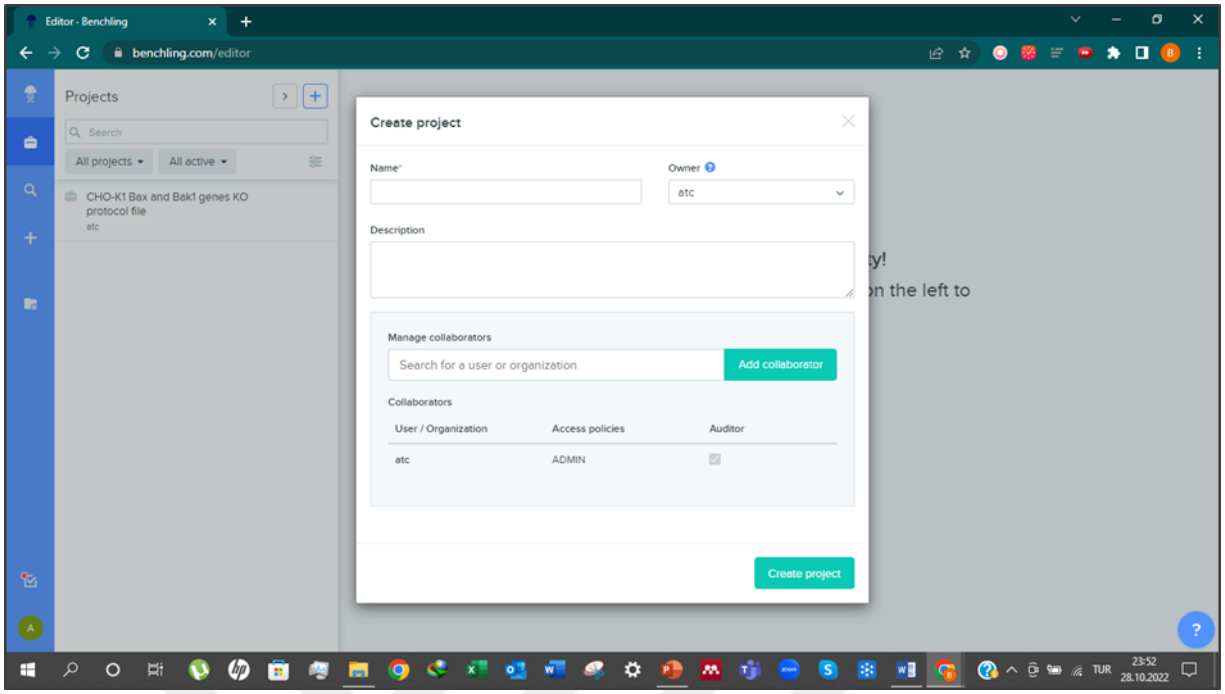
Bu çalışmada kullanılan sgRNAların tasarımı Benchling adlı site üzerinden yapılmıştır. [161] Tasarlanan sgRNA sekansları ile nakavt edilmesi planlanan genlerin DNA sekansları arasındaki uyuma bağlı olarak hesaplanan on-target (hedef içi) ve off-target (hedef dışı) oranlarının kıyaslanması için bir başka web tabanlı sgRNA tasarım aracı olan "CRISPOR" ile dizayn edilmiş olan sgRNAlar kontrol edilmiştir. [154]

Hedef sekansın yukarısında kritik bir fonksiyonel alan olmadığından emin olunması, elde edilen kesik proteinin hala bir aktiviteye sahip olup olmaması açısından önemlidir. Protein fonksiyonel alanları PDB, InterPro, SWISS-MODEL, DynaMut ve DynaMut2 veri tabanlarında analiz edilmiştir. [155] [134] [156] [157] [158] [159] [160]



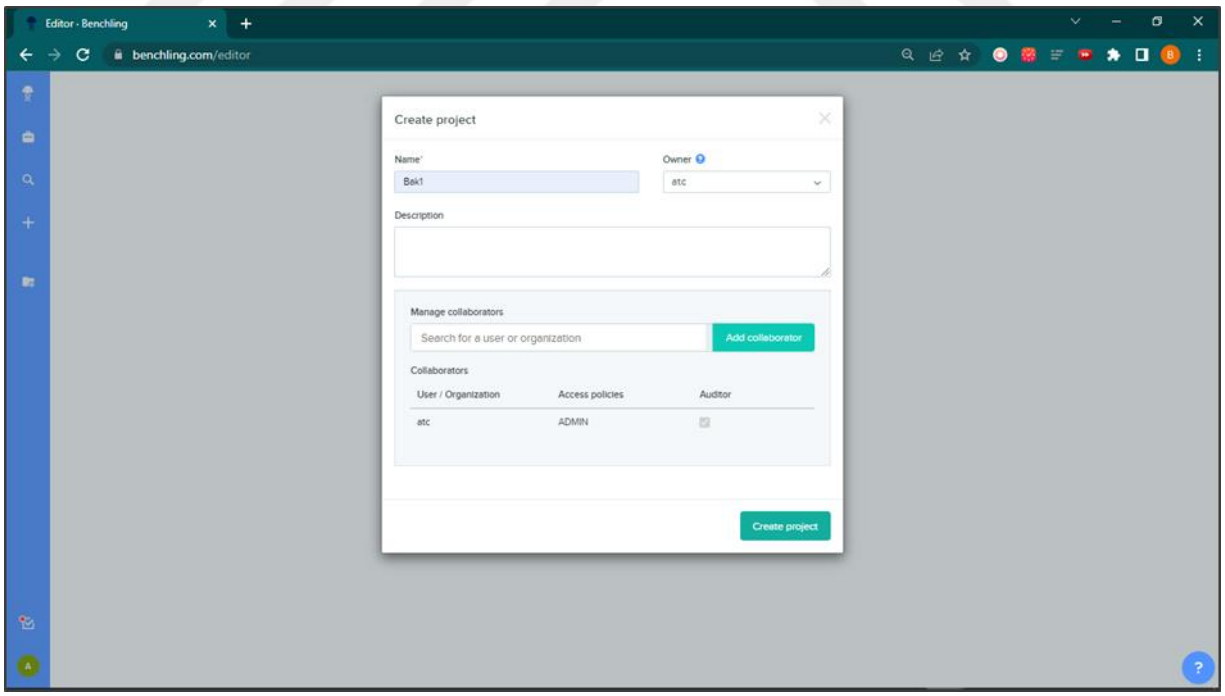
Şekil 31: Benchling'te proje oluşturma sayfası

Benchling, biyoteknoloji araştırma ve geliştirme için bulut tabanlı bir platformdur. [161] Bu platform sayesinde CRISPR için sgRNA dizayn edilebilmektedir. Bu çalışmada Benchling adlı web sitesi üzerinden sgRNA dizaynı yapılmıştır. Başlangıç olarak öncelikle iş alanı kısmından proje oluşturmak için "+" sembolü ile gösterilen "create" alanı seçilmiştir. (Şekil 31)



Şekil 32: Proje oluşturma adımları

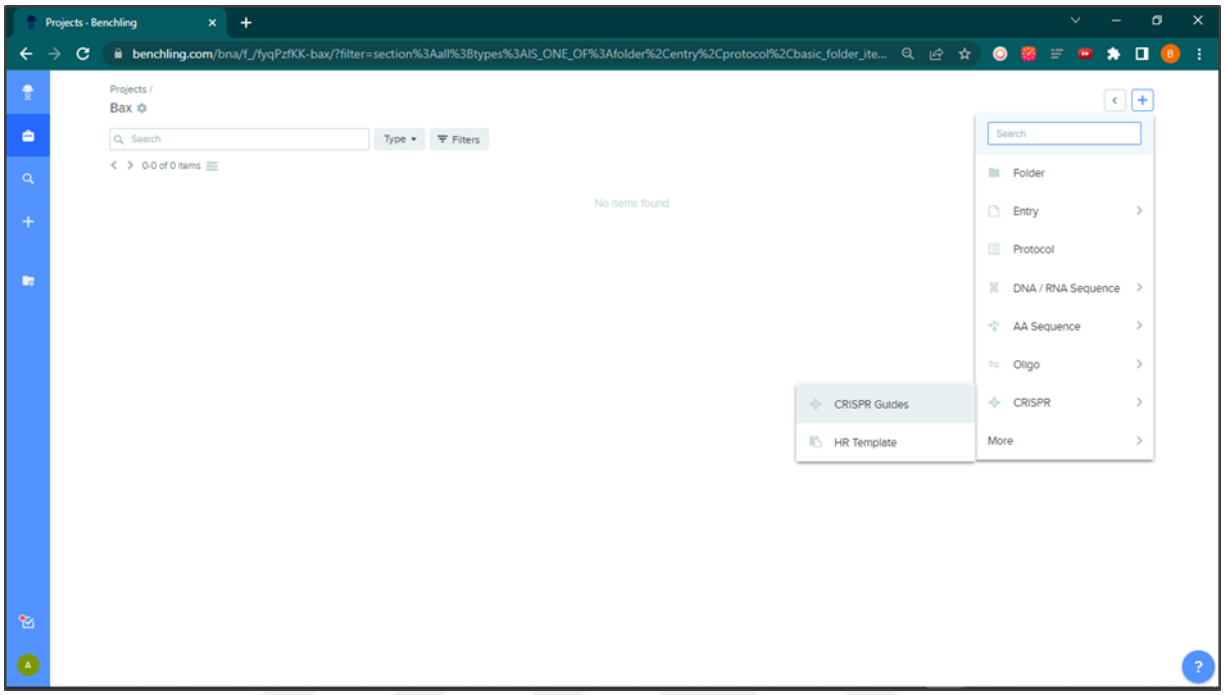
Ekrana gelen yeni pencerenin başlığında proje oluştur (Create project) yazılı olduğu görülmektedir. Yapılacak çalışmaya göre bir isim verilerek proje oluşturulabilmektedir. (Şekil 32)



Şekil 33: Proje oluşturma adımları

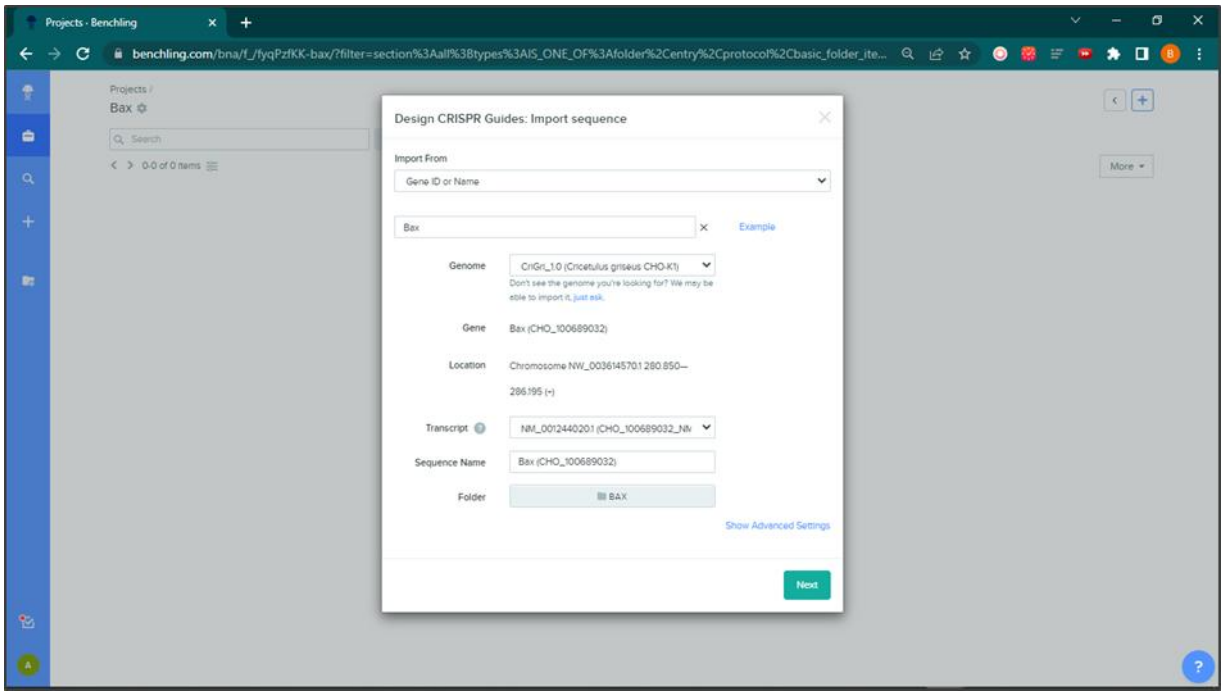
Bu çalışmada CHO-K1 hücrelerine ait *Bak1* ve *Bax* genleri nakavt edilmek istenmektedir. Her gen için dizayn edilecek sgRNAların bu gene ait proje altında tasarımını

yapmak amacıyla proje isimleri sırasıyla *Bak1* ve *Bax* olarak verilmiştir. Şekil 33'te*Bak1* geni için hazırlanan projeye ait görsel paylaşılmıştır.



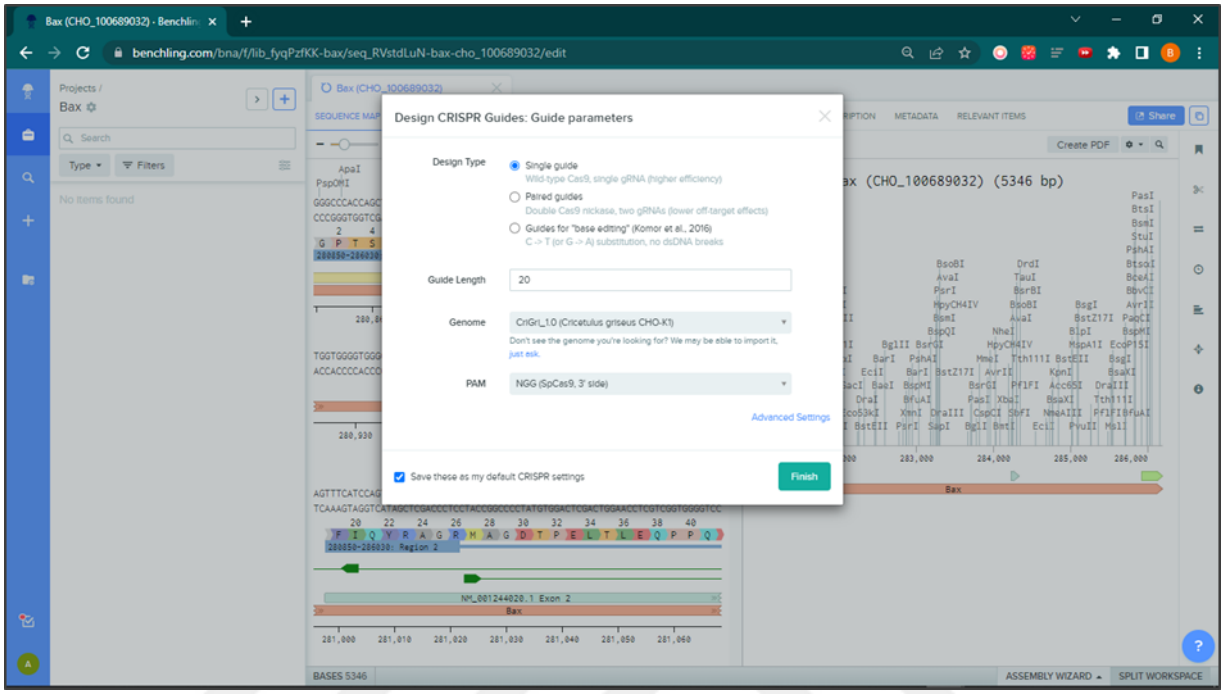
Şekil 34: sgRNA tasarlama adımları

Proje oluşturulduktan sonra içerisine eklenecek her işlem için tekrar "+" sembolü ile gösterilen kısımdan oluştur seçeneği seçilmektedir. CRISPR alanından CRISPR Guides kısmı seçilip sgRNA dizaynı için komut verilmektedir (Şekil 34).



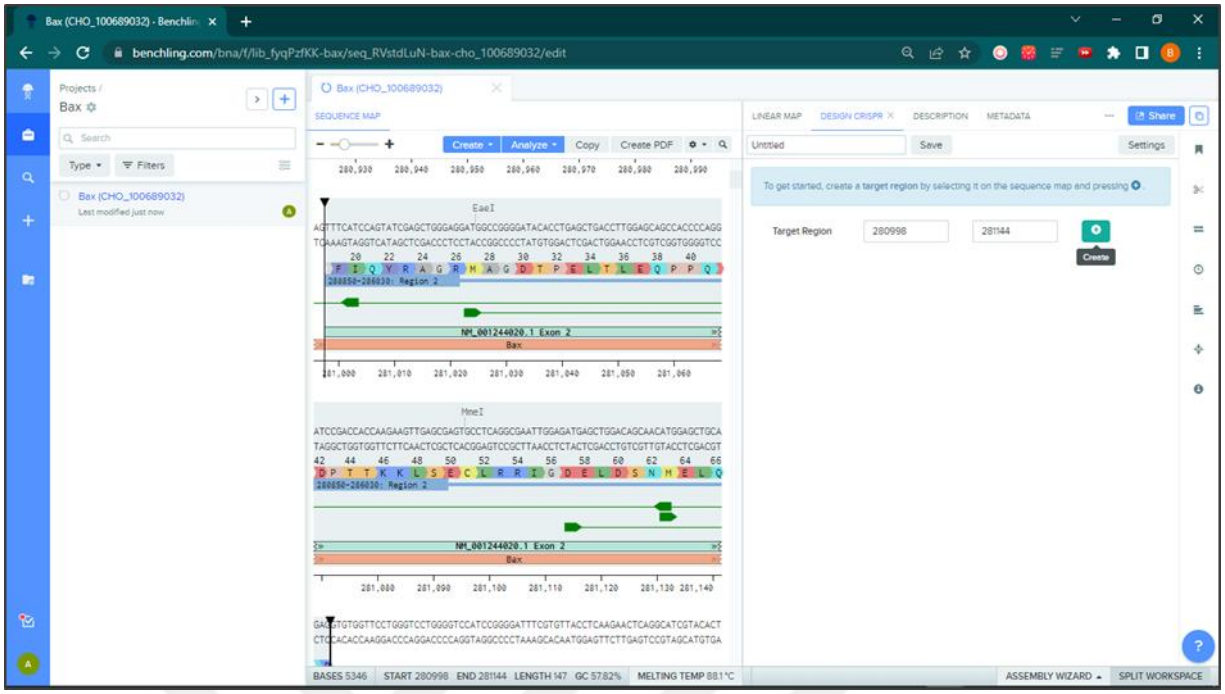
Şekil 35: sgRNA tasarlama adımları

Şekil 35'te*Bax* geni için dizayn edilecek sgRNAlar CHO-K1 (Cricetulus griseus CHO-K1) genomuna spesifik, *Bax* genine ait olacak şekilde bu genin sekansı seçilerek devam edilmiştir.



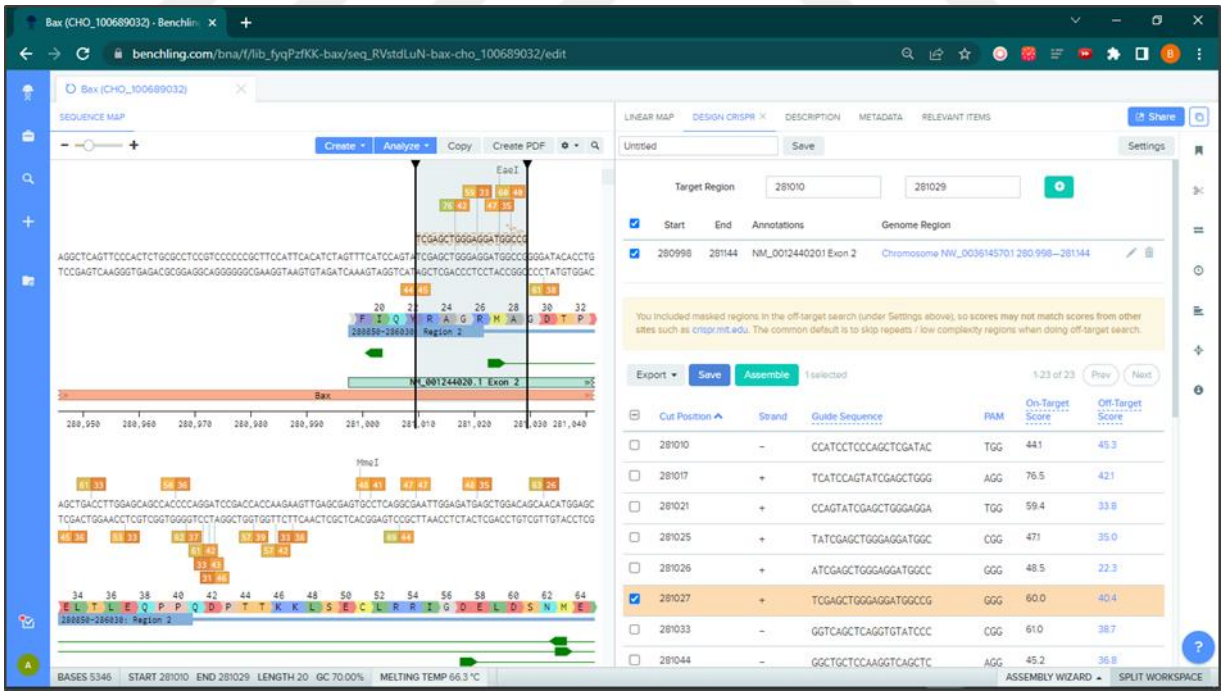
Şekil 36: sgRNA tasarlama adımları

Ekrana yeni gelen pencerede tek, çift ve baz düzeltme amaçlı sgRNA dizayn tipi tercih edilip, sgRNA uzunluğu belirlenerek PAM sekansı seçilmiştir (Şekil 36).



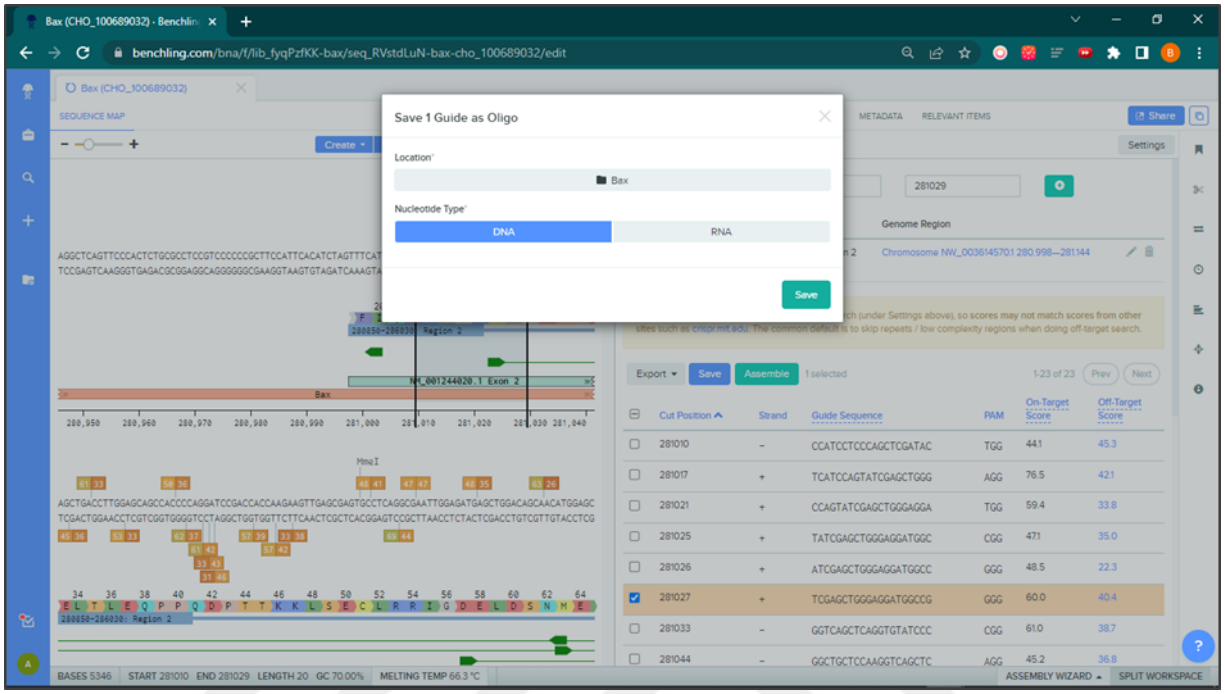
Şekil 37: sgRNA tasarlama adımları

Şekil 37'de CHO-K1 hücre hattına ait *Bax* geninin sekansı görülmektedir. sgRNA dizaynı için eksonlar seçilip oluştur butonuna basılmıştır.



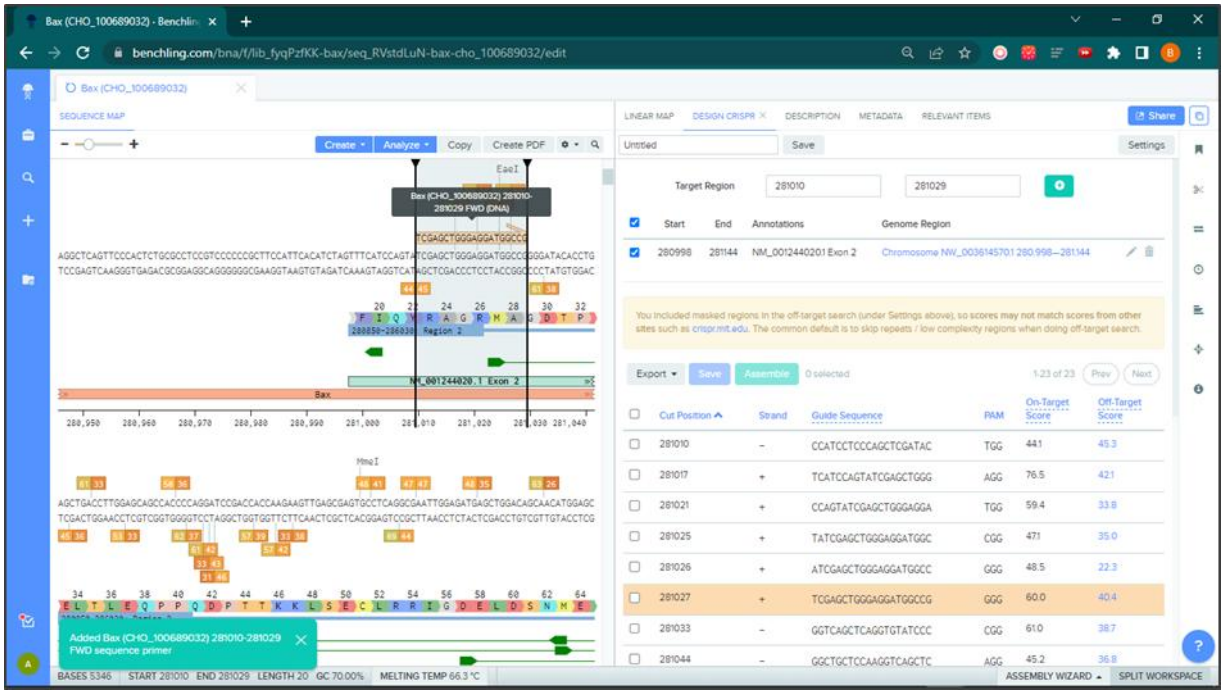
Şekil 38: sgRNA tasarlama adımları

Şekil 38'de Ekson 2'ye ait sgRNAlar listelenmektedir. Bu sgRNAların içinden en yüksek hedef içi ve hedef dışı skoruna sahip ve PZR-RFLP yöntemi ile analiz edebilmek için orta kısmında restriksiyon enzimi tanıma bölgesi bulunan sgRNAlar seçilmiştir.



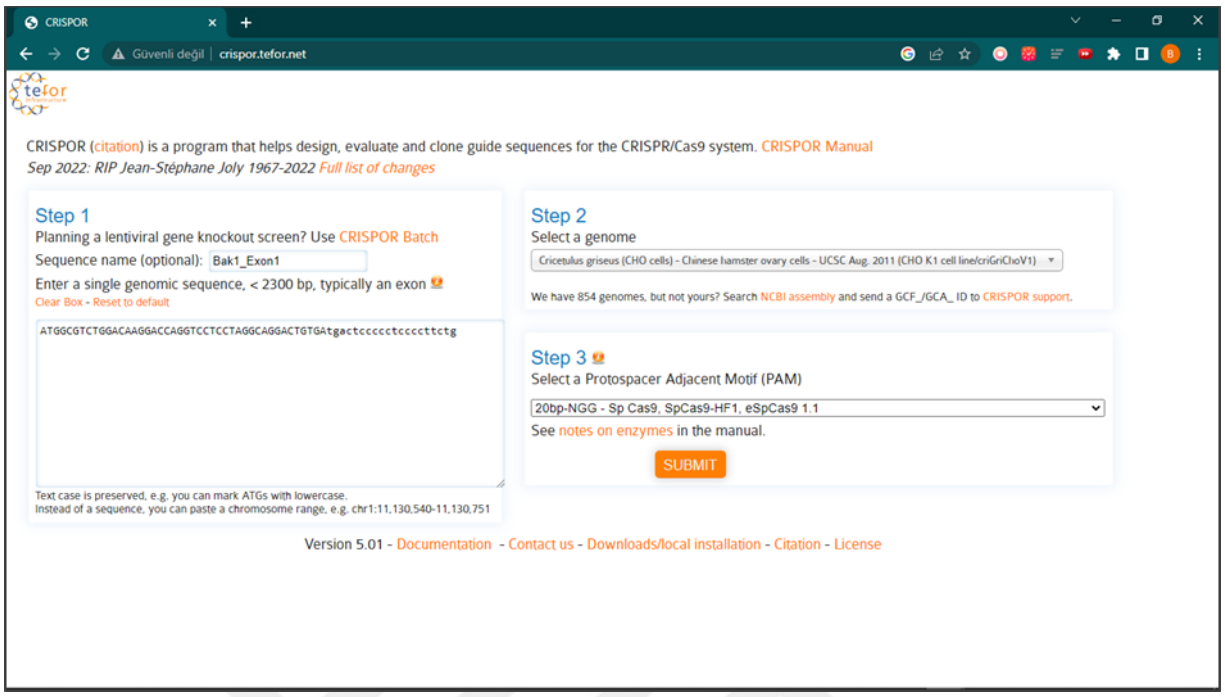
Şekil 39: sgRNA tasarlama adımları

Şekil 39'da seçilen sgRNAlar oluşturulan proje dosyasına kaydedilmiştir.



Şekil 40: sgRNA tasarlama adımları

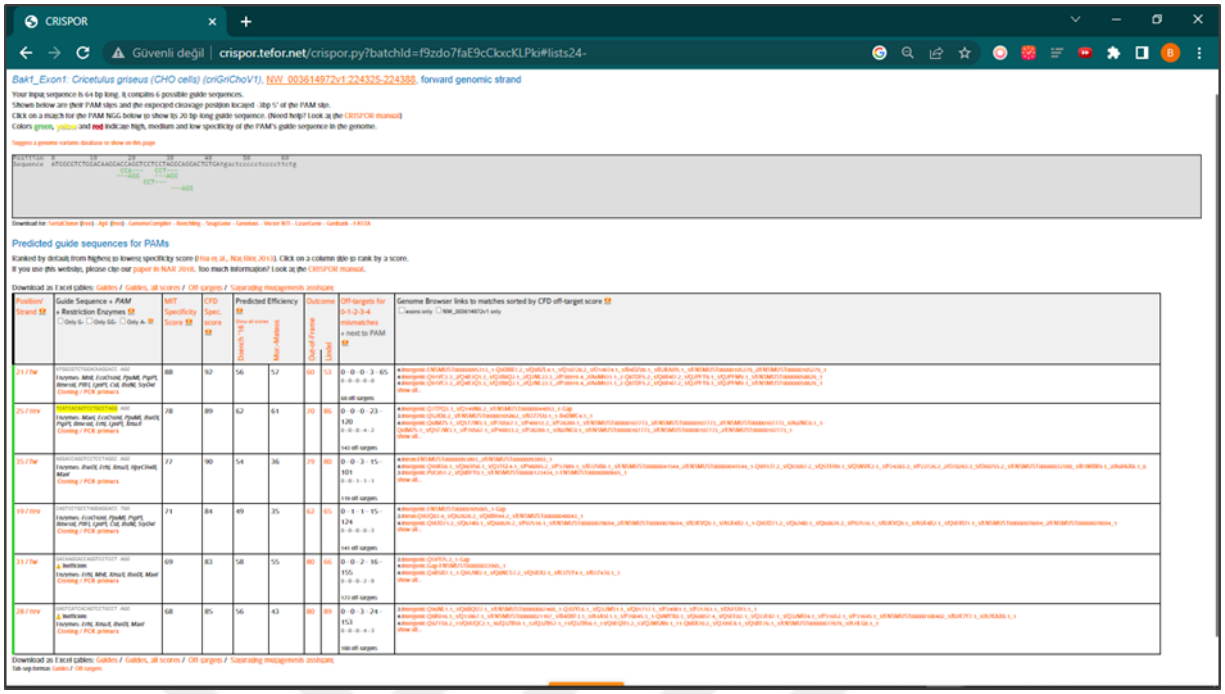
Bu sgRNAlara ait primerler *Bax* genine ait sekansa eklenmiştir (Şekil 40).



Şekil 41: sgRNA doğrulama adımları

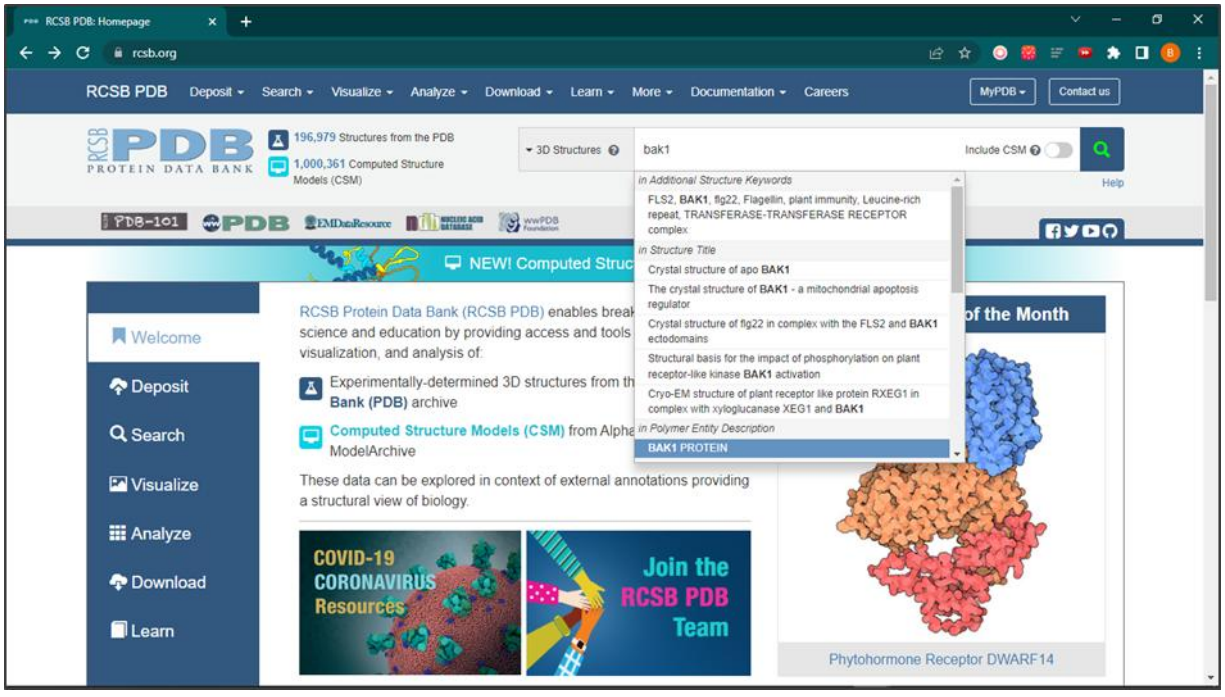
sgRNAların doğrulamasını yapmak amacıyla CRISPR/Cas9 sistemi için kılavuz dizileri tasarlamaya, değerlendirmeye ve klonlamaya yardımcı olan başka bir web programı olan CRISPOR [154] adlı site kullanılmıştır (Şekil 41).

İlk önce sekans ismi yazılarak daha önce seçilmiş olan ekson bölgesinin sekansı FASTA formatında boş bırakılmış olan kısma eklenmiştir. Sonrasında 2. adım olarak bu sekansın hangi organizmaya ait olduğunu belirtmek için genom ve 3. adım olarak PAM sekansı seçilmiştir (Şekil 42).



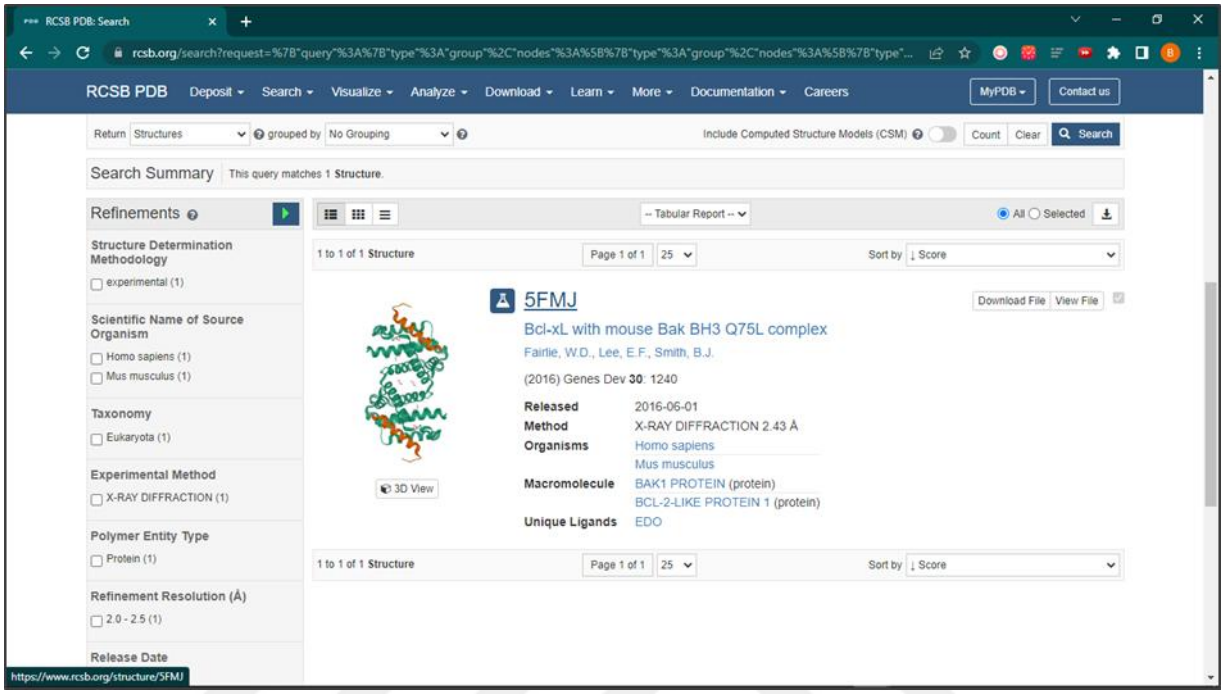
Şekil 42: sgRNA doğrulama adımları

Şekil 42'de ekrana gelen yeni sayfada bu ekson bölgesine ait sgRNAlar listelenmektedir. Daha önce Benchling üzerinden seçilen sgRNAlar bu listeden bulunup hedef içi ve hedef dışı skorları incelenmiştir.



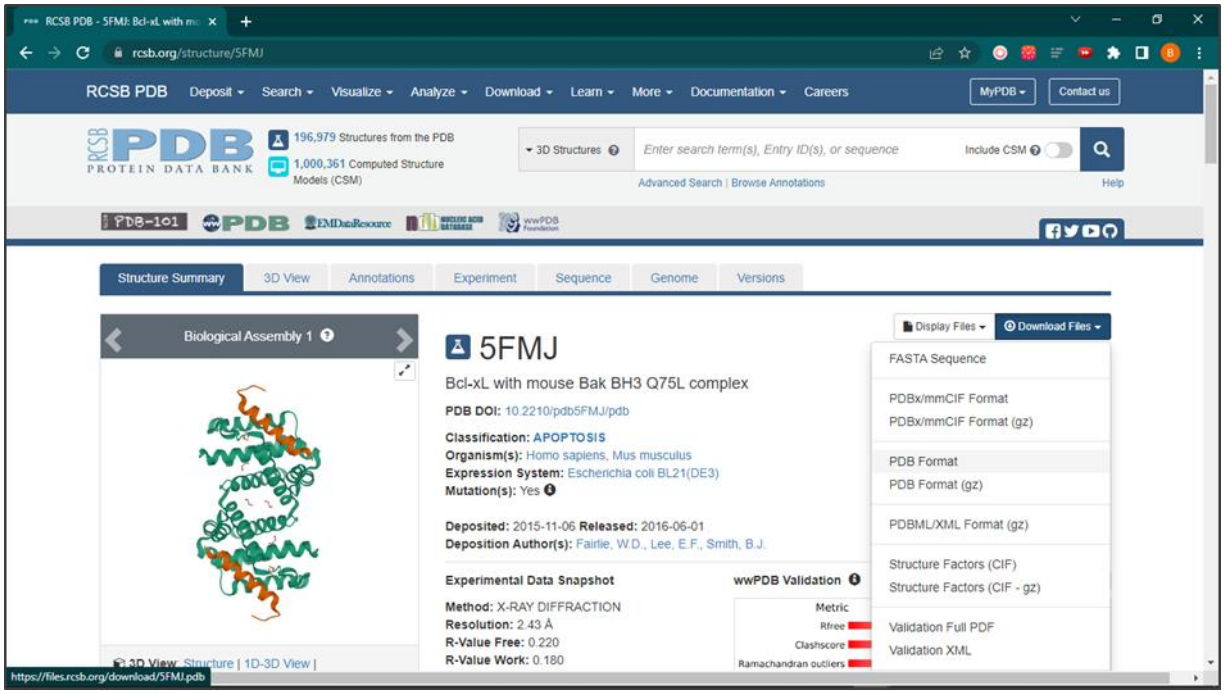
Şekil 43: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

Daha sonra protein veri bankası üzerinden *Bak1* ve *Bax* genlerinin protein yapısal analizini yapmak için Protein Data Bankası (PDB) kodları bulunmuştur. Bu görselde *Bak1* proteinine ait arama gösterilmiştir (Şekil 43). [155]



Şekil 44: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

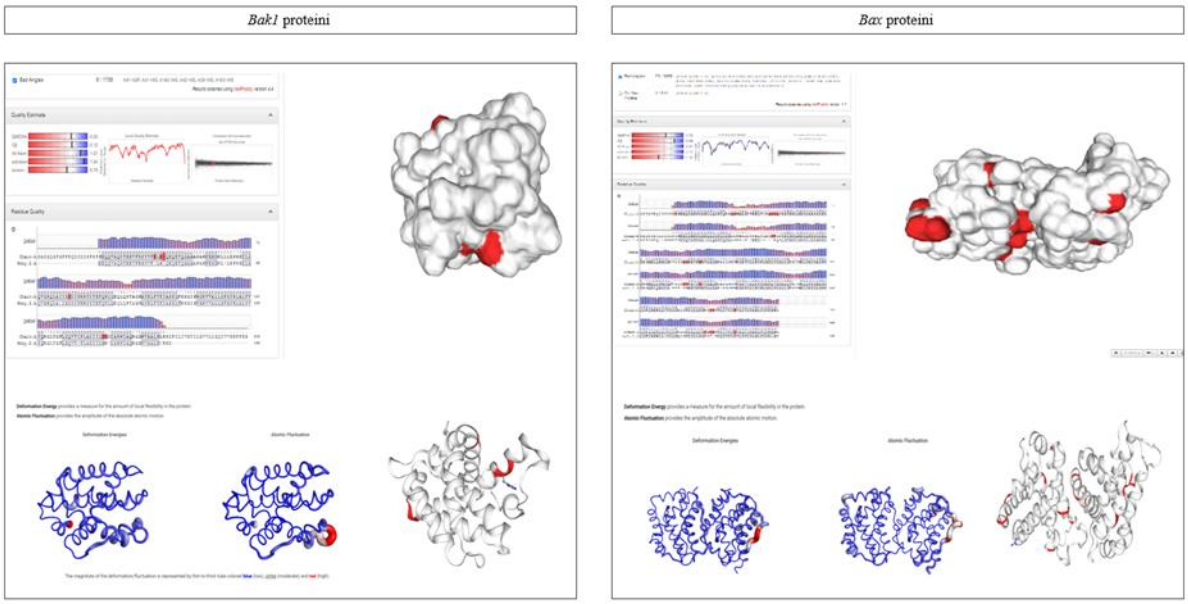
Şekil 44'te de gösterildiği gibi 5FMJ kodlu protein seçilmiştir.



Şekil 45: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

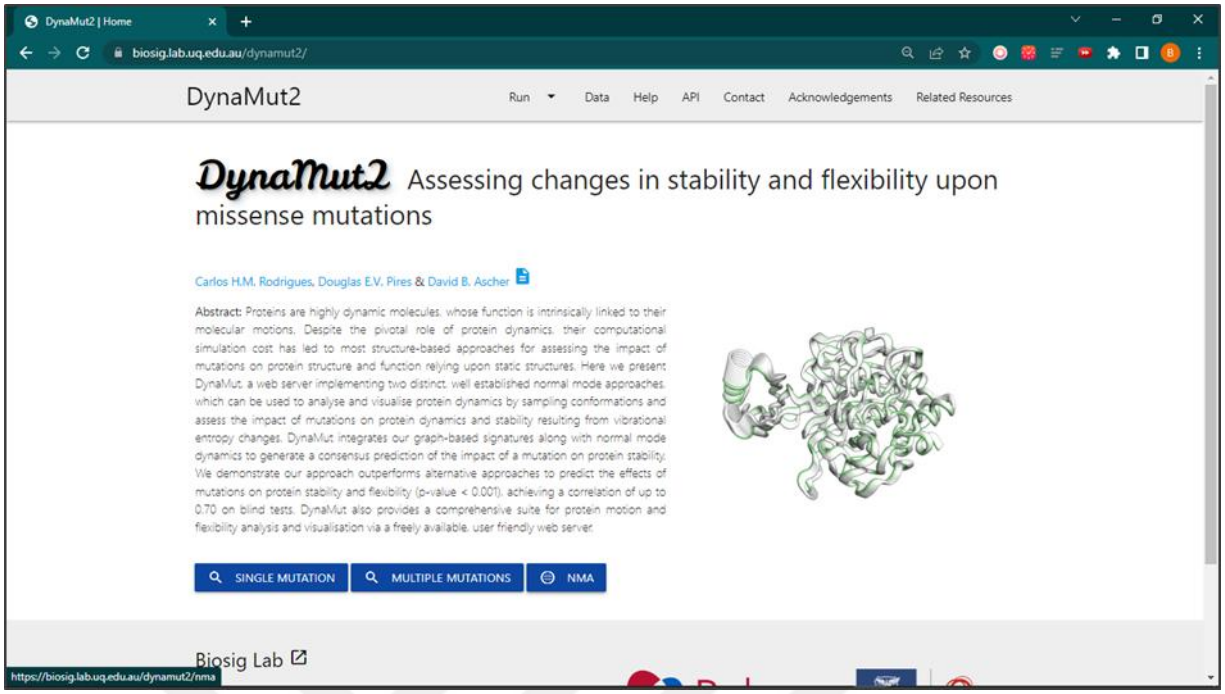
Bu proteine ait PDB formatındaki dosya daha sonraki incelemelerde kullanılmak üzere indirilmiştir (Şekil 45).

DynaMut [162] mutasyonların protein yapısı, esnekliği ve stabilitesi üzerindeki etkisini tahmin etmek ve DynaMut2 [163] tek ve çok noktalı yanlış anlamlı mutasyonlarda kararlılık ve esneklikteki değişikliklerini incelemek amacıyla geliştirilmiş web tabanlı biyoinformatik araçlarıdır (Şekil 46 ve Şekil 47). [164] [160]



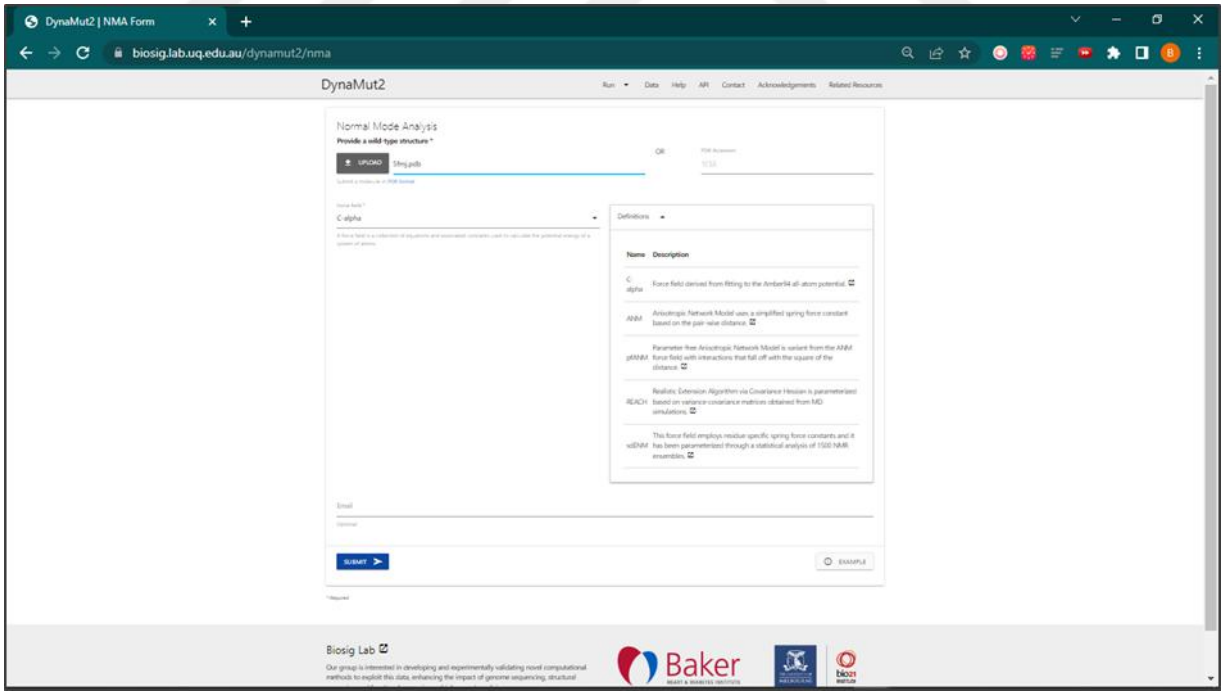
Şekil 46: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

DynaMut sitesi üzerinden inceleme yapıldığında, *Bak1* ve *Bax* genlerine ait protein haritaları ve deformasyona/mutasyona açık olan stratejik bölgelerinin temsili gösterimi



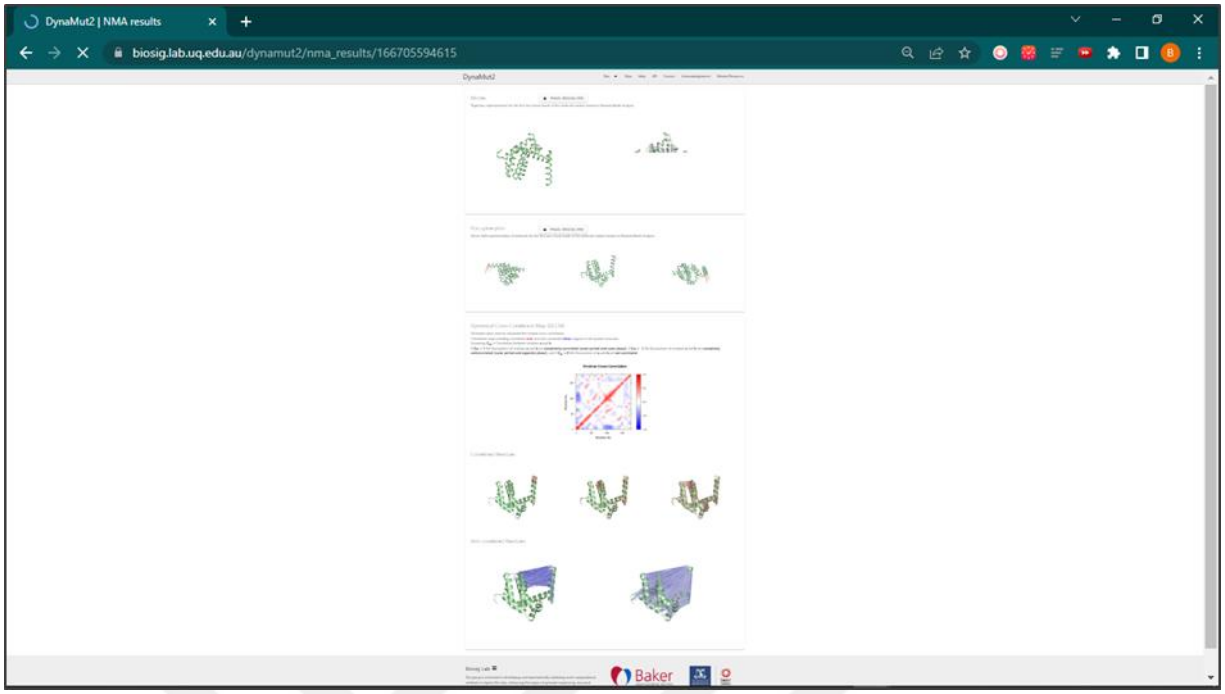
Şekil 47: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

Burada DynaMut2 sitesi üzerinden değerlendirildiğinde *Bak1* ve *Bax* proteinlerinde meydana gelebilecek en önemli mutasyonlar incelenmiştir.



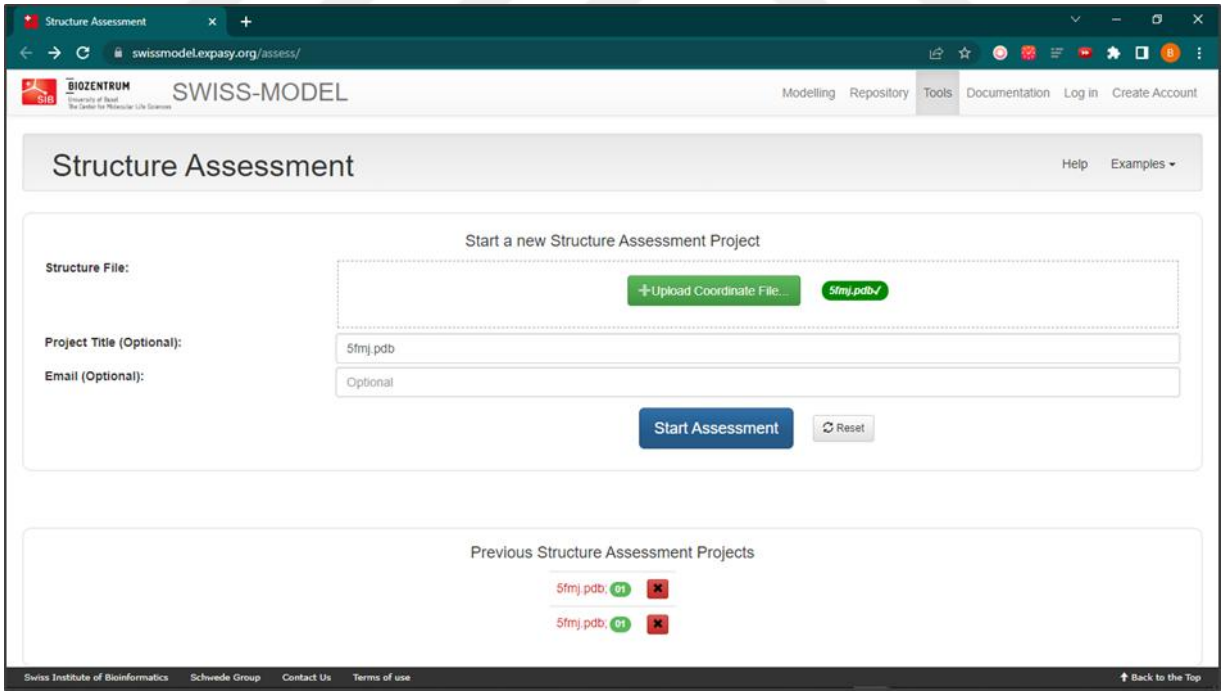
Şekil 48: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

Bu amaçla indirilmiş olan PDB formatındaki dosyalar DynaMut ve DynaMut2 sistemlerine yüklenip, atomların potansiyel enerjilerinin sistematik olarak incelenmesinde kullanılacak kuvvet alanı seçilmiştir (Şekil 48).



Şekil 49: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

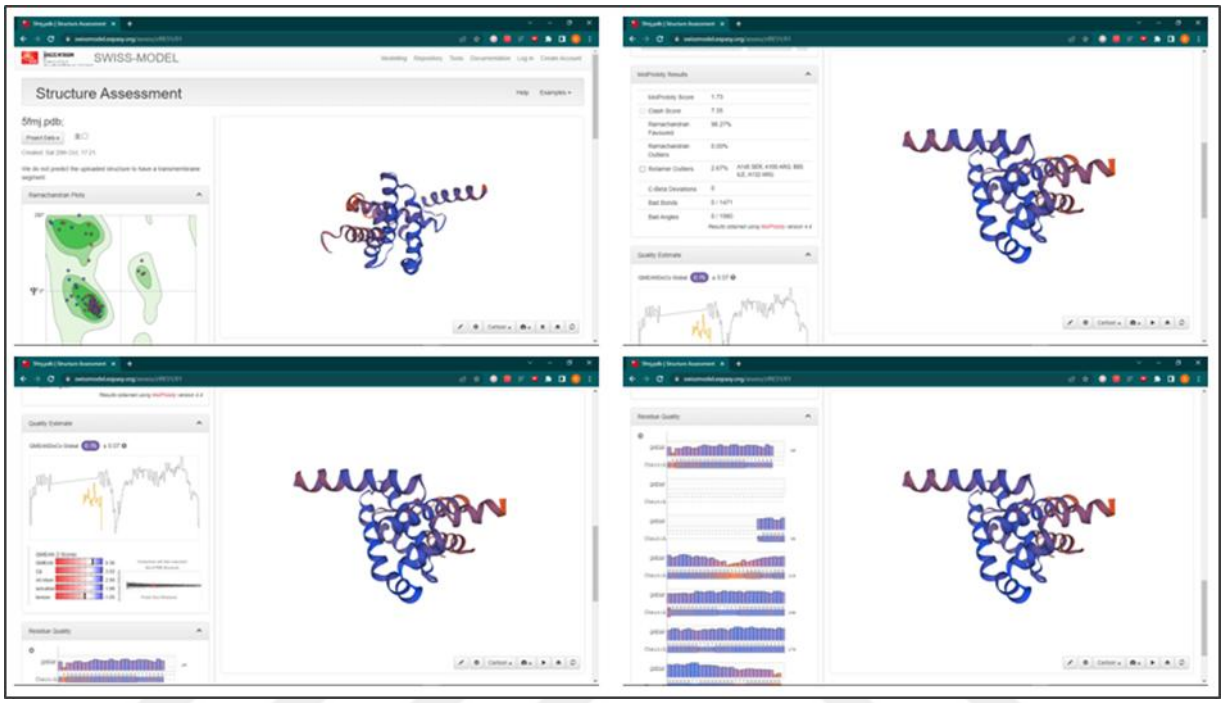
Şekil 49'da gösterilen yeni açılan sayfada proteine ait hesaplamalar ve grafikler bulunmaktadır.



Şekil 50: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

Doğrulama yapmak amacıyla başka bir web tabanlı yapısal bir biyoinformatik programı olan ve üç boyutlu protein yapılarının homoloji modellemesinin yapılmasını sağlayan SWISS-MODEL kullanılmıştır. SWISS-MODEL Homoloji modellemesi, şu anda

güvenilir üç boyutlu protein yapısı modelleri oluşturmak için birçok pratik uygulamada rutin olarak kullanılmaktadır. Bu görselde daha önce PDB formatında indirilmiş olan *Bak1* proteinine ait gen sekansına ait dosyanın sisteme yüklenmesi ile değerlendirmenin başlatılması gösterilmiştir (Şekil 50). [165]



Şekil 51: Proteinlerin mutasyona açık bölgelerinin belirlenmesi

Yeni açılan sayfada proteinin yapısal analizleri görülmektedir (Şekil 51).

Tablo 13: Tasarlanmış olan sgRNA sekansları

	Pozisyon	Zincir	Sekans	PAM	On-Target Skoru	Off-target skoru	Ekson	Restriksiyon Enzimi
Bak1 sgRNA sekansları								
Bak1 gRNA1	224355	(+)	tcaTCACAGTCCTGCCTAGG	AGG	65,9	35,7	1	*AvrII*
Bak1 gRNA2	227606	(+)	TTTAAGAGCGGCATCAGCTG	GGG	64,1	39,2	4	*BsrBI*
Bax sgRNA sekansları								
Bax gRNA3	281027	(+)	TCGAGCTGGGAGGATGGCCG	GGG	60	40,4	2	*EaeI*
Bax gRNA4	281850	(+)	TTTCTACTTTGCTAGCAAAC	TGG	42,5	38,1	3	*NheI*

Dört adımlı doğrulama yapıldıktan sonra tüm kriterlere uyan ve proteinde yapısal/fonksiyonel olarak işlev kaybına yola açacak olan hedef sekanslara göre tasarlanan

sgRNAlar listelenerek bir tablo oluşturulmuştur. Yukarıdaki tabloda bu sgRNAlar görülmektedir (Tablo13).

4.2.2. 4sgRNA Kaseti İçeren CRISPR/Cas9 Vektörlerinin Hazırlanışı

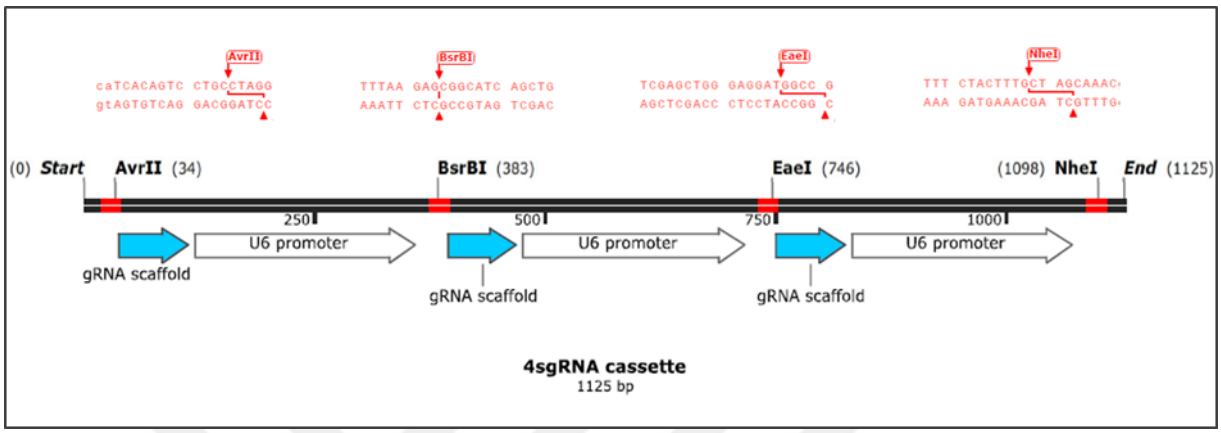
Addgene'den temin edilebilen pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) ve pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) CRISPR/Cas9 plazmidleri spCas9 taşımaktadır ve vektör üzerinde bulunan *BbsI* restriksiyon bölgesi kesimi altında sgRNAların vektör plazmidlere entegrasyonuna izin vermektedir. pX459 plazmidinde puromisin direnç geni bulunmaktadır ve bu genin ifade edilmesi ile CHO-K1 hücreleri puromisin varlığında çoğalabilmektedir. pX458 vektörü üzerinde ise yeşil floresan proteini (GFP) raportör geni bulunur ve bu sayede floresan mikroskobu altında hücre içinde transkripsiyonu gerçekleşen pX458 plazmidi ile hücrelerin parlak yeşil renkte ışıma yapmaları neticesinde bu hücreler diğerlerinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Hedef sekansı pX458 ve pX459 plazmidlerine klonlamak için, plazmidleri *BbsI* restriksiyon enzimi ile kesilip lineerize edildikten sonra komplementer uçlara sahip olan sgRNA kaseti pX458 ve pX459'a klonlama için kullanılmıştır. [185] [186] [187]

pUC19 küçük, ampisilin direnç genini kodlayan, vektör olarak kullanılan bir plazmiddir. Bu plazmidin kullanılış amacı, seçilmiş olan 4 tane sgRNA'nın art arda eklenip tek seferde, CRISPR/Cas9 plazmidine aktarımını sağlayarak, bu sgRNAları bir kaset şeklinde tek seferde CRISPR/Cas9 vektör plazmidlerine klonlamaktır. 4sgRNA kasetinin 5' ve 3' uçlarında *BbsI* enzimi için kesim bölgeleri bulunmaktadır.

pX458 ve pX459 CRISPR/Cas9 plazmidleri vektör plazmid olarak kullanılmıştır. Bu plazmidler spCas9 enzimini kodlayan gen bölgesine ek olarak değişmeyen U6 promotor bölgesi ve sgRNA iskele kısmı arasında bulunan plazmidle klonlanacak olan 4sgRNA kaseti için klonlama bölgesini içermektedir. Klonlama bölgesinin bulunduğu kısımda *BbsI* restriksiyon enziminin kesim bölgesi bulunmaktadır. Bu sayede CRISPR/Cas9 plazmidi restriksiyon enzimi ile kesilip 4sgRNA kasetinin klonlanabilmesi için uygun hale getirilmiştir.

Normalde vektör plazmidde yer alan U6 promotoru ile Scr arasında *BbsI* enzimi kesim bölgesi bulunmaktadır ve enzim kesiminden sonra sgRNA oligonükleotidinin, U6 ve Scr arasına yerleşmesi sağlanarak ligasyon yapılmaktadır. Burada dört gen sekansını hedef alan dört sgRNA'yı tek seferde CRISPR/Cas9 vektörüne aktarabilmek için vetörde bulunan U6 promotorunun alt akım bölgesine getirilmek üzere birinci sgRNAdan sonra birinci Scr, daha sonra birinci U6 promotoru ardından ikinci sgRNA ve ikinci Scr, ikinci U6 promotorundan sonra üçüncü sgRNA ve üçüncü Scr, üçüncü U6 promotorundan sonra dördüncü sgRNA

şeklinde ekleme yapılıp vektör plazmide klonlamak için pUC19 taşıyıcı plazmidine kodlanmıştır (Şekil 52). Kısaca: sgRNA_1+ Scr_1+ U6_1+sgRNA_2+Scr_2+U6_2+sgRNA_3+Scr_3+U6_3+sgRNA4 şeklinde ifade edilebilir.



Şekil 52: 4sgRNA kaseti

4 adet sgRNA sekansının 5'ucunda U6 promotoru ve 3' ucunda sgRNA scaffold bölgesi olacak şekilde arka arkaya eklenmeleri ile elde edilen kaset (4sgRNA kaseti). Kırmızı renk ile gösterilen kısımlar sgRNA sekanslarıdır.

Dört sgRNA Kaseti İçeren pUC19 Plazmidinin Sekansı

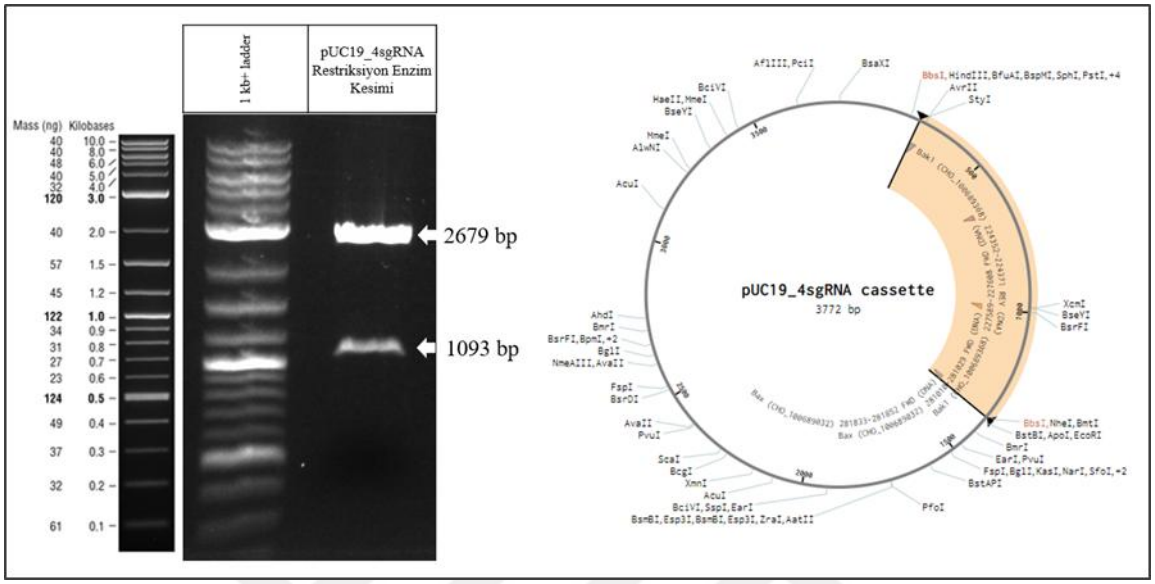
Tcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcggg
cagtgagcgcaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaa
ttgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagcttgcatgcctgcaggTCGACgaagacgg
CACCGtcaTCACAGTCCTGCCTAGGgttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaac
ttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTTgagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatacgatacaaggctgttaga
gagataattggaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttt
taaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatatcttGTGGAAAGGAC
GAAACACCCACCGTTTAAGAGCGGCATCAGCTGgttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataag
gctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTTgagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatatac
gatacaaggctgttagagagataattggaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtgacgtagaaagtaataattt
cttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgatttcttggctttatatatctt
GTGGAAAGGACGAAACACCCACCGTCGAGCTGGGAGGATGGCCGgttttagagctaGAA
AtagcaagttaaaataaggctagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTTgagggcctatttcccatgat
tccttcatatttgcatatacgatacaaggctgttagagagataattggaattaatttgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatacgtg
acgtagaaagtaataatttcttgggtagtttgcagttttaaaattatgttttaaaatggactatcatatgcttaccgtaacttgaaagtatttcgat

ttcttggctttatatatcttGTGGAAAGGACGAAACACCCACCGTTTCTACTTTGCTAGCAAACg
tttgggtcttcgaattcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacttaatcgccttgcagcacatcc
ccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgcgcagcctgaatggcgaatggcgcct
gatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaag
ccagccccgacacccgccaacacccgctgacgcgccctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgt
ctccgggagctgcatgtgtcagaggttttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggt
taatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatttttctaaatacattc
aaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcg
cccttattccctttttgcggcattttgccttcctgtttttgctcacccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgc
acgagtgggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttt
aaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattgacgccgggcaagagcaactcggtcgccgcatacactattctcagaatgacttg
gttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataa
cactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcc
ttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgc
gcaaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttc
tgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggc
cagatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagat
aggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatactttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggat
ctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatca
aaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgtttgccggatc
aagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttcttctagtgtagccgtagttaggcca
ccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtctta
ccgggttggactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggag
cgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggt
atccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcggg
tttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccttttta
cggttcctggccttttgctggccttttgctcacatgttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagct
gataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaaga

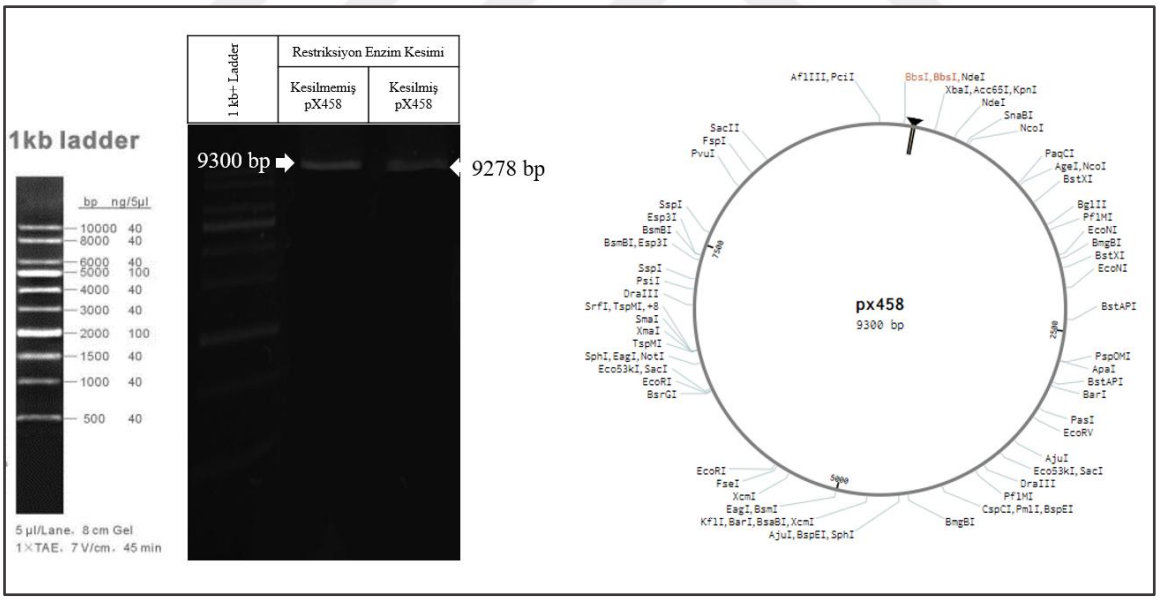
4.2.3. Restriksiyon Enzim Kesimi

BbsI (New England Biolabs(NEB)) restriksiyon enzimi kullanılarak 37°C'de CutSmart (10X) Buffer (NEB) kullanılarak üreticinin talimatlarına göre kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Kesim reaksiyonundan sonra ürünler %0,7 konsantrasyonundaki agaroz jelde yürütülerek kesim doğrulanmıştır ve vektör ile kaset Zymoclean Gel DNA Recovery Kit kullanılarak jelden elüe edilmiştir (Şekil 53, Şekil 54 ve Şekil 55).

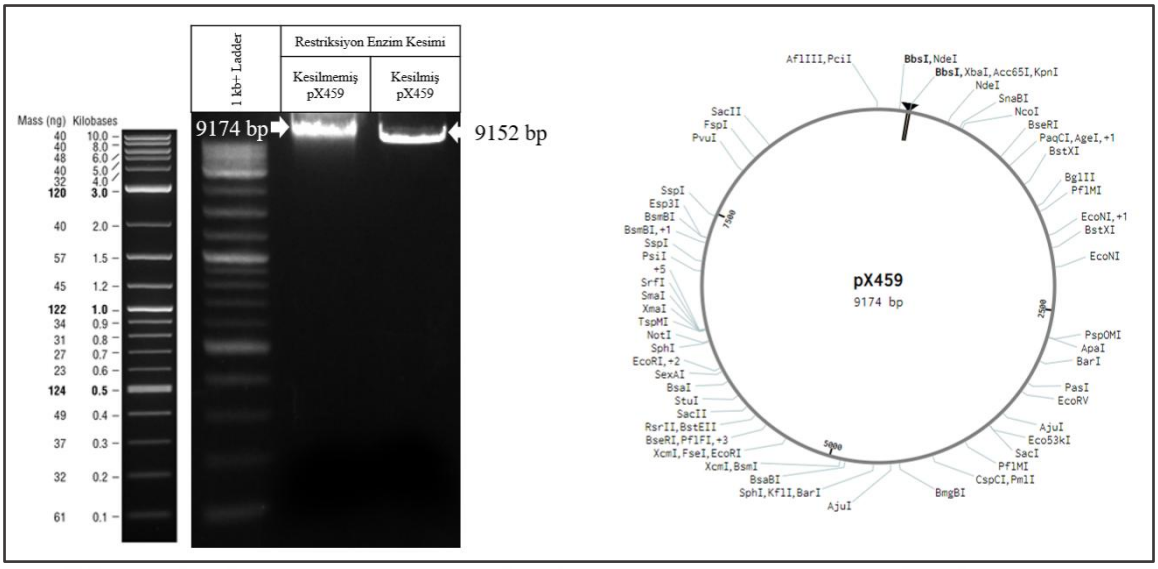


Şekil 53: 1093 bp uzunluğundaki bant sgRNAların temsil edildiği sekansa aittir.



Şekil 54: pX458 plazmidinin kesiminin doğrulanması

Restriksiyon enzimi ile her iki kısımdan kesilen vektör lineerize olmuş ve vektörden 22 bp ayrılmıştır.

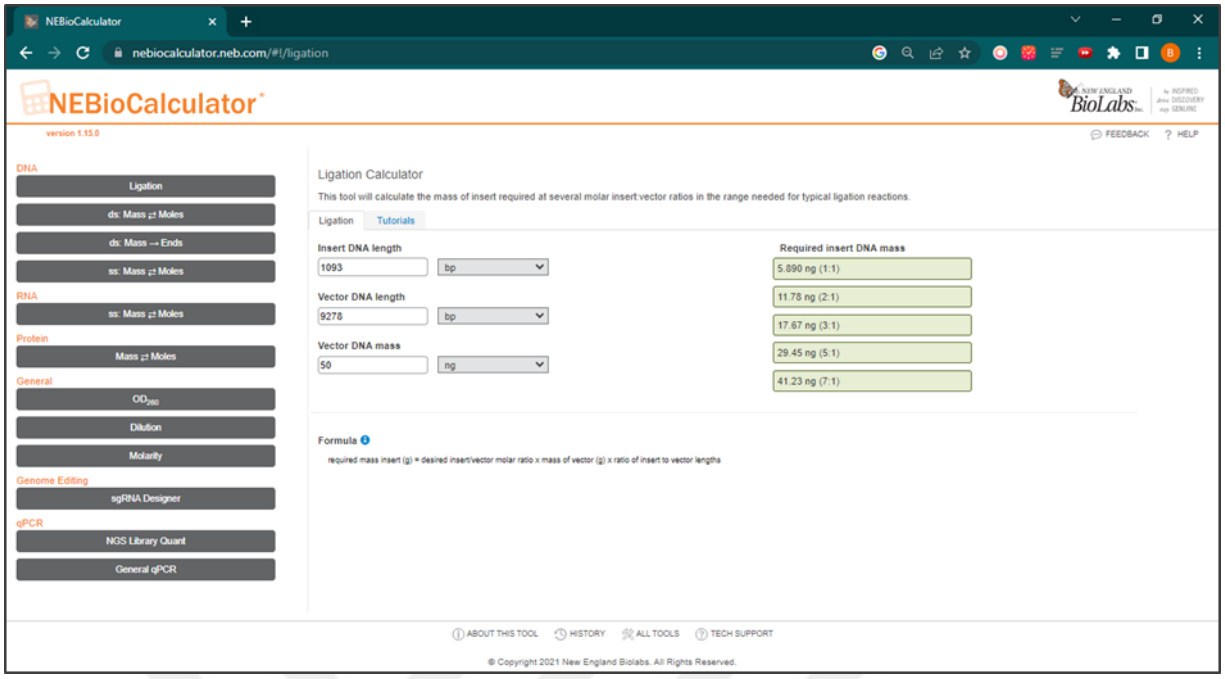


Şekil 55: pX459 plazmidinin kesiminin doğrulanması

Restriksiyon enzimi ile her iki kısımdan kesilen vektör lineerize olmuş ve vektörden 22 bp ayrılmıştır.

4.3. T4 Ligaz Enzimi ile Ligasyon

Her üç plazmid de *BbsI* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra 4sgRNA kasetinin, lineerize edilmiş CRISPR/Cas9 vektörüne komplementer olarak bağlanıp vektöre entegre edilmesi için T4 ligaz enzim kiti (400,000 units/ml, New England BioLabs) kullanılarak ligasyon sağlanmıştır (Şekil 56).



Şekil 56: Ligasyon hesaplamaları

Ligasyon işlemi için NEBioCalculator uygulaması kullanılarak hesaplamalar yapılmış ve 3:1 vektör-insert oranı belirlenmiştir.[166]

Elde edilen ligasyon ürünlerine sırasıyla pX458_4sgRNA ve pX459_4sgRNA adları verilmiştir.

4.4. Transformasyon

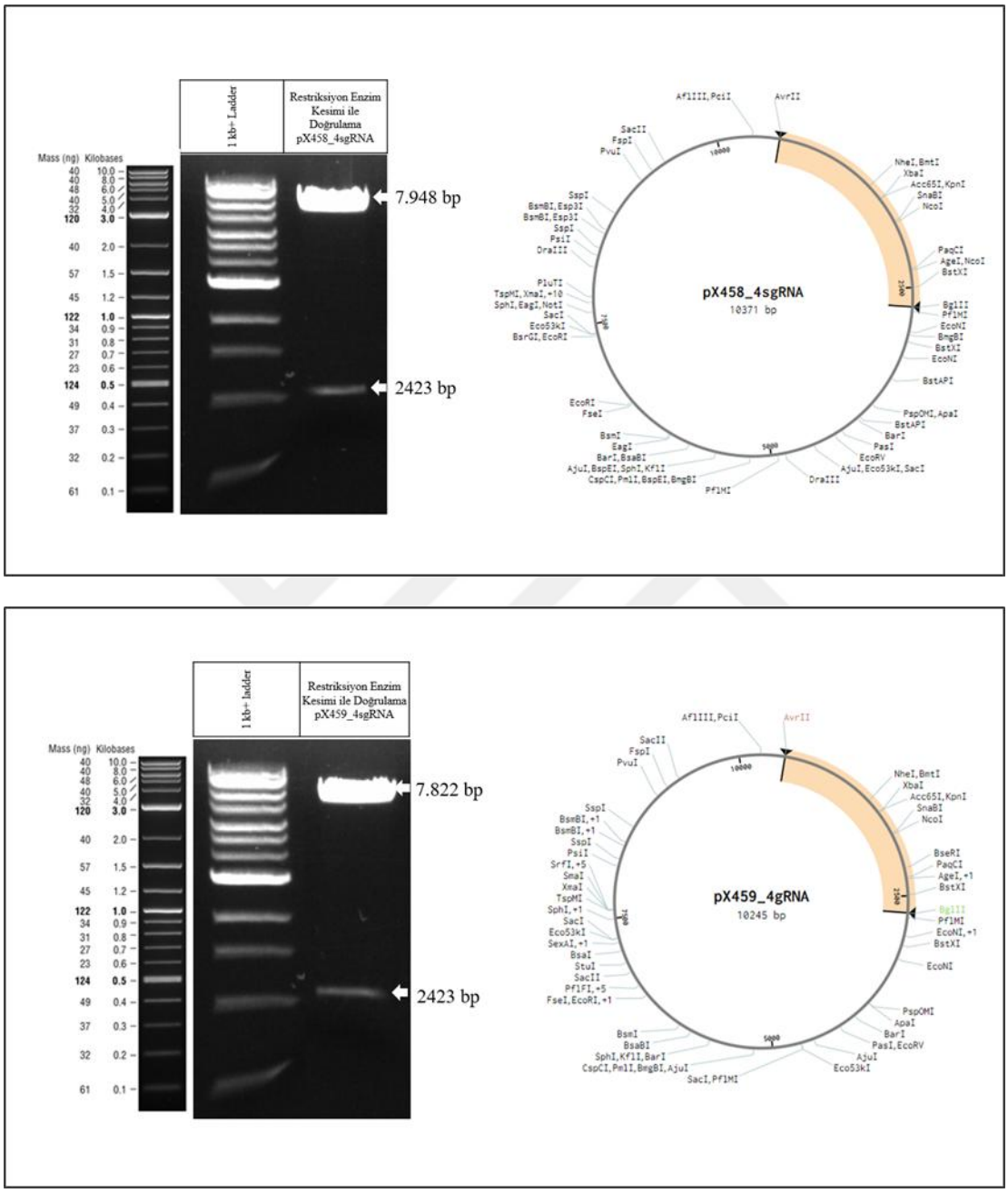
Kompetan *Stbl3*, *Top10* ve *DH5α* suşları, pX458_4sgRNA ve pX459_4sgRNA plazmidleri ile transforme edilmiştir.

DH5α suşu diğer 2 kompetan *E. coli* suşundan daha üretken bulunmuştur. Daha sonra bu plazmidler, üreticinin protokolüne göre iNtRON's DNA-spinTM Plasmid DNA Purification Kit ile izole edilmiştir.

4.4.1. Plazmidlerin Restriksiyon Enzim Kesimi ile Doğrulamasının Yapılması

Vektör plazmid ile sgRNAların doğru bir şekilde birleştiğinden emin olmak için sadece vektör plazmid üzerinde bulunan ve plazmidi tek bir yerinden kesen *BglII* enzimi ve sadece 4sgRNA kasetinde bulunan ve kaseti tek bir yerinden kesen *AvrII* enzimi ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kesimden sonra elde edilmesi beklenen parçanın boyutu her iki plazmidde de 2423 bp'dir.

Agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme sonucunda, kesim reaksiyonları neticesinde hesaplandığı gibi doğru uzunluklarda parçaların oluştuğu gösterilmiştir (Şekil 57).



Şekil 57: Ligasyon kontrolleri

Vektör plazmid ile 4sgRNA kasetinin doğru bir şekilde birleştiğinden emin olmak için sadece vektör üzerinde bulunan ve plazmidi tek bir yerinden kesen *BglII* enzimi ve sadece 4sgRNA dizisinin içinde bulunan ve kaseti tek bir yerinden kesen *AvrII* enzimi ile kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 4sgRNA kasetinin vektör ile doğru bir şekilde birleştiği gösterilmiştir. Üstte: pX458_4sgRNA; Altta: pX459_4sgRNA plazmidine ait görüntüler bulunmaktadır.

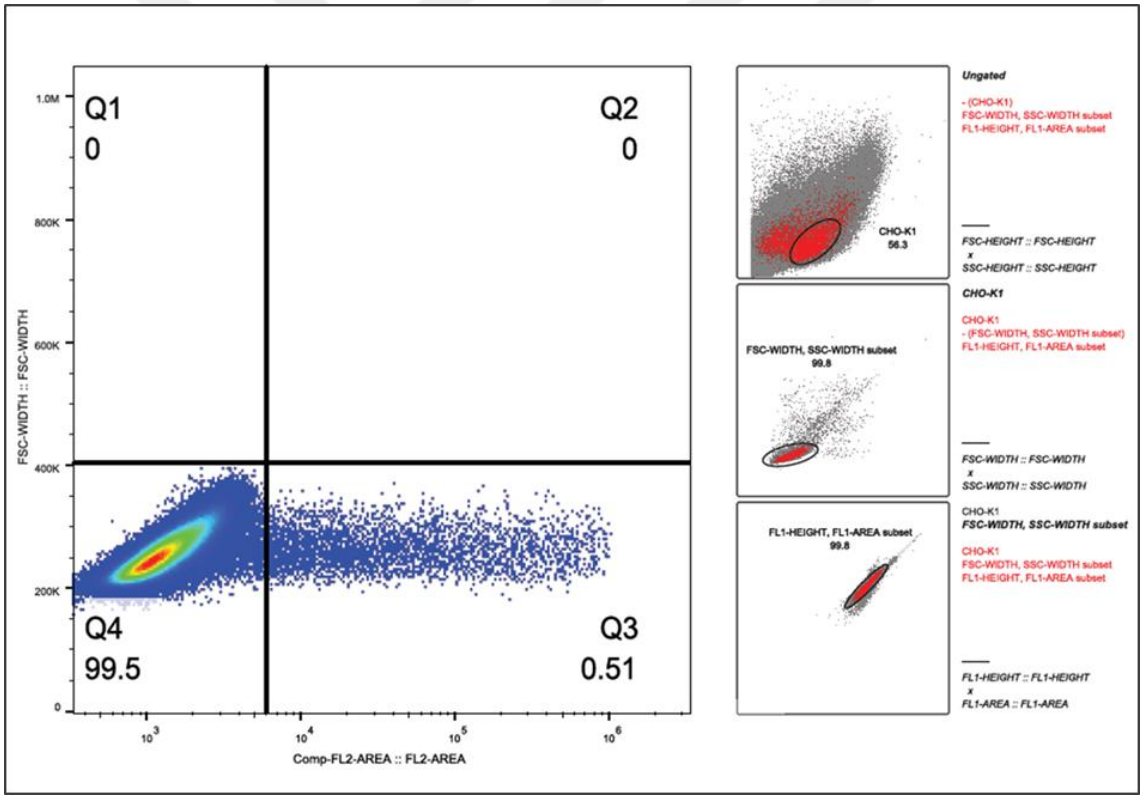
4.5. PEI ile Transfeksiyon

4sgRNA kasetini taşıyan CRISPR/Cas9 plazmidlerinin CHO-K1 hücrelerine transfekte edilmesi için toplam $0,1x10^6$ hücre kullanılmış, 1 µg/mL plazmid için 3,3 µg/mL PEI ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Takip eden günlerde hücreler ters mikroskop ve floresan mikroskobu ile gözlemlenmiştir. Belirli bir yoğunluğa ulaşan hücreler ileriki deneyler için hazır hale getirilmiştir.

4.6. Transfekte Olan Hücrelerin Seçilimi

4.6.1. FACS

Transfeksiyondan sonra pX458_4sgRNA plazmidi ile transfekte edilen hücreler, akış sitometrisi ile seçilip ayrıştırılmıştır. Hücreler 1-2 x 10^6hücre/mL'ye ulaşana kadar kültürlenmiştir.



Şekil 58: FACS analizi ile yeşil floresan ışıması yapan hücrelerin seçilmesi

"Forward scatter" hücrenin membranına gelip yansıyan ışık dalgalarının detektör ile kırılımını ölçmektedir.

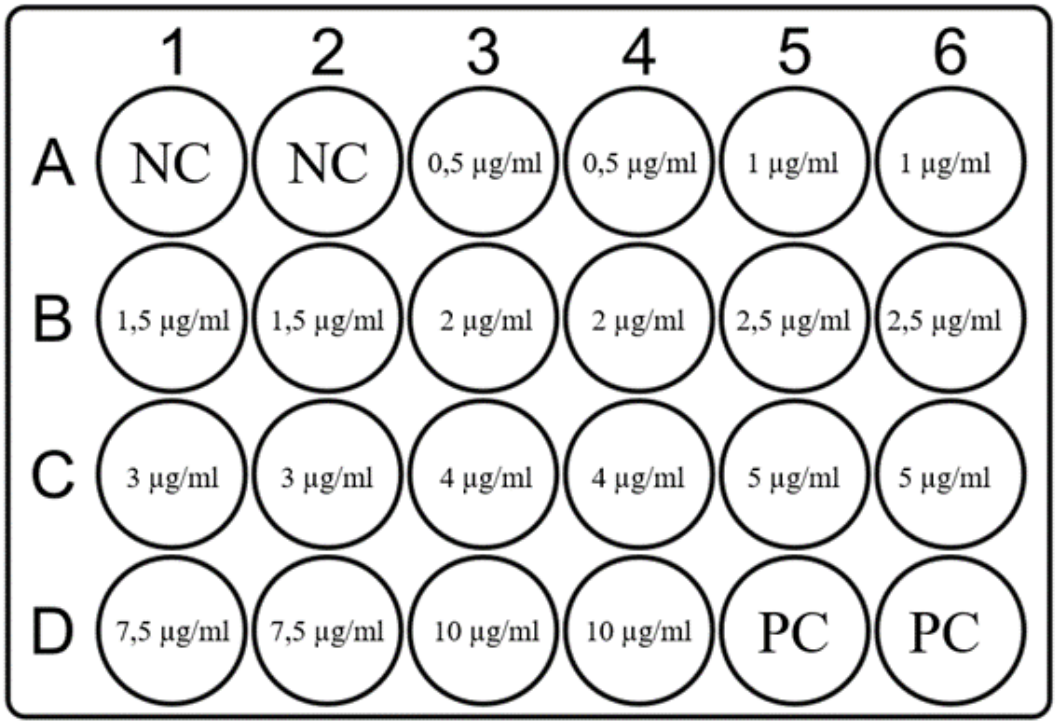
"Side scatter" hücrenin içerisine girip granüliteden kaynaklı olarak yansıyan ışık dalgalarının detektör ile kırılımını ölçmektedir.

Hücreler boyutlarına ve granülitelerine göre "Ungated" olan kısımda ayrılmıştır.

"Gate" olarak alınan hücrelerin popülasyonunun çoğunluğu oluşturacak şekilde biriktiği alanlar seçilmiştir. Daha sonra seçilen alanda yükseklik ve genişlik analizi ile sırayla ayrılan popülasyon FL2-FITC kanalında dot blot analizi yapılmıştır. Dot blot analizi hücre boyutu baz alınarak FITC+ olan hücreler Q3 alanında yakalanarak (sort edilerek) izole edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda hücrelerin %0,5'i GFP^+ olarak bulunmuştur. Q4 alanında GFP^- olan CHO-K1 hücreleri biriktirilmiştir (Şekil 58).

4.6.2. Puromisin Öldürme Eğrisi

pX459_4sgRNA ile transfekte edilmiş hücrelerin izolasyonu için optimal antibiyotik konsantrasyonunu belirlemek için Puromisin öldürme eğrisi deneyi yapılmıştır. Medya 2 hafta boyunca her 2 günde bir değiştirilmiş ve her kuyudaki hücrelerin canlılığı kontrol edilmiştir. Hücreler gözlenmiş ve CHO-K1 hücre hattı için optimal doz 7,5 µg/mL puromisin olarak belirlenmiştir (Şekil 59).



Şekil 59: Öldürme Eğrisi

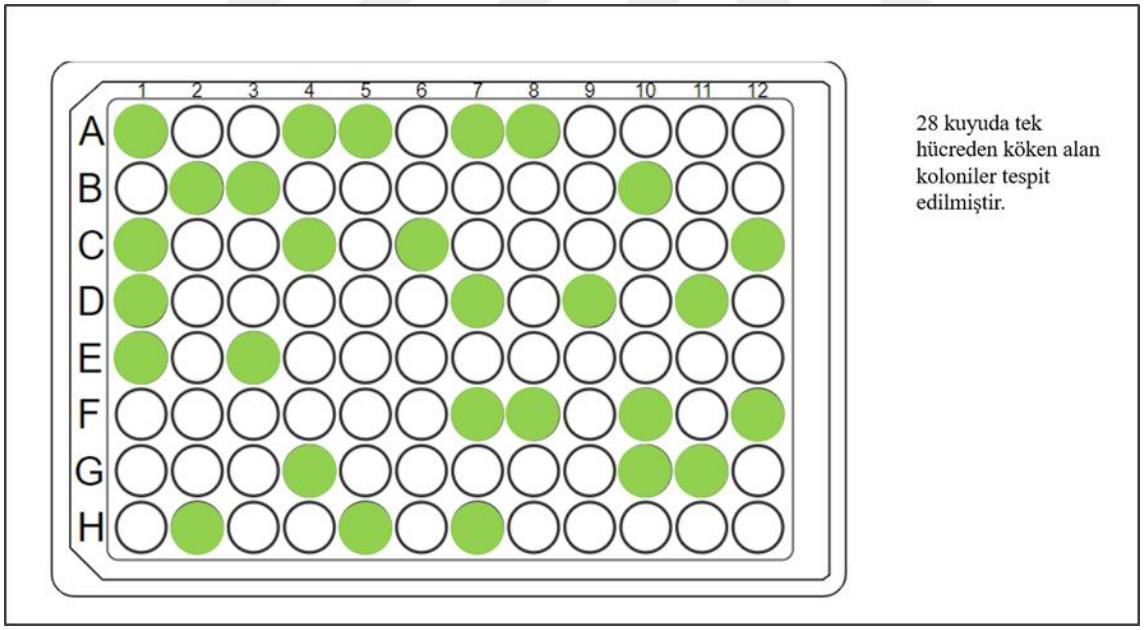
Düşük doz: 0,5-2,5 µg/mL aralığında hücreler puromisin antibiyotiğinin toksisitesinden etkilenmelerine rağmen hücrelerin tamamı ölmemiştir.

Optimum doz: 3-5 µg/mL aralığında puromisin kullanılarak 7 gün inkübe edilen hücrelerin ölmeye başladıkları tespit edilmiştir.

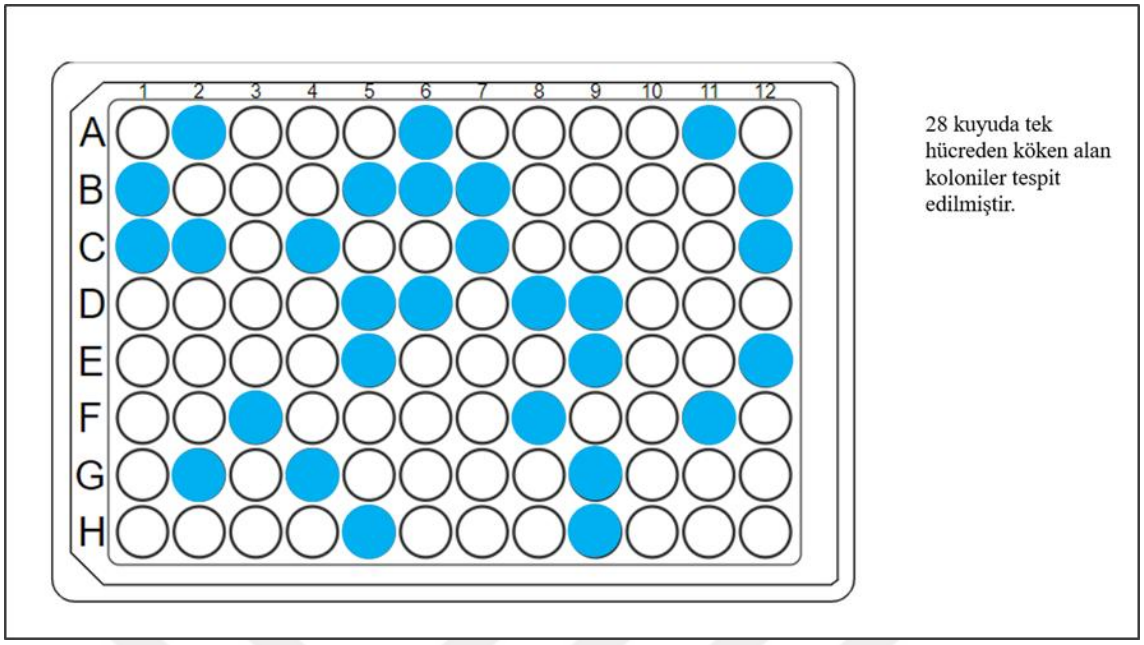
Yüksek doz: 7,5-10 µg/mL aralığında puromisin kullanıldığında hücrelerin tamamının ilk 4 içinde öldüğü tespit edilmiştir.

4.7. Klonal İzolasyon ve Hücre Kültürünün Genişletilmesi

Gupta ve arkadaşlarının belirttiği şekilde yapılmıştır. [167] Poliklonal hücre popülasyonunun mililitrede üç hücre olacak şekilde bir konsantrasyona seyreltilmesi ile 96 kuyulu plakanın her üç kuyusundan birine tek hücrenin denk gelmesi sağlanarak hücre kültürü yapılmıştır. Son kuyu dışında plakaların her bir kuyusuna 100 µL hücre solüsyonu dağıtılmıştır. Mikroskobu odaklayabilmek için son kuyuya 1 x 10^5 hücre/mL ekilmiştir. İlerleyen günlerde hücrelerin büyümesi gözlemlenmiş ve tek hücreden köken alan koloniler seçilmiştir (Şekil 60 ve Şekil 61). Hücreler yeterli doluluk oranına ulaştığında, 24 kuyulu plakalara pasajlanmıştır. Daha sonra hücre kültürleri genişletilmiştir.



Şekil 60: pX458_4sgRNA ile transfekte edilen CHO-K1 hücrelerine ait tek hücreden köken alan kolonilere ait kültür

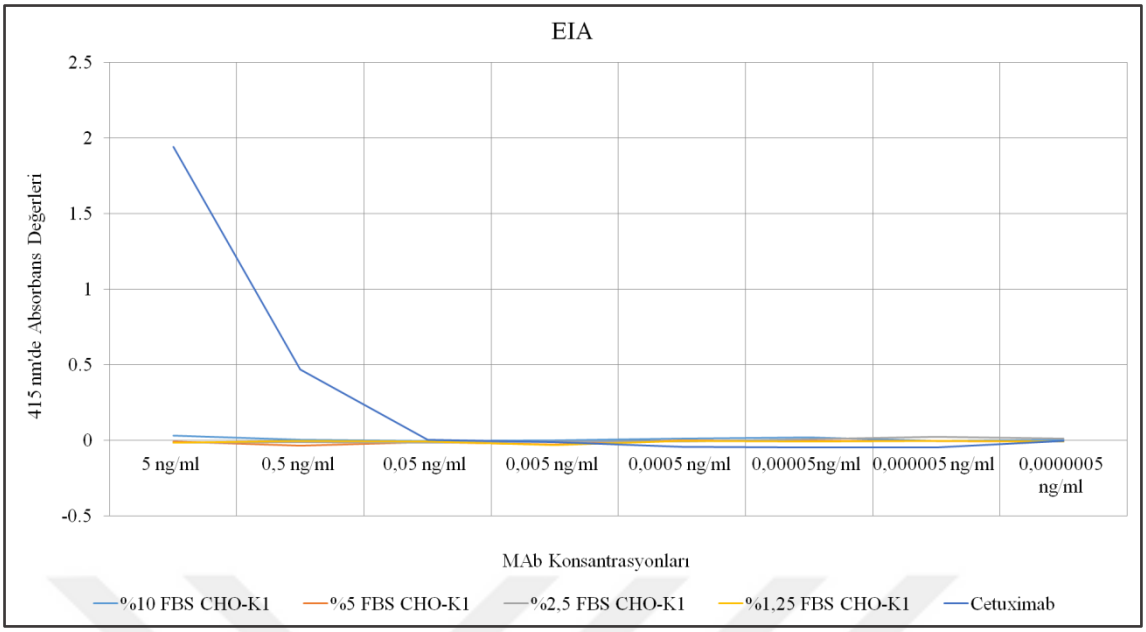


Şekil 61: pX459_4sgRNA ile transfekte edilen CHO-K1 hücrelerine ait tek hücreden köken alan kolonilere ait kültür.

pX458_4sgRNA ve pX459_4sgRNA plazmidleri kullanılarak transfekte edilen CHO-K1 hücrelerinin her iki plakada da yirmi sekiz kuyuda tek hücreden köken alan monoklonal hücre popülasyonlarından oluştuğu ve toplamda elli altı koloninin olduğu gözlemlenmiştir.

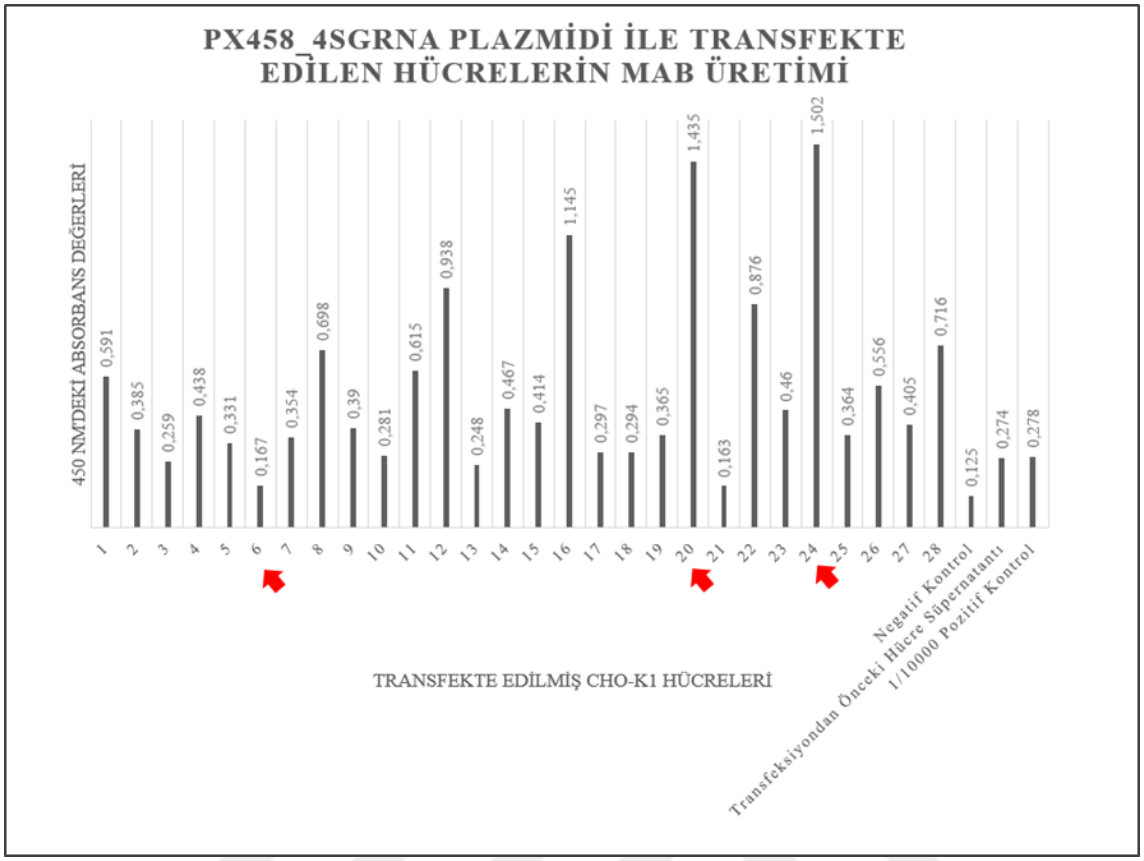
4.8. EIA ile MAb Üretiminin Kontrolü

Her serum azaltma işlemi sonucunda ve gen nakavtı işlemi sonucunda hücrelerin mAb üretme miktarında değişim olup olmadığının kontrol edilmesi için EIA deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla serum azaltma ve transfeksiyondan sonra hücrelerin kültürünün yapıldığı medyumlar toplanmıştır ve EIA plaklarını kaplamak amacıyla bu süpernatantlar kaplama tamponu ile 1:1 oranında karıştırılıp kuyulara yüklenmiştir. Deney sonunda plakadaki kuyuların 415 nm ve 450 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüştür. Pozitif kontrol olarak ticari Cetuximab kullanılmıştır. Transfeksiyondan önce pasajlanan son hücrelerin medyumu toplanarak kör kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol için taze (kullanılmamış) medyum kullanılmıştır (Şekil 62, Şekil 63 ve Şekil 64).



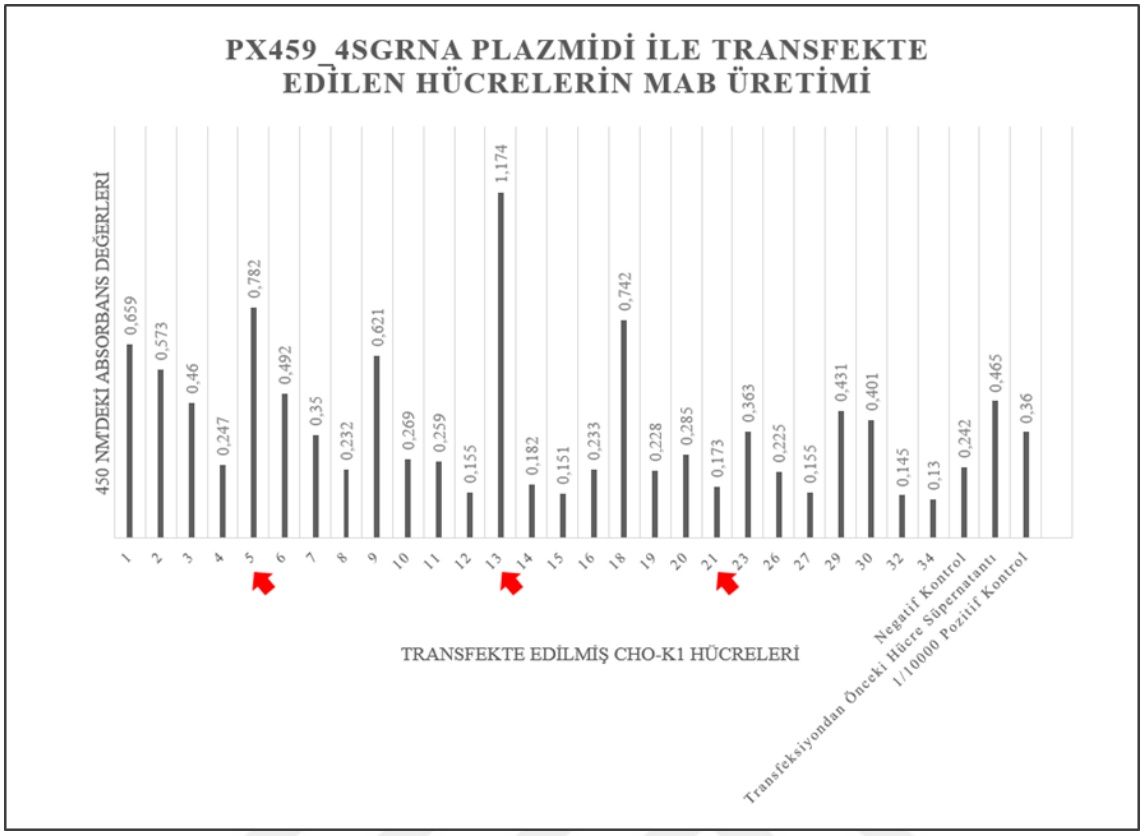
Şekil 62: Serum azaltmanın mAb üretimine etkisinin anlaşılması için yapılan EIA

CRISPR/Cas9 gen nakavtı deneyinden önce, bu aşamaya kadar her serum seviyesinde hücrelerin medyumları, serum azaltmanın mAb üretimindeki etkisini görmek amacıyla toplanmıştır ve bunlarla EIA deneyi yapılmıştır. Deneyin sonuçlarına göre serum azaltmanın mAb üretimi üzerinde herhangi bir olumlu veya olumsuz sonuç oluşturmadığı görülmüştür.



Şekil 63: pX458_4sgRNA Plazmidi İle Transfekte Edilen Hücrelerin mAb Üretimi

Bak1 ve *Bax* genlerinin CRISPR/Cas9 sistemi ile nakavt edilmesi için yapılan transfeksiyon sonrasında tek hücre kolonisi yapılan hücrelerin süpernatantı toplanarak EIA ile mAb üretimlerinde meydana gelen değişimlere bakılmıştır. MAb üretimi transfeksiyon öncesine göre azalan (6) ve artan (20 ve 24) koloniler PZR-RFLP deneyleri ile kontrol edilmek üzere seçilmiştir (Şekil 63).



Şekil 64: pX459_4sgRNA Plazmidi İle Transfekte Edilen Hücrelerin mAb Üretimi

Bak1 ve *Bax* genlerinin CRISPR/Cas9 sistemi ile nakavt edilmesi için yapılan transfeksiyon sonrasında tek hücre kolonisi yapılan hücrelerin süpernatantı toplanarak EIA ile mAb üretimlerinde meydana gelen değişimlere bakılmıştır. MAb üretimi transfeksiyon öncesine göre azalan (21) ve artan (5 ve 13) koloniler PZR-RFLP deneyleri ile kontrol edilmek üzere seçilmiştir (Şekil 64).

4.9. Nakavt Kontrolleri

4.9.1. PZR-RFLP

Restriksiyon enzimi parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) testi, hedef gen bölgesindeki uzunluk değişimlerini veya küçük indelleri tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada RFLP deneyinin nakavt kontrolü için kullanılmasının amacı, sgRNAların hedef bölgelerinin içerisinde bulunan birer restriksiyon enzimi tanıma bölgesinin Cas9 nükleazı tarafından indüklenen mutasyonlar sebebiyle bozulmasına dayanmaktadır.

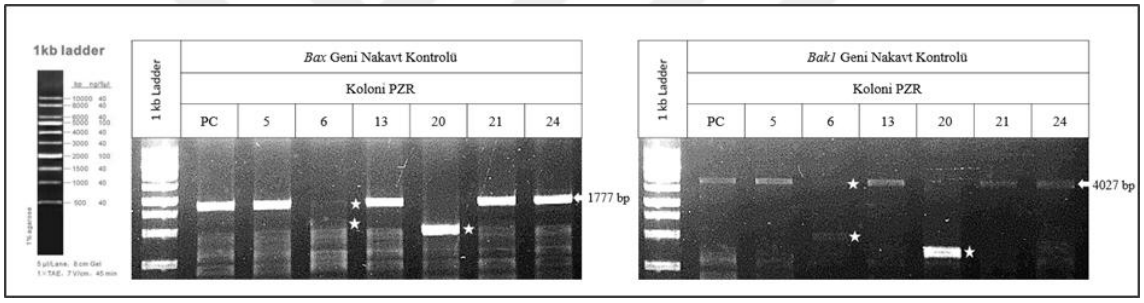
CRISPR/Cas9 aracılı gen nakavtı için yapılan transfeksiyon deneyleri sonrasında oluşması beklenen mutasyonların tespiti için hedef sekans, gene özgü tasarlanmış primerler ile amplifiye edilmiştir. PZR amplikonları daha sonra seçilen restriksiyon enzimleri ile

üreticinin talimatlarına göre kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kesim reaksiyonundan sonra elde edilen fragmanların boyutları agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. [168] [169]

Yabanıl tip (WT) genomik DNA ile kesimden sonra uzunlukları belirli aralıkta olması beklenen DKO gen sekansları birbiri ile karşılaştırılmıştır.

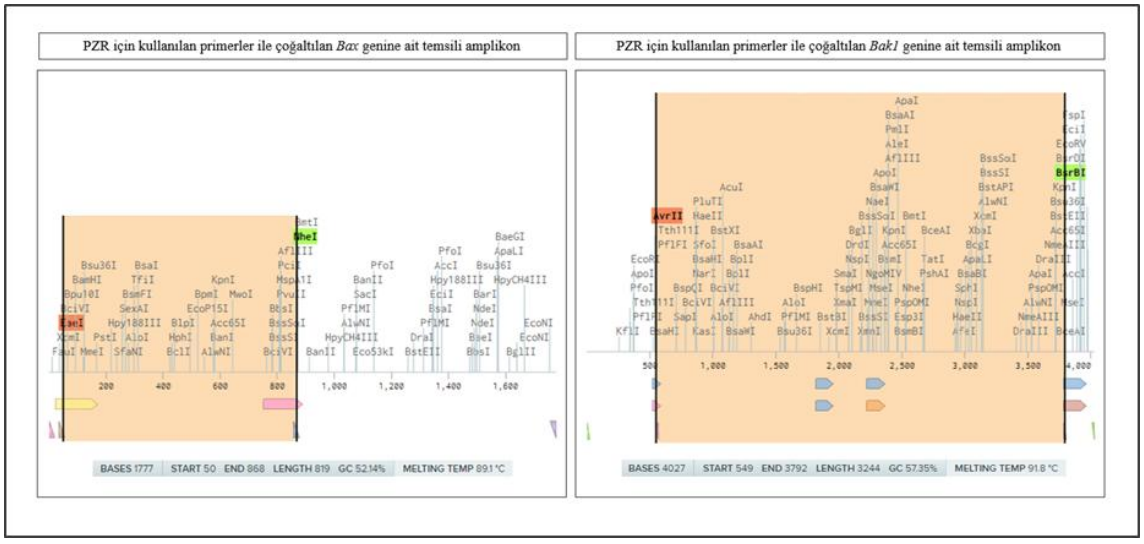
Bu deney için EIA sonucuna göre transfeksiyon öncesi mAb üretimine kıyasla daha fazla mAb üreten 5., 13., 20. ve 24. Koloniler ile daha az mAb üreten 6. ve 21. Koloniler seçilmiştir. 3'-5' eksonükleaz aktivitesine sahip Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polimeraz kiti (Vazyme Biotech Co., Ltd., Nanjing, China) kullanılarak PZR deneyi gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi ile PZR sonucunda oluşan amplikonlar görüntülenmiştir.

Bu deneylerin sonucunda 6. ve 20. Kolonilerin *Bak1* ve *Bax* geninde kısalmaların meydana geldiği Şekil 65'te gösterilmiştir.



Şekil 65: Koloni PZR

Koloni taraması için yapılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuncunda *Bak1* ve *Bax* genlerine ait sekanslar görülmektedir. Beyaz oklar ile gösterilen kısımlar amplikonun sahip olması gereken boyutu, beyaz yıldızlarla belirtilen kısımlar gen nakavtı sonucunda bu sekansların boyutlarında meydana gelen değişimi ifade etmektedir. Sol tarafta *Bax* sağ tarafta *Bak1* genlerine ait PZR ürünleri bulunmaktadır.

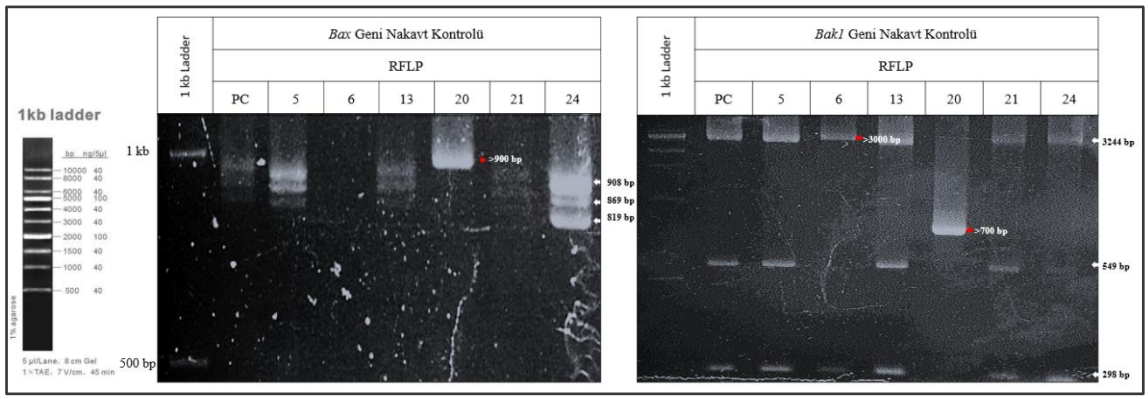


Şekil 66: PZR ile çoğaltılan bölgeler

Benchling üzerinden yapılan primer tasarımı ile *Bax* ve *Bak1* genleri üzerinde bulunan hedef sekanslar gösterilmiştir. Doğrulamanın yapılacağı sekansların ortalarında bulunan belirlenmiş olan enzimlerin kesim bölgeleri turuncu alanla temsil edilen PZR ürünlerinin üzerinde turuncu ve yeşil renklerle aydınlatılarak gösterilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinden sonra PZR ürünleri, Zymo jel elüsyonu ve DNA saflaştırma kiti ile ayrıştırılmıştır. Daha sonra uygun restriksiyon enzimleri ile üreticinin talimatlarına göre kesilmiştir (Şekil 66).

Yapılan deneylerin sonucunda; *Bak1* geni için 6 ve 20. koloniler ile *Bax* geni için 6 ve 20. kolonilerde tam bir kesilme reaksiyonunun gerçekleşmemesi, bu genlerin nakavtının gerçekleşmiş olduğunun kanıtı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 67).



Şekil 67: PZR-RFLP

Koloni PZR'den sonra PZR ürünleri jel elüsyonu ile saflaştırılıp konsantre edilmiştir. Bu ürünler daha sonra restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonuna alınmıştır. Sol tarafta *Bax* sağ tarafta *Bak1* genlerine ait PZR ürünleri bulunmaktadır. Beyaz oklar ile gösterilen kısımlar

amplikonun sahip olması gereken boyutu, kırmızı oklarla belirtilen kısımlar gen nakavtı sonucunda bu sekansların boyutlarında meydana gelen değişimi ifade etmektedir.

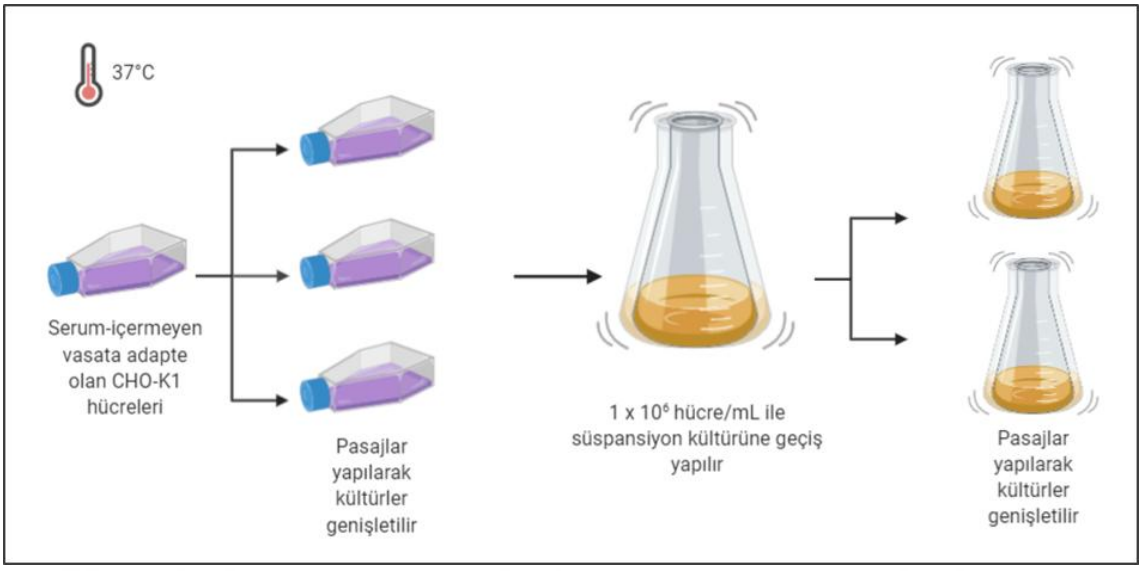
Bu deney sonuçlarına göre 20. Koloni ile sonraki deneylere devam edilmesine karar verilmiştir.

4.10. Medyum Replasmanı

Serum seviyesini azaltma işlemine %0,625 oranında FBS içeren RPMI 1640 medyumu ile devam edilmiştir. Hücrelerin serum seviyesine alışması ve belirli bir çoğalma oranına ulaşmasının ardından bir sonraki serum seviyesine (%0,31) geçiş yapılmıştır. Henüz bu aşamadayken adapte olmuş olan hücrelerle medyum değişimi deneylerine başlanmıştır. Bu amaçla totalde %0,31 FBS içeren ve %75'i RPMI 1640 %25'i EXCELL CD Hybridoma medyumundan oluşan vasat (3 RPMI 1640: 1 EXCELL CD (3:1 vasatı)) kullanılmıştır. Hücrelerin adaptasyonundan sonra FBS içermeyen 3:1 vasatına geçilmiştir. Hücrelerin ihtiyaçlarını takviye edebilmek amacıyla vasata 1X L-glutamin ve 200 mM HEPES ilave edilmiştir. Adaptasyon gerçekleştikten sonra %50 RPMI 1640- %50 EXCELL CD Hybridoma (1:1 vasatı) vasatı kullanılmaya başlanmıştır. Hücreler 1:1 vasatına alıştıktan sonra %25 RPMI 1640-%75 EXCELL CD Hybridoma (1:3 medyumu) vasatına geçilmiştir. En son olarak %100 EXCELL CD Hybridoma vasatına geçiş yapılmıştır.

4.11. Süspansiyon Kültürü

Hücreler serum-içermeyen EXCELL CD Hybridoma medyumuna tamamen uyum sağladıktan sonra süspansiyon kültürüne geçiş yapılmıştır. 125 mL'lik çalkalama şişesine 30 mL vasat eklenip 3 tane T-75 cm2'lik hücre kültürü şişesinde inkübe edilmiş hücreler (toplamda 1 x 10^6hücre/mL) bu çalkalama şişesine alınmıştır. Çalkalama şişeleri 80-120 rpm'de, 37°C'de inkübe edilmiştir (Şekil 68). Elde edilen bu süspanse hücre hattına 20S adı verilmiştir.



Şekil 68: Süspansiyon kültürüne geçiş

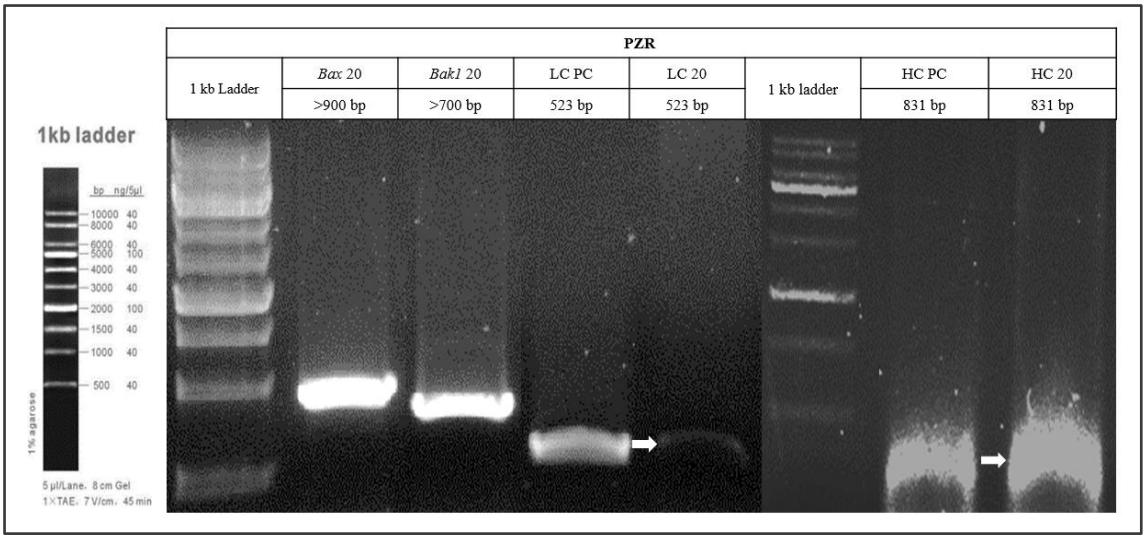
Bu çizim Biorender [170] ile oluşturulmuştur.

4.12. MAb Kontrolleri

Süspansiyon kültürüne geçişten sonra 20S hücrelerinin ürettiği mAba 20SmAb adı verilmiştir ve apoptozda görev alan DKO proteinler ile bu mAbın üretiminde görevli olan proteinler gen ve fonksiyon düzeyinde kontrol edilmiştir.

4.12.1. PZR

Süspansiyon kültürüne geçişten sonra hücrelerin gen düzeyinde çalışmaya konu olan *Bax*, *Bak1*, LC ve HC genlerinin kontrol edilmesi için PZR yapılmıştır (Şekil 69). Reaksiyon sonucunda tüm genlerden beklenen boyutta amplikon çoğaltılmıştır. Bu da süspansiyon kültürü neticesinde mAb üretimini gen seviyesinde etkileyecek bir sorunun bulunmadığını göstermektedir.



Şekil 69: PZR ile gen seviyesinde doğrulama

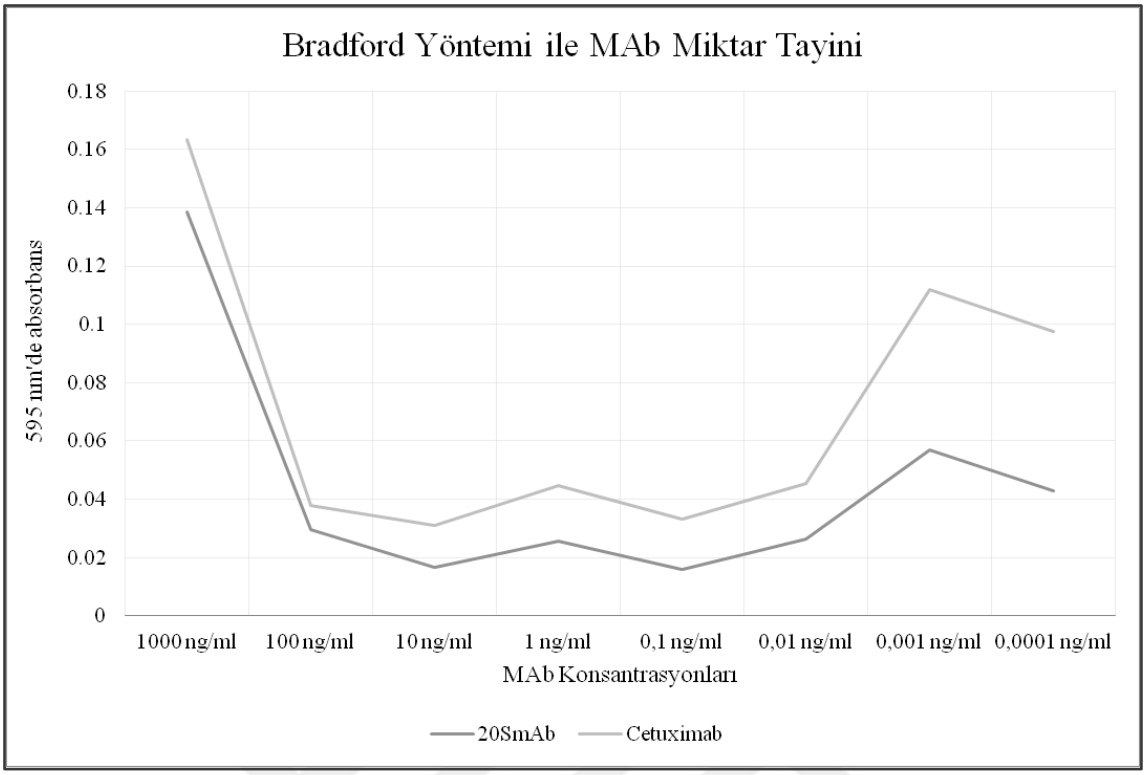
Polimeraz Zincir Reaksiyonu sonuncunda *Bax*, *Bak1*, LC ve HC genlerine ait sekanslar görülmektedir. Beyaz oklar ile gösterilen kısımlar amplikonun sahip olması gereken boyutları ifade etmektedir. En sol tarafta DKO *Bax*, sol tarafta DKO *Bak1*, sağ tarafta LC ve en sağ tarafta HC genlerine ait PZR ürünleri bulunmaktadır.

4.12.2. Bradford Testi ile MAb Miktar Tayini

Süspansiyon kültüründen sonra saflaştırılan mAbların miktarını ölçmek için Bradford yöntemi kullanılmıştır.

Pozitif kontrol olarak 1 µg/mL Cetuximab, kör kontrol olarak Pierce Protein A agaroz elüsyon tamponu ve nötralizasyon tamponu karışımı (9:1 oranında elüsyon tamponu: nötralizasyon tamponu) ve miktarı belirlenmek istenen mAb kullanılmıştır. Her örnekten on kat seyreltme ile seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Duplike çalışılmıştır. 96 kuyulu plakaya örneklerden 150 µL yüklendikten sonra 150 µL Bradford reaktif çözeltisi eklenmiş ve otuz saniye çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında on dakika bekletilip 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

Elde edilen değerlerin ortalamaları alınıp, kör kontrol değeri diğer örneklerin ortalamalarından çıkartıldıktan sonra, standart eğri hesaplaması yapılarak bir grafik oluşturulup protein miktarı belirlenmiştir (Şekil 70).



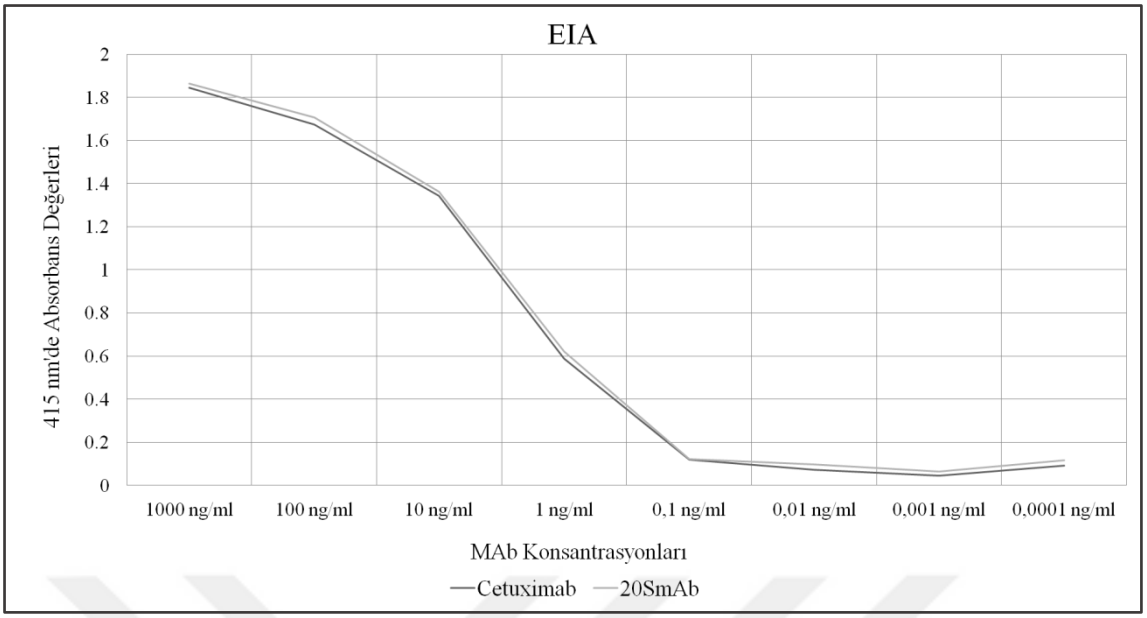
Şekil 70: Bradford antikor miktar tayini

Grafikte birbirine benzeyen bir düzende yükseliş ve düşüş gösteren değerlere göre elde edilen mAbın başlangıçta kullanılan miktarı neredeyse pozitif kontrolle aynı, yaklaşık 0,8 µg/mL olarak bulunmuştur.

Başından beri her adaptasyon aşamasından sonra meydana gelen değişimlerin anlaşılabilmesi amacıyla tüm kültürlere 4 x 10^5 hücre ile başlanmıştır. Bu sebeple süspansiyon kültürüne adaptasyondan sonra da 4 x 10^5 hücre ile yapılan 10 mililitrelik hücre kültürü yapılmıştır. İki günlük inkübasyondan sonra elde edilen mAb miktarı ortalama 800 ng olarak bulunmuştur.

4.12.3. EIA

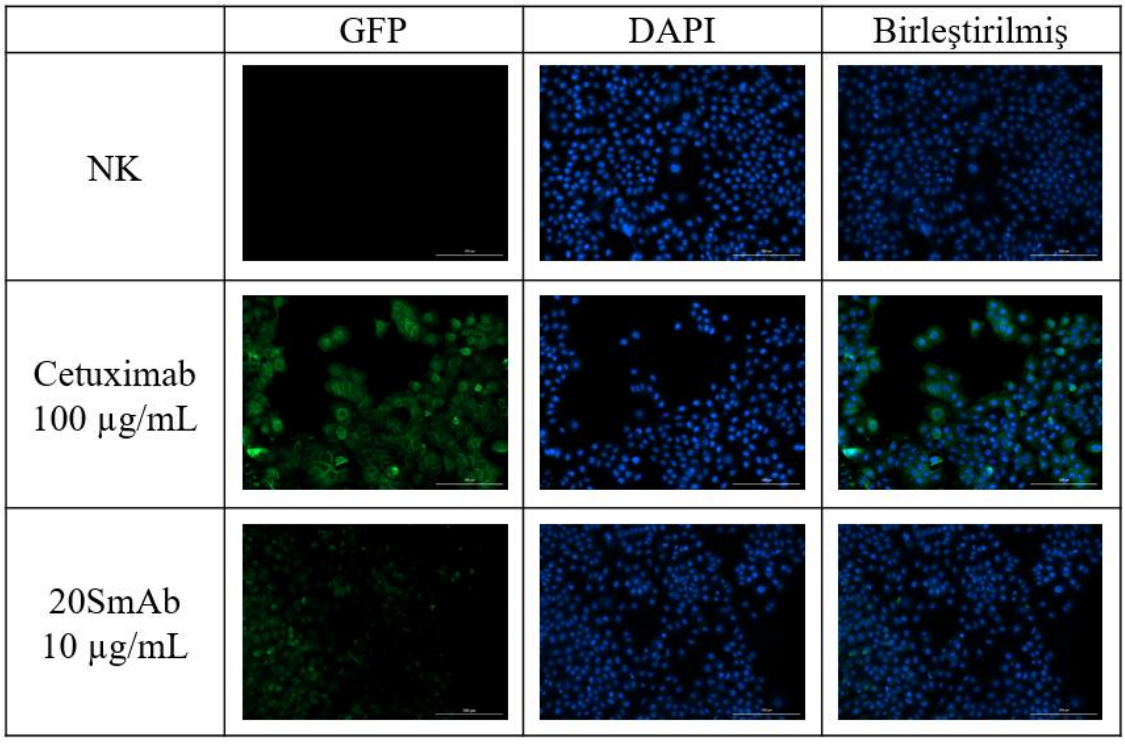
MAbların fonksiyonel olarak hedef antijene bağlanmalarının gösterilmesi amacıyla EIA yapılmıştır. Bunun için 1 µg/mL konsantrasyon ile başlayıp 1:9 oranında seri dilüsyonlar yapılarak her dilüsyonda pozitif kontrol ile 20SmAbların hedef A-431 hücresinin yüzeyinde aşırı ifade edilen EGFR'ye bağlanması karşılaştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak ticari Cetuximab, kör kontrol ve dilüsyon çözeltisi olarak 1X PBS ve elde edilmiş 20SmAbı kullanılmıştır. Şekil 71'de EIA' ya ait grafik görülmektedir.



Şekil 71: EIA ile mAbların hedef antijene bağlanmalarının kıyaslanması

4.12.4. IFA

A-431 hücreleri EGFR'yi çok fazla ifade etmektedir. Bu sayede Cetuximab ve 20SmAb'ın hücre yüzeyindeki EGFR'ye bağlandığını göstermek amacıyla IFA yapılmıştır. Bunun için pozitif kontrol olarak kullanılan ticari Cetuximabdan 100 µg/ml ve 20SmAb'dan 10 µg/ml kullanılmıştır. NC olarak 1X PBS kullanılmıştır.



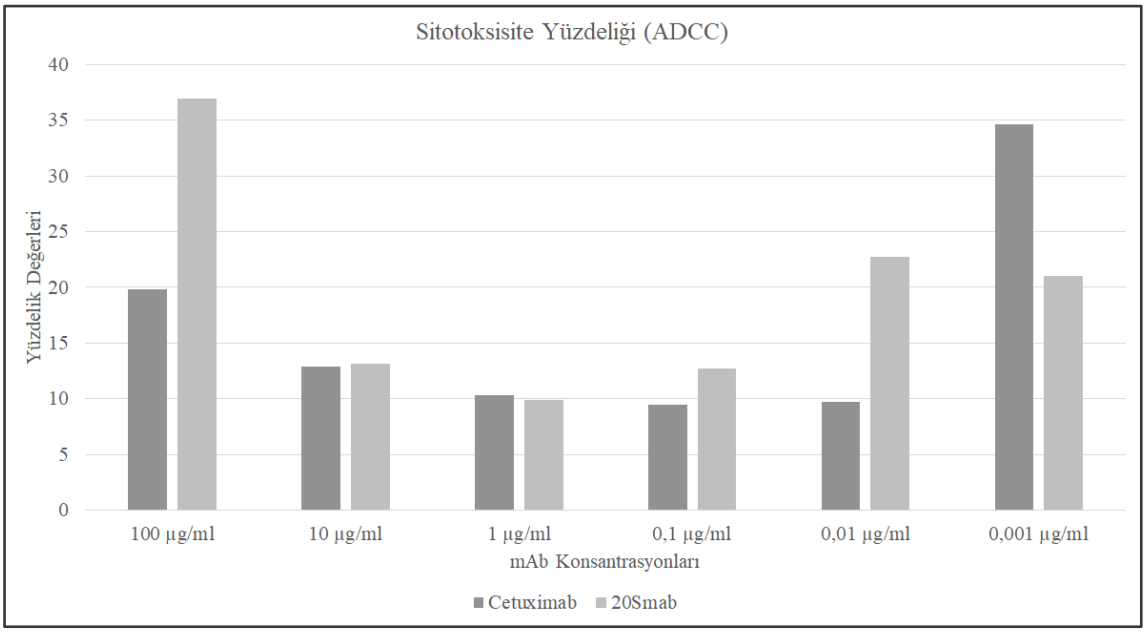
Şekil 72: IFA ile mAbların EGFR'ye bağlanmasının gösterilmesi

IFA deneyinin sonucunda EGFR ifade eden A-431 tümör hücrelerine mAbların bağlanması gösterilmiştir. Yukarıda NC, ortada Cetuximab (100 µg/ml), altta 20SmAb (10 µg/ml); Ölçek 200 µm.

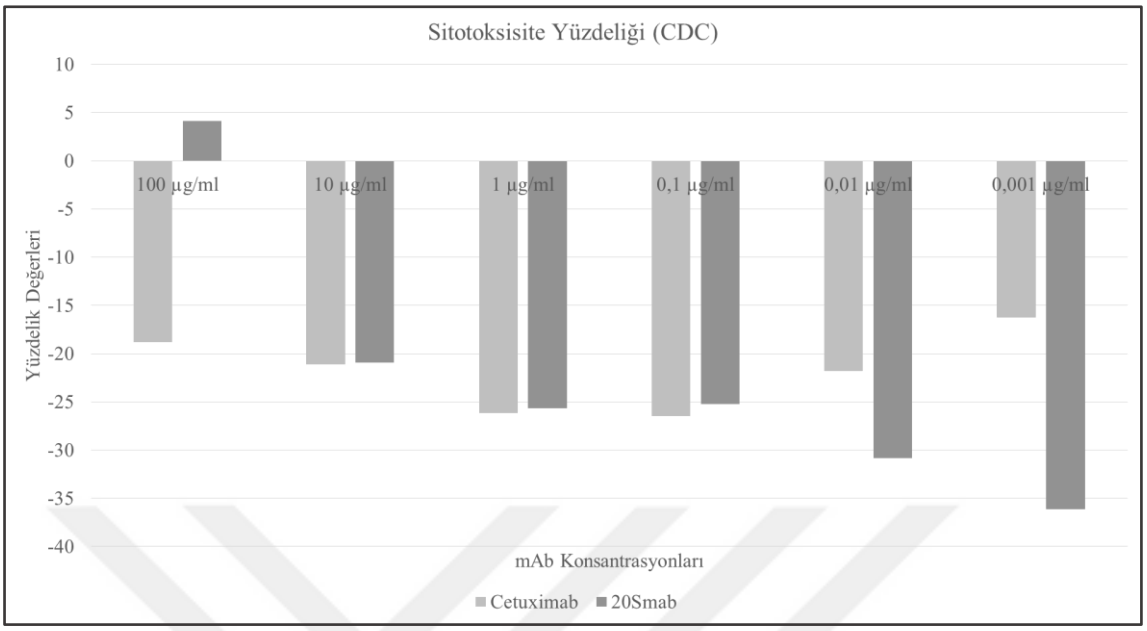
4.12.5. Sitotoksisite

Üretilen 20SmAb'ın hedef hücre üzerindeki sitotoksisitesine bakılmıştır. Bu amaçla GBiosciences LDH kiti üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır. Kimura ve arkadaşlarının anlattığı gibi kuyu başı 5000 hedef hücre ve 50000 efektör hücre (1:10 oranında hedef:efektör) U-tabanlı 96 kuyulu plakaya pasajlanmıştır. [189] Sağlıklı donörlerden kan alınmış ve Ficoll-Paque® PREMIUM Medium, 1.084 (Cytiva, USA) ile PBMC ve kompleman kaynağı olarak serum ayrıştırılmıştır.

ADCC ticari Cetuximabdan daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 73). Cetuximabın sitotoksisitesinin belirlenmesi için daha önce yapılan çalışmada [189] CDC aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir. Yaptığımız deneyde ise 100 µg/ml konsantrasyonda 20SmAb'ın kullanıldığı kuyularda hedef hücreler üzerinde belirli bir yüzdelikte toksik etki oluşturduğu fakat diğer dilüsyonlarda kompleman kaynağı olarak kullanılan serumun hedef hücrelerin proliferasyonunu desteklediği görülmüştür (Şekil 74). Bu toksisitenin sebepleri arasında 20SmAb'ın daha efektif olması, 20SmAb'ın yeni Cetuximabın daha eski olması, 20SmAb'ın elüsyonunda kullanılan tamponunun hedef hücrelere toksik gelmesi sayılabilir.



Şekil 73: ADCC Yüzdeliği



Şekil 74: CDC Yüzdeliği

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada terapötik monoklonal antikor üreten CHO-K1 hücrelerininin üretim verimliliğini artırmak ve hücre kültürünü ticari üretime geçmeye hazırlamak amacıyla optimize etmek için literatürdekinden farklı olarak gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. İlk defa Cetuximab adlı mAbı üreten CHO-K1 hücrelerinde, 4sgRNA kaseti tek seferde birbiri ardına eklenerek ve vektöre aktarılarak CRISPR/Cas9 yöntemi ile sadece *Bak1* ve *Bax* genlerinin her biri için iki gen bölgesi hedef alınarak nakavt gerçekleştirilmiş, nakavtın kontrol edilmesi amacıyla emsallerinden farklı olarak RFLP yöntemi kullanılmıştır. Transfeksiyon öncesine göre mAb üretiminde nakavt gerçekleştikten sonra yaklaşık on kat ve süspansiyon kültürüne geçiş yapıldıktan sonra yaklaşık yüz kat artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 70).

CRISPR/Cas9 aracılı genom düzenleme sisteminde hücrelerde hedef dışı bölgelerde de değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu nedenle mAb üretmekte olan mutant CHO-K1 hücrelerine yapılan transfeksiyon sonrasında elde edilen kolonilerde meydana gelen mAb üretim miktarındaki değişimlere bakılmıştır. Değişimin olması bu hücrelerde pX458_4sgRNA ve pX459_4sgRNA plazmidlerinin transkripte edildiğini ve belki de gen nakavtının başarı ile gerçekleşmiş olabileceğini göstermektedir. Seçilen kolonilerle koloni PZR yapılmış ve gen nakavtının varlığı test edilmiştir. Gerçekten de bu kolonilerin bazılarında hem *Bak1* hem de *Bax* geninin, seçilmiş olan iki bölgeden de değişime uğradığı ve bu genlerin boyutlarında kısalmaların meydana geldiği görülmüştür (Şekil 66 ve Şekil 67). RFLP ile de enzim tanıma bölgelerinde oluşan farklılıktan dolayı PZR ürünlerinin kesilmediği gösterilmiştir. Çalışmalara seçilen 20. Koloni ile devam edilmiştir. Bu koloninin transfeksiyon sonrası yaklaşık on kat daha fazla mAb üretmeye başladığı hem EIA hem de Bradford yöntemleri ile gösterilmiştir. Bu hücrelerin serum azaltma deneylerinde de başarılı bir şekilde serum içermeyen vasata adapte olmaları sağlanmıştır. Rodrigues ve arkadaşlarının literatürde paylaştıkları gibi serum seviyesi azaldıkça bu hücrelerin medyuma takviyeler yapılmasına ihtiyaç duydukları gözlemlenmiştir. [53] Bu amaçla serum içermeyen EXCELL CD Hybridoma medyumuna 1X L-glutamine ve 200 mM HEPES eklenerek hücrelerin büyümesi desteklenmiştir. Tamamen EXCELL medyumuna geçildiğinde, bu medyumun hücrelere

toksik geldiği ve hücre canlılık oranını yüksek miktarda azalttığı gözlemlenmiştir. Fakat birkaç pasajdan sonra hücrelerin medyuma alıştığı ancak çoğalma hızlarında yaklaşık yirmi dört saatlik bir uzamanın meydana geldiği görülmüştür.

Hücrelerin apoptoza karşı dirençli oldukları fakat bazı durumlarda hücrelerin birkaç pasaj boyunca, hücre sayısında artış olmaksızın veya hücre sayısında azalmalara rağmen canlılıklarında azalma olmaksızın, senesens ya da otofaji gözlemlenmiştir. Bu da Lum ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada belirttikleri gibi *Bak1* ve *Bax* DKO hücrelerde apoptoz hücrelerin otonom hayatta kalımı için yeterli olmadığı ve büyüme faktörlerinin eksikliğinde ilerleyen atrofi nedeniyle, DKO hücreler otofajiyi etkinleştirerek ölüme teslim oldukları değerlendirilmektedir. [171]

Üretilen 20SmAb'ın fonksiyonelliğinin gösterilmesi için IFA, ADCC ve CDC deneyleri yapılmıştır. 10 µg/ml konsantrasyondaki 20SmAb'ın, neredeyse 100 µg/ml konsantrasyondaki ticari Cetuximab kadar iyi bağlandığı floresan mikroskopta gösterilmiştir (Şekil 72). Literatürdekinin aksine [189] ADCC değerlendirmesinde Cetuximabın 10 µg/mL mAb konsantrasyonunda ADCC seviyesinin %30 olması beklenirken %15 seviyelerinde sitotoksisiteye sebep olduğu, tüm konsantrasyonlarda 20SmAb'ın Cetuximaba oranla genel olarak daha yüksek sitotoksisiteye sebep olduğu gösterilmiştir. Bu toksisite farkının meydana gelmesinin ardındaki sebepler arasında 20SmAb'ın daha efektif olması, 20SmAb'ın yeni Cetuximabın daha eski olması, 20SmAb'ın elüsyonunda kullanılan tamponunun hedef hücrelere toksik gelmesi olasılıkları bulunmaktadır (Şekil 73 ve Şekil 74).

Cetuximab kimerik monoklonal antikoru, rekombinant olarak Sp2/0 memeli hücre hattında üretilmektedir. Bu hücre hattı bir hibridomadır. *Mus musculus* dalak ve miyeloma hücrelerinin füzyonundan meydana gelen hücreden köken almaktadır. Lenfoblast benzeri hücre yapısına sahip olduğu için süspansiyon kültüründe, serum, hayvansal protein ve hayvansal içerik kullanılmayan EXCELL Sp2/0 Serum-Free medyumu ile üretilmektedir. [172] İmmünolojide biyo-işleme amacıyla kullanılan bu hücre hattının tercih edilme sebepleri arasında; tabii olarak sekresyon yapabilmesi, yüksek titrelerde mAb üretebilmesi, insan benzeri protein katlanmaları yapabilmeleri ve bu nedenle endüstride altın standart olarak kullanılması sayılabilir. [173] [188]

Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Cetuximab'ın genetiği değiştirilmiş keçilerin süt bezlerinde ifadesi sağlanarak keçi sütünde üretimi yapılmıştır. Bu şekilde ticari Cetuximab ile kendi ürettikleri rekombinant mAbın (gCetuximab) biyolojik olarak aktivitesini

kıyaslamış ve bu yöntemle üretilebilecek mAbların hayvan kanser modellerinde kullanılabileceğinden, litrede 10 grama kadar gCetuximab üretebildiklerinden ve keçilerden elde edilen mAbda α-gal bağlanmaları bulunmadığından hücre kültüründe üretilen ticari Cetuximabdan daha düşük immünojenik yan etkilere yol açtığını ve son olarak daha yüksek antikora bağımlı hücresel sitotoksisiteye neden olduğundan bahsetmişlerdir. [174]

Bu çalışmada CHO-K1 hücre hattının seçilmesinde; bu hücre hattının çevresel kaynaklı ideal olmayan yüksek oksijen konsantrasyonları, sıcaklık, pH, basınç değişimlerine karşı tolerans sağlayabilmesi, süspansiyon kültürüne adapte edilebilmesi, yüksek miktarda insan-benzeri mAb üretebilmesi gibi birçok sebep bulunmaktadır. Ayrıca, CHO-K1 hücreleri iyi karakterize edildikleri için bu hücreler üzerinde CRISPR/Cas9 gen düzenlemesi ile gen nakavtı yapılabilmesi kolaylaşmaktadır. [175]

Gen nakavtından sonra mAb üretimi on kat ve süspansiyon kültürüne geçildikten sonra yüz kat artmış olmasına rağmen 4 x 10^5 hücre ile on mililitre EXCELL CD Hybridoma medyumu kullanılarak başlatılan hücre kültüründe iki günlük inkübasyondan sonra yaklaşık 1 µg Cetuximab üretildiği gösterilmiştir. Bu da yapılan diğer çalışmalara göre düşük bir miktar olarak karşımıza çıkmaktadır.

Her gen için iki gen bölgesini hedef alan sgRNAlar tasarlanıp doğrulamalar yapılmıştır. Proteinlerin mutasyona açık bölgeleri belirlenmiş ve buna göre sgRNAlar seçilmiştir. Tüm sgRNAların etkili bir şekilde hedef hücrenin içerisine aktarılıp belirlenen dört gen bölgesinde kalıcı olarak değişikliğe sebep olması amaçlanmıştır. Bunun için tüm sgRNAların tek seferde ve aynı plazmid üzerinde hücre içine aktarılması hedeflenmiştir. Literatürde aynı amaçla sgRNAların birleştirildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda sgRNAlar öncelikle tek tek ve ayrı ayrı vektör plazmidde U6 promotor bölgesi ile sgRNA iskele bölgesi arasına klonlanmaktadır. Daha sonra her bir U6-sgRNA-sgRNA iskelesi belli bir restriksiyon enzimi ile kesilip birbirleri arkasından eklenerek yeni bir vektör plazmide Golden Gate klonlama yöntemi ile aktarılmaktadır. CRISPR/Cas9 gen düzenlemesi için üzerinde Cas9 ve raportör protein bulunan ikinci bir plazmid ile eş zamanlı olarak hedef hücreye transfekte edilmektedir. [133] [135] [133]

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada iş yükünü azaltmak, sgRNAların birbiri ardına düzgün bir şekilde eklenmesini sağlamak ve ayrıca tek bir plazmid ile 4sgRNA kasetini ve Cas9 nükleazını hücreye aktarmak amaçlanmıştır. Bu sebeple gen düzenleme aracı olan Benchling [161] üzerinde ve moleküler biyoloji uygulamaları için tasarlanmış bir yazılım olan SnapGene [176] adlı uygulama üzerinde sekansları bilinen U6 promotor bölgesi ve sgRNA iskelesinin ortasına sgRNAlar gelecek şekilde dört gen için bu üçlü fragman arka arkaya eklenerek, elde edilen 4sgRNA kaseti vektör plazmid olan pUC19'a klonlanmıştır.

4sgRNA kaseti ilk defa bu çalışmada kullanılan yöntemle hazırlandıktan sonra bir seferde vektör plazmide aktarılmıştır. Böylelikle mültipleks gen nakavtı çalışmalarında kullanılmak üzere literatüre daha kolay bir yöntem kazandırılmıştır. Ayrıca bu yöntemin gen nakavtında başarılı olduğu ve hedeflenen gen sekanslarında beklentiyi karşılayacak şekilde silinmeler olduğu, sekanslamaya bir alternatif olarak RFLP yöntemi kullanılarak gösterilmiştir.

Çalışmanın tahmin edilenden daha uzun sürmesinin birkaç sebebi bulunmaktadır. İlk başlarda serum seviyesinin %10'dan %5'e çekilmesi hücreler üzerinde çok büyük bir etkiye sebep olmasa dahi serum seviyesi %2,5'in altına düşürüldüğünde hücrelerin uyum sağlamasında yaşanan zorluklar ilerleyen safhalarda yapılması hedeflenen deneylerin de ertelenmesine yol açmıştır. Bu nedenle CRISPR/Cas9 gen nakavtı planlananın aksine serum seviyesi %0,625 yerine %1,25 iken gerçekleştirilmiştir. Daha sonra polimeraz zincir reaksiyonlarının optimizasyonunun gerçekleştirilmesinde yaşanan problemler de RFLP deneyini öteleyerek zaman açısından geride kalınmasına yol açmıştır. Fakat neticede tüm bu sorunlar, ek süre ile istenen zaman aralığında aşılmış ve proje tasarlandığı şekilde tamamlanmıştır.

Ticari üretim için bir başlangıç sayılabilecek bu çalışmanın neticesinde bir anti EGFR mAbı üreten CHO-K1 hücrelerinden türetilen süspanse DKO *Bax* ve DKO *Bak1* 20S hücre hattı oluşturulmuş ve bu hücrelerin ürettiği mAba 20SmAb adı verilmiştir. Bu mAbın üretim miktarı 4 x 10^5 hücre tarafından iki günlük inkübasyonda yaklaşık 1 μg olarak bulunmuştur.

Ancak bu miktar literatür ile karşılaştırıldığında beklentiyi karşılamak konusunda yetersiz kalmaktadır. 20S hücrelerinin 20SmAbını üretim miktarının artırılabilmesi için daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Chartrain, M., & Chu, L. (2008). Development and production of commercial therapeutic monoclonal antibodies in Mammalian cell expression systems: an overview of the current upstream technologies. *Current pharmaceutical biotechnology*, 9(6), 447–467. https://doi.org/10.2174/138920108786786367
2. Fischer, S., Handrick, R., & Otte, K. (2015). The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology advances*, 33(8), 1878–1896. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.015
3. https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-turleri/kanser- turleri/kal%C4%B1n-ba%C4%9F%C4%B1rsak-kanseri-kolorektal-kanser.htmL Erişim Aralık 2021.
4. Downward J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(1), 11–22. https://doi.org/10.1038/nrc969
5. Colorectal cancer: are genetic and molecular biology researches reflected enough in the patient management? Emel Canbay, Dursun Buğra 2011,*Turkish Journal of Surgery*, Volume 27, Issue 4 Pages: 198-205 DOI: 10.5097/1300-0705.UCD.1256-11.01
6. Kang HN, Kim SH, Yun MR, Kim HR, Lim SM, Kim MS, Hong KW, Kim SM, Kim H, Pyo KH, Park HJ, Han JY, Youn HA, Chang KH, Cho BC. ER2, a novel human anti-EGFR monoclonal antibody inhibit tumor activity in non-small cell lung cancer models. *Lung Cancer*. 2016 May;95:57-64. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.02.013. Epub 2016 Feb 27. PMID: 27040853.
7. Iwamoto N, Yokoyama K, Takanashi M, Yonezawa A, Matsubara K, Shimada T. Verification between Original and Biosimilar Therapeutic Antibody Infliximab Using nSMOL Coupled LC-MS Bioanalysis in Human Serum. Curr *Pharm Biotechnol*. 2018;19(6):495-505. doi: 10.2174/1389201019666180703093517. PMID: 29968534; PMCID: PMC6198460.
8. DrugBank (https://go.drugbank.com/drugs/DB00002) Erişim 02 Aralık 2022
9. Pandey J. P. (2012). Mechanism of resistance to cetuximab therapy in colorectal cancer: Possible role of antibodies to İmmünoglobulin allotypes. *mAbs*, 4(5), 553–554. https://doi.org/10.4161/mabs.21311

10. Schuler G, Reinacher M. Development and optimization of a single-step procedure using protein A affinity chromatography to isolate murine IgG1 monoclonal antibodies from hybridoma supernatants. *J Chromatogr*. 1991 Nov 29;587(1):61-70. doi: 10.1016/0021-9673(91)85198-o. PMID: 1783662.
11. Cacciatore JJ, Chasin LA, Leonard EF. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnol Adv*. 2010 Nov-Dec;28(6):673-81. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.04.003. Epub 2010 Apr 21. PMID: 20416368.
12. Holzlöhner P, Hanack K. Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *J Vis Exp*. 2017 Jan 2;(119):54832. doi: 10.3791/54832. PMID: 28117810; PMCID: PMC5407676.
13. Jiang Z, Huang Y, Sharfstein ST. Regulation of recombinant monoclonal antibody production in chinese hamster ovary cells: a comparative study of gene copy number, mRNA level, and protein expression. *Biotechnol Prog*. 2006 Jan-Feb;22(1):313-8. doi: 10.1021/bp0501524. PMID: 16454525.
14. Ghaleb, R., Naciri, M., Al-Majmaie, R., Maki, A., & Al-Rubeai, M. (2014). Enhancement of monoclonal antibody production in CHO cells by exposure to He-Ne laser radiation. *Cytotechnology*, 66(5), 761–767. https://doi.org/10.1007/s10616-013-9625-8
15. González-Leal IJ, Carrillo-Cocom LM, Ramírez-Medrano A, López-Pacheco F, Bulnes-Abundis D, Webb-Vargas Y, Alvarez MM. Use of a Plackett-Burman statistical design to determine the effect of selected amino acids on monoclonal antibody production in CHO cells. *Biotechnol Prog*. 2011 Nov-Dec;27(6):1709-17. doi: 10.1002/btpr.674. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21901863.
16. Meenakshi Arora. Cell Culture Media: A Review. *MATER METHODS*. Vol. 3. DOI: 10.13070/mm.en.3.175
17. Ozturk, S.S., Hu, W.-S., 2006. Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies. CRC Press, New York.
18. Liu S, Pereira NA, Teo JJ, Miller P, Shah P, Song Z. Mitochondrially targeted Bcl-2 and Bcl-X(L) chimeras elicit different apoptotic responses. *Mol Cells*. 2007 Dec 31;24(3):378-87. PMID: 18182854.
19. Lim, Sing & Chuan, Kok & Liu, Sen & Loh, Sophia & Chung, Beatrice & Ong, Chin & Song, Zhiwei. (2006). RNAi suppression of Bax and Bak enhances viability in fed-

batch cultures of CHO cells. *Metabolic engineering*. 8. 509-22. 10.1016/j.ymben.2006.05.005.

20. Cost GJ, Freyvert Y, Vafiadis A, Santiago Y, Miller JC, Rebar E, Collingwood TN, Snowden A, Gregory PD. BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells. *Biotechnol Bioeng*. 2010 Feb 1;105(2):330-40. doi: 10.1002/bit.22541. PMID: 19777580.
21. Grav LM, Lee JS, Gerling S, Kallehauge TB, Hansen AH, Kol S, Lee GM, Pedersen LE, Kildegaard HF. One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment. *Biotechnol J*. 2015 Sep;10(9):1446-56. doi: 10.1002/biot.201500027. Epub 2015 Apr 30. PMID: 25864574.
22. How Does CRISPR Compare with Other Gene-Editing Methods? (https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/576583-How-Does-CRISPR-Compare-with-Other-Gene-Editing-Methods/) Erişim 24 Aralık 2021
23. Das RC. Proteins and antibodies make advances as therapeutic products. Am Clin Lab 2001; 20(8):10–14.
24. PhRMA. Pharmaceutical Industry Profile. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, 2002.
25. Ozturk, S., & Hu, W.-S. (Eds.). (2005). Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies (1st ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780849351068
26. Griffiths B. Animal cell products, overview. In: Spier RE, ed. Encyclopedia of Cell Technology. Vol. 1. New York: John Wiley & Sons, 2000:70–76.
27. Finter NB, Garland AJM, Telling RC. Large-scale mammalian cell culture: a perspective. *Bioprocess Technology* 1990; 10:1–14.
28. Jedrzejczak-Silicka,M.,History of Cell Culture. In: Gowder, S. J. T. , editor. *New Insights into Cell Culture Technology* [Internet]. London: IntechOpen; 2017 [cited 2022 Jun 28]. Available from: https://www.intechopen.com/chapters/53566 doi: 10.5772/66905
29. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2018). Essential cell biology (5th ed.). Garland Publishing.
30. Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? - Scientific Figure on ResearchGate. Available from:

https://www.researchgate.net/figure/Timeline-of-important-milestones-in-cell-culture-and-GBM-cell-culture-reference-numbers_fig1_319076405 [accessed 28 Jun, 2022]

31. Cassimeris, L., Lingappa, V. R., Plopper, G., & Lewin, B. (2015). Lewin's cells (3rd ed.). Sudbury, Mass: Jones and Bartlett Publishers.
32. F. Pentimalli, A. Giordano, Cell Biology and Genetics, *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier, 2017, , ISBN 9780128096338, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12390-8. (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128096338123908)
33. R.A. Bradshaw, P.D. Stahl, Cell Biology: An Overview☆, *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2016, , ISBN 9780128012383, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99496-0. (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383994960)
34. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 6th edition. New York: Garland Science; 2015 Chapter 1 Cells and Genomes
35. Effect of Proteinase-k on DNA Extraction from Gram-positive Strains - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/1-Comparison-of-prokaryotes-and-eukaryotes_tbl1_256846988 [accessed 28 Jun, 2022]
36. Charis-P. Segeritz, Ludovic Vallier, Chapter 9 - Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro, Editor(s): Morteza Jalali, Francesca Y.L. Saldanha, Mehdi Jalali, Basic Science Methods for Clinical Researchers, Academic Press, 2017, Pages 151-172, ISBN 9780128030776, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.
37. Lanigan TM, Kopera HC, Saunders TL. Principles of Genetic Engineering. *Genes*. 2020; 11(3):291. https://doi.org/10.3390/genes11030291
38. http://aquafind.com/articles/Cell_Culture.php#:~:text=Cell%20culture%20are%20used%20as,to%20study%20triggers%20for%20ageing.
39. "Cell Culture Basics" (PDF). Invitrogen. pp. 26–27. Retrieved 20 June 2019.
40. Baydoun, A. (2005). Cell culture techniques. In K. Wilson & J. Walker (Eds.), Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology (pp. 71-102). Cambridge: *Cambridge University Press*. doi:10.1017/CBO9780511813412.003
41. Laminar Flow Hood. Thermo Fischer Scientific (https://www.thermofisher.com/tr/en/home.html)https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-equipment/laminar-flow-hood.html Erişim Kasım 2022

42. Nachet, 17 rue St. Severin, Paris The Nachet-Smith Inverted Chemical Microscope, c. 1885. Antique Brass Microscopes Wanted (http://www.antique-microscopes.com/) http://www.antique-microscopes.com/photos/Nachet_Chemical_Inverted_microscope.htm Erişim Kasım 2022

43. Phelan, K. and May, K.M. 2015. Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 66:1.1.1-1.1.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0101s66

44. Yao, T, Asayama, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*. 2017; 16: 99– 117. https://doi.org/10.1002/rmb2.12024

45. Nicole Gleichmann. Which Cell Culture Media Is Right for You? Technology Networks (https://www.technologynetworks.com/) Article Published: March 2, 2020 Last Updated: March 29, 2022 https://www.technologynetworks.com/cell-science/articles/which-cell-culture-media-is-right-for-you-331552#:~:text=Cell%20culture%20media%2C%20also%20known,in%20an%20appropriate%20artificial%20environment. Erişim Kasım 2022

46. Freshney, R.I. (2010) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 6th Edition, John Wiley & Sons Ltd., Hoboken. https://doi.org/10.1002/9780470649367

47. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*. 2010;27(1):53-62. doi: 10.14573/altex.2010.1.53. PMID: 20390239.

48. Freshney, R. I. (2005). Culture of animal cells: a manual of basic technique (5th ed.). NJ: JohnWiley&Sons

49. Zhang H, Wang H, Liu M, et al. Rational development of a serum-free medium and fed-batch process for a GS-CHO cell line expressing recombinant antibody. *Cytotechnology*. 2013;65(3):363-378. doi:10.1007/s10616-012-9488-4

50. Ozturk, Sadettin & Palsson, Bernhard. (1991). Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum serum-free media. *Biotechnology and Bioengineering*. 37. 35 - 46. 10.1002/bit.260370107.

51. Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Technological progresses in monoclonal antibody production systems. *Biotechnol Prog*. 2010 Mar-Apr;26(2):332-51. doi: 10.1002/btpr.348. PMID: 20043321.

52. Zhang J, Robinson D. Development of Animal-free, Protein-Free and Chemically-Defined Media for NS0 Cell Culture. *Cytotechnology*. 2005 Jun;48(1-3):59-74. doi: 10.1007/s10616-005-3563-z. PMID: 19003032; PMCID: PMC3449720.

53. Rodrigues ME, Costa AR, Henriques M, Cunnah P, Melton DW, Azeredo J, Oliveira R. Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013 Feb;169(4):1279-91. doi: 10.1007/s12010-012-0068-z. Epub 2013 Jan 11. PMID: 23306891.

54. Jacobia, S., Kenerson, R., Tescione, L., Gruber, D., Jayme, D., Munroe, D., & Gorfien, S. (2006). *Animal cell technology: basic & applied aspects*. Netherlands: Springer.

55. Lefloch F, Tessier B, Chenuet S, Guillaume JM, Cans P, Goergen JL, Marc A. Related effects of cell adaptation to serum-free conditions on murine EPO production and glycosylation by CHO cells. *Cytotechnology*. 2006 Sep;52(1):39-53. doi: 10.1007/s10616-006-9039-y. Epub 2006 Dec 29. PMID: 19002864; PMCID: PMC3449423.

56. Sinacore MS, Drapeau D, Adamson SR. Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Mol Biotechnol*. 2000 Jul;15(3):249-57. doi: 10.1385/MB:15:3:249. PMID: 10986701.

57. Use of Antibiotics and Antimycotics. Thermo Fischer (https://www.thermofisher.com/tr/en/home.html)https://www.thermofisher.com/tr/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/use-of-antibiotics-and-antimycotics.html Erişim Kasım 2022

58. Prof. Dr. A. Eser Elçin ders notu Temel Araştırma Teknikleri II

59. Baydoun, A. (2010). Cell culture techniques. In K. Wilson & J. Walker (Eds.), Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology (pp. 38-72). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511841477.003

60. https://en.wikipedia.org/wiki/Subculture_(biology)

61. Bruslind, Linda. "Microbial Growth." *General Microbiology*. Oregon State University. Web. 15 Mar. 2021.

62. "Bacterial Culture Techniques." Cold Spring Harbor Laboratory. 331-32. *DNA Learning Center Lab Protocols.* Web. 15 Mar. 2021. http://labprotocols.dnalc.org/files/017_bacteria_culture_techniques.pdf

63. Hu, W.-S. (2020). Cell Culture Bioprocess Engineering (2nd ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9780429162770 Overview of Cell Culture Processes

64. Fen Wang "CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE, FIFTH EDITION," I*n Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 42(5), 169, (1 May 2006). https://doi.org/10.1290/BR090501.1 syf no 322

65. PUCK TT, CIECIURA SJ, ROBINSON A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*. 1958 Dec 1;108(6):945-56. doi: 10.1084/jem.108.6.945. PMID: 13598821; PMCID: PMC2136918.

66. https://www.atcc.org/products/ccl-61

67. Jacob F, Nixdorf S, Hacker NF, Heinzelmann-Schwarz VA. Reliable *in vitro* studies require appropriate ovarian cancer cell lines. *J Ovarian Res*. 2014 Jun 7;7:60. doi: 10.1186/1757-2215-7-60. PMID: 24936210; PMCID: PMC4058698.

68. Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, Chen W, Xie M, Wang W, Hammond S, Andersen MR, Neff N, Passarelli B, Koh W, Fan HC, Wang J, Gui Y, Lee KH, Betenbaugh MJ, Quake SR, Famili I, Palsson BO, Wang J. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nat Biotechnol*. 2011 Jul 31;29(8):735-41. doi: 10.1038/nbt.1932. PMID: 21804562; PMCID: PMC3164356.

69. Hartmut Pohl. What are the Advantages of Using Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells?. Enzo Life Sciences (https://www.enzolifesciences.com/)https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2020/march/what-are-the-advantages-of-using-chinese-hamster-ovary-(cho)-cells?/)Erişim Kasım 2022

70. Christian Eberle Chief Executive Officer at evitria AG. CHO cells – 7 facts about the cell line derived from the ovary of the Chinese hamster. Evitria (https://www.evitria.com/)https://www.evitria.com/journal/cho-cells/cho-cells/Erişim Kasım 2022

71. A-431CRL-1555™. ATCC (https://www.atcc.org/)https://www.atcc.org/products/crl-1555Erişim Kasım 2022

72. A431 Cell Line human. MERCK (https://www.sigmaaldrich.com/TR/en) https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/cb_85090402 Erişim Kasım 2022

73. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2015) Cellular and Molecular Immunology. 8th Edition, Elsevier Saunders, Philadelphia, 4-8.

74. PDB DOI: 10.2210/pdb1IGY/pdb.

75. https://swissmodel.expasy.org/assess/mmdtFH/01 Erişim 15 Kasım 2022

76. Lanzavecchia A, Corti D, Sallusto F. Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Dec;18(6):523-8. doi: 10.1016/j.copbio.2007.10.011. Epub 2007 Dec 11. PMID: 18063358; PMCID: PMC7127177.

77. Steinitz M, Klein G, Koskimies S, Makel O. EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*. 1977 Sep 29;269(5627):420-2. doi: 10.1038/269420a0. PMID: 198669.

78. Kozbor D, Lagarde AE, Roder JC. Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 1982 Nov;79(21):6651-5. doi: 10.1073/pnas.79.21.6651. PMID: 6292911; PMCID: PMC347186.

79. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986 May 29-Jun 4;321(6069):522-5. doi: 10.1038/321522a0. PMID: 3713831.

80. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*. 2003 Sep 5;301(5638):1374-7. doi: 10.1126/science.1086907. Epub 2003 Aug 14. PMID: 12920303.

81. Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. J Immunol Methods. 2008 Jan 1;329(1-2):112-24. doi: 10.1016/j.jim.2007.09.017. Epub 2007 Oct 31. Erratum in: *J Immunol Methods*. 2008 May 20;334(1-2):142. PMID: 17996249; PMCID: PMC2243222.

82. Ozturk, S. S., & Hu, W.-S. (2006). Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. NY: CRC Press.

83. Virginia Bayer, An Overview of Monoclonal Antibodies, *Seminars in Oncology Nursing*, Volume 35, Issue 5, 2019, 150927, ISSN 0749-2081,

https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.006.
(https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749208119301093)

84. Chartrain, Michel & Chu, Lily. (2009). Development and Production of Commercial Therapeutic Monoclonal Antibodies in Mammalian Cell Expression Systems: An Overview of the Current Upstream Technologies. *Current pharmaceutical biotechnology*. 9. 447-67. 10.2174/138920108786786367.
85. Harding J, Burtness B: Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chemeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today* (Barc). 2005 Feb;41(2):107-27. doi: 10.1358/dot.2005.41.2.882662. (PubMed ID 15821783)
86. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L: Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol*. 2018 Jan;12(1):3-20. doi: 10.1002/1878-0261.12155. Epub 2017 Nov 27. (PubMed ID 29124875)
87. Wong SF: Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clin Ther*. 2005 Jun;27(6):684-94. doi: 10.1016/j.clinthera.2005.06.003. (PubMed ID 16117976)
88. Chidharla A, Parsi M, Kasi A. Cetuximab. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459293/
89. Gurdal H, Tuglu MM, Bostanabad SY, Dalkiliç B. Partial agonistic effect of cetuximab on epidermal growth factor receptor and Src kinase activation in triple negative breast cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2019 Apr;54(4):1345-1356. [PubMed]
90. Park SM, Hwang CY, Cho SH, Lee D, Gong JR, Lee S, Nam S, Cho KH. Systems analysis identifies potential target genes to overcome cetuximab resistance in colorectal cancer cells. *FEBS J*. 2019 Apr;286(7):1305-1318. [PubMed]
91. Agarwal V, Subash A, Nayar RC, Rao V. Is EGFR really a therapeutic target in head and neck cancers? *J Surg Oncol*. 2019 May;119(6):685-686. [PubMed]
92. Zenda S, Ota Y, Kiyota N, Okano S, Fujii M, Kitamura M, Takahashi S, Ueda T, Monden N, Yamanaka T, Tahara M. A Multicenter Phase II Trial of Docetaxel, Cisplatin, and Cetuximab (TPEx) Followed by Cetuximab and Concurrent Radiotherapy for Patients With Local Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (CSPOR HN01: ECRIPS Study). *Front Oncol*. 2019;9:6. [PMC free article] [PubMed]

93. Bardash Y, Tham T, Olson C, Khaymovich J, Costantino P. Anaphylactoid hypersensitivity reaction from intra-arterial cetuximab: Clinical considerations and management. SAGE *Open Med Case Rep*. 2019;7:2050313X18823447. [PMC free article] [PubMed]

94. Cetuximab Heavy and Ligt Chain FASTA format. Drug Bank (https://go.drugbank.com/drugs/DB00002/polypeptide_sequences.fasta)Erişim Kasım 2022

95. TTD - Therapeutic Targets Database Full Data Download File Title - TTD Biologic drug sequences in fasta format Version 8.1.01 (2021.11.08) Provided by IDRB Lab of Innovative Drug Reasearch and Bioinformatics College of Pharmaceutical Sciences Zhejiang University https://idrblab.org/ Provided by BIDD BioInformatic and Drug Design Group Department of Pharmacy National Unviersity of Singapore http://bidd.nus.edu.sg/ Any question about data provided here, please contact with: Dr. Zhou (zhou_ying@zju.edu.cn) and Dr. Zhang (zhangyintao@zju.edu.cn)http://db.idrblab.net/ttd/sites/default/files/ttd_database/P3-06-Biologic-drug-sequence.txt

96. Structure Assessment. Swiss Model (https://swissmodel.expasy.org/assess)https://swissmodel.expasy.org/assess/R2t3ee/01 Erişim Kasım 2022

97. Mignotte, B. and Vayssiere, J.-L. (1998), Mitochondria and apoptosis. *European Journal of Biochemistry*, 252: 1-15. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520001.x

98. Plopper G. Sharp D. Sikorski E. & Lewin B. (2015). Lewin's cells (3rd ed.). Jones & Bartlett Learning. Apoptosis (pp. 725-749) ISBN: 9781284029390

99. Fernández-Flores A, Aguilera B, Yau P, Oliva H. An old meaning of the word apoptosis. *Lancet*. 2002 Mar 23;359(9311):1072. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08086-8. PMID: 11937222.

100. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57. doi: 10.1038/bjc.1972.33. PMID: 4561027; PMCID: PMC2008650.

101. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6. doi: 10.1126/science.281.5381.1312. PMID: 9721091.

102. Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

103. Pradeep Nair, Min Lu, Sean Petersen, Avi Ashkenazi1.Apoptosis Initiation Through the Cell-Extrinsic Pathway. *Cancer Immunology*, Genentech, Inc., San Francisco, California, USA 1Corresponding author: e-mail address: aa@gene.com http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-417158-9.00005-4

104. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12. doi: 10.1126/science.281.5381.1309. PMID: 9721092.

105. Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Dec;14(6):715-20. doi: 10.1016/s0955-0674(02)00381-2. PMID: 12473344.

106. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*. 2002 Mar;9(3):459-70. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00482-3. PMID: 11931755.

107. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci*. 2004 Aug;13(8):1979-87. doi: 10.1110/ps.04789804. PMID: 15273300; PMCID: PMC2279816.)

108. Cassimeris, L., Lingappa, V. R., Plopper, G., & Lewin, B. (2015). Lewin's cells (3rd ed.). Sudbury, Mass: Jones and Bartlett Publishers.

109. Perforin/Granzyme Apoptosis Pathway. Creative Diagnostics (creative-diagnostics.com) (https://www.creative-diagnostics.com/perforin-granzyme-apoptosis-pathway.htm) Erişim Kasım 2022

110. Zhu P, Martinvalet D, Chowdhury D, Zhang D, Schlesinger A, Lieberman J. The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. *Blood*. 2009 Aug 6;114(6):1205-16. doi: 10.1182/blood-2008-12-195768. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19506301; PMCID: PMC2723016.

111. Granzyme A and Granzyme B Pathway. Thermo Fisher Scientific (https://www.thermofisher.com/tr/en/home.html) (https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/antibodies/antibodies-learning-center/antibodies-resource-library/cell-signaling-pathways/granzyme-pathway.html#References) Erişim Kasım 2022

112. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.

113. Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev*. 2001 Jun 15;15(12):1481-6. doi: 10.1101/gad.897601. PMID: 11410528; PMCID: PMC312722.

114. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001 Apr 27;292(5517):727-30. doi: 10.1126/science.1059108. PMID: 11326099; PMCID: PMC3049805.

115. What is gene editing? How is it different from genetic engineering?. American Farm Bureau Foundation for Agriculture (https://www.agfoundation.org/)https://www.agfoundation.org/common-questions/view/what-is-gene-editing-how-is-it-different-from-genetic-engineeringErişim Aralık 2022

116. Khalil, A.M. The genome editing revolution: review. *J Genet Eng Biotechnol* **18**, 68 (2020). https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y

117. CRISPR and Genomic Engineering Jennifer Walker-Daniels (jlwd at mail dot iastate dot edu) Iowa State University, United States,*MATER METHODS* 2013;3:164. DOI//dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.164 Datelast modified : 2022-09-24; original version : 2013-03-22

118. El-Sappah Ahmed H., Yan Kuan, Huang Qiulan, Islam Md. Monirul, Li Quanzi, Wang Yu, Khan Muhammad Sarwar, Zhao Xianming, Mir Reyazul Rouf, Li Jia, El-Tarabily Khaled A., Abbas Manzar. Comprehensive Mechanism of Gene Silencing and Its Role in Plant Growth and Development.*Frontiers in Plant Science* (Vol. 12) 2021 https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.705249 https://doi.org/10.3389/fpls.2021.705249 ISSN=1664-462X

119. Gene silencing From Wikipedia, the free encyclopedia (https://en.wikipedia.org/) https://en.wikipedia.org/wiki/Gene_silencing#:~:text=The%20genes%20can%20be%20silenced,them%20are%20rendered%20essentially%20inactive. Erişim Aralık 2022

120. Campeau, Eric & Gobeil, Stéphane. (2011). RNA interference in mammals: Behind the screen. *Briefings in functional genomics*. 10. 215-26. 10.1093/bfgp/elr018.

121. Mocellin, Simone & Provenzano, Maurizio. (2004). RNA interference: Learning gene knock-down from cell physiology. *Journal of translational medicine*. 2. 39. 10.1186/1479-5876-2-39.

122. Cebrailoğlu, Nicat & Yıldız, Ali & Akkaya, Ozlem & Ciftci, Yelda. (2019). CRISPR-Cas: Removing Boundaries of the Nature. *European Journal of Biology*. 10.26650/EurJBiol.2019.0024.

123. QUESTIONS AND ANSWERS ABOUT CRISPR., Broad Institute (https://www.broadinstitute.org/)https://www.broadinstitute.org/what-broad/areas-focus/project-spotlight/questions-and-answers-about-crispr Erişim Kasım 2022

124. CRISPR Cas9 An Introductory Guide for Gene Knockout. Applied Biological Materials Inc., (www.abmGood.com)(https://www.abmgood.com/pub/media/catalog/customservice/custom-multiplex-grna-vector/CRISPR-Quick-Guide-Protocol-V2.pdf) Erişim Kasım 2022

125. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*. 2015 Jan 29;517(7536):583-8. doi: 10.1038/nature14136. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25494202; PMCID: PMC4420636.

126. Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*. 2002 Mar;43(6):1565-75. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x. PMID: 11952905.

127. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 2014 Mar 6;507(7490):62-7. doi: 10.1038/nature13011. Epub 2014 Jan 29. PMID: 24476820; PMCID: PMC4106473.

128. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* (Reading). 2009 Mar;155(Pt 3):733-740. doi: 10.1099/mic.0.023960-0. PMID: 19246744.

129. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–67. https://doi.org/10.1038/nature13011

130. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. 2014 Sep 25;513(7519):569-73. doi: 10.1038/nature13579. Epub 2014 Jul 27. PMID: 25079318; PMCID: PMC4176945.

131. Cas9 Mechanism. CRISPR/Cas9: (https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-mechanism/) Erişim Kasım 2022

132. Control CRISPR/Cas9 Plasmid. Santa Cruz Biotech.,https://www.scbt.com/p/control-crispr-cas9-plasmid Erişim Kasım 2022

133. Vad-Nielsen J, Lin L, Bolund L, Nielsen AL, Luo Y. Golden Gate Assembly of CRISPR sgRNA expression array for simultaneously targeting multiple genes. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Nov;73(22):4315-4325. doi: 10.1007/s00018-016-2271-5. Epub 2016 May 13. PMID: 27178736.

134. How to Design gRNAs to Target Your Favorite Gene Author Name: Roger Pellegrini. Benchling, Date: January 31, 2016 (https://www.benchling.com/2016/02/01/how-to-design-grnas-to-target-your-favorite-gene/) Erişim Aralık 2022

135. Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci Rep*. 2014 Jun 23;4:5400. doi: 10.1038/srep05400. PMID: 24954249; PMCID: PMC4066266.

136. Macaraeg NF, Reilly DE, Wong AW. Use of an anti-apoptotic CHO cell line for transient gene expression. *Biotechnol Prog*. 2013 Jul-Aug;29(4):1050-8. doi: 10.1002/btpr.1763. Epub 2013 Jun 22. PMID: 23794499.

137. MacDonald MA, Barry C, Groves T, Martínez VS, Gray PP, Baker K, Shave E, Mahler S, Munro T, Marcellin E, Nielsen LK. Modeling apoptosis resistance in CHO cells with CRISPR-mediated knockouts of Bak1, Bax, and Bok. *Biotechnol Bioeng*. 2022 Jun;119(6):1380-1391. doi: 10.1002/bit.28062. Epub 2022 Mar 6. PMID: 35180317; PMCID: PMC9310834.

138. Xiong K, Marquart KF, la Cour Karottki KJ, Li S, Shamie I, Lee JS, Gerling S, Yeo NC, Chavez A, Lee GM, Lewis NE, Kildegaard HF. Reduced apoptosis in Chinese hamster ovary cells via optimized CRISPR interference. *Biotechnol Bioeng*. 2019

Jul;116(7):1813-1819. doi: 10.1002/bit.26969. Epub 2019 Apr 2. PMID: 30883679; PMCID: PMC6545153.

139. Rodrigues ME, Fernandes P, Costa AR, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Preliminary evaluation of microcarrier culture for growth and monoclonal antibody production of CHO-K1 cells. *BMC Proc*. 2011 Nov 22;5 Suppl 8(Suppl 8):P111. doi: 10.1186/1753-6561-5-S8-P111. PMID: 22373280; PMCID: PMC3285000.

140. Larry E. Erickson, Bioreactors, Editor(s): Thomas M. Schmidt, Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition), Academic Press, 2019, Pages 536-541, ISBN 9780128117378, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20813-3.

141. Bioprocessing Basics This custom ebook is sponsored by Eppendorf and presented in partnership with BioPharm International https://www.eppendorf.com/product-media/doc/en/897339/Fermentors-Bioreactors_Publication_Bioprocess_Bioprocessing-basics.pdfErişim Aralık 2022

142. A Brief Overview of Bioprocessing, LM: Big Picture (https://www.labmanager.com/big-picture/bioprocessing-overview-and-trends/a-brief-overview-of-bioprocessing-25962) Erişim Aralık 2022

143. L.E. Erickson, 3.55 - Bioreactors for Commodity Products, Editor(s): Murray Moo-Young, Comprehensive Biotechnology (Second Edition), Academic Press, 2011, Pages 653-658, ISBN 9780080885049, https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00236-1

144. What are the advantages of bioreactor which uses a continuous culture system rather than batch culture?, VEDANTU: Learn LIVE Online (https://www.vedantu.com/question-answer/are-the-advantages-of-bioreactor-which-uses-a-class-12-biology-cbse-5fc38db494cb6869e1603b12) Erişim 12 Kasım 2022

145. Ginai M, Elsby R, Hewitt CJ, Surry D, Fenner K, Coopman K. The use of bioreactors as *in vitro* models in pharmaceutical research. *Drug Discov Today*. 2013 Oct;18(19-20):922-35. doi: 10.1016/j.drudis.2013.05.016. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23748137.

146. Stanbury, Peter AU - Whitaker, A. AU - Hall, S.J. PY - 2016/09/15 SP - 1 EP - 803 T1 - Principles of Fermentation Technology (Third Edition), Butterworth-Heinemann, 2016,ISBN 9780444634085

147. Kontoravdi, Cleo & Samsatli, Nouri & Shah, Nilay. (2013). Development and design of bio-pharmaceutical processes. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 137. 10.1016/j.coche.2013.09.007.

148. Gronemeyer P, Ditz R, Strube J. Trends in Upstream and Downstream Process Development for Antibody Manufacturing. *Bioengineering* (Basel). 2014 Oct 1;1(4):188-212. doi: 10.3390/bioengineering1040188. PMID: 28955024.

149. Adriana G. Lopes, Single-use in the biopharmaceutical industry: A review of current technology impact, challenges and limitations, *Food and Bioproducts Processing*, Volume 93, 2015, Pages 98-114, ISSN 0960-3085, https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.12.002. (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308513001272)

150. Dr. Öğr. Üyesi Devrim Demir Dora: Biyoteknolojik İlaçların Üretimi, Biyoteknolojik İlaçlar (https://biyoteknolojikilaclar.net/biyoteknolojik-ilaclarin-uretimi.php) *Erişim 12 Kasım 2022*

151. Fischer S, Handrick R, Otte K. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol Adv*. 2015 Dec;33(8):1878-96. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.10.015. Epub 2015 Oct 31. PMID: 26523782.

152. LONZA. "Protocols for Converting Cells to Serum-Free Culture". https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/download/content/asset/29284Erişim Aralık 2022

153. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0011164_Pierce_Protein_A_Agarose_UG.pdf Erişim Aralık 2022

154. Jean-Paul Concordet, Maximilian Haeussler, CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue W1, 2 July 2018, Pages W242–W245, https://doi.org/10.1093/nar/gky354http://crispor.tefor.net/

155. Protein Data Bank (https://www.rcsb.org/docs/general-help/identifiers-in-pdb) Erişim Aralık 2022

156. http://11.https//www.benchling.com/2016/02/01/how-to-design-grnas-to-target-your-favorite-gene/Erişim Aralık 2022

157. InterPro: Classification of protein familieshttp://12.https//www.ebi.ac.uk/interpro/ Erişim Aralık 2022

158. Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci Rep* 7,

10480 (2017). https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8 (https://swissmodel.expasy.org/assess) Erişim Aralık 2022

159. Carlos HM Rodrigues, Douglas EV Pires, David B Ascher, DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue W1, 2 July 2018, Pages W350–W355, https://doi.org/10.1093/nar/gky300
160. Rodrigues CHM, Pires DEV, Ascher DB. DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations. *Protein Sci*. 2021 Jan;30(1):60-69. doi: 10.1002/pro.3942. Epub 2020 Sep 11. PMID: 32881105; PMCID: PMC7737773.
161. Benchling [Biyoloji Uygulaması]. (2022).https://benchling.com 'dan alıntılanmıştır. Erişim Kasım 2022
162. https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut/Erişim Nisan 2021
163. https://biosig.lab.uq.edu.au/dynamut2/Erişim Aralık 2022
164. Rodrigues CH, Pires DE, Ascher DB. DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1):W350-W355. doi: 10.1093/nar/gky300. PMID: 29718330; PMCID: PMC6031064.
165. https://swissmodel.expasy.org/assessErişim Aralık 2022
166. https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligationErişim Aralık 2022
167. Gupta, N., Susa, K., Yoda, Y., Bonventre, J. V., Valerius, M. T., & Morizane, R. (2018). CRISPR/Cas9-based targeted genome editing for the development of monogenic diseases models with human pluripotent stem cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 45, e50. doi: 10.1002/cpsc.50
168. Zhang, P. (2012). PCR-RFLP Genotyping of Point Mutations in Caenorhabditis elegans. *Bioprotocol* 2(6): e128. DOI: 10.21769/BioProtoc.128. / https://doi.org/10.21769/BioProtoc.128
169. https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/document/download/21690Erişim Aralık 2022
170. https://biorender.com/Erişim Aralık 2022
171. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005 Jan 28;120(2):237-48. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.046. PMID: 15680329.

172. https://www.atcc.org/products/crl-1581)(https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=08060101&collection=ecacc_gc Erişim Aralık 2022

173. Demirhan, D., Kumar, A., Zhu, J. et al. Comparative systeomics to elucidate physiological differences between CHO and SP2/0 cell lines. *Sci Rep* 12, 3280 (2022). https://doi.org/10.1038/s41598-022-06886-1

174. Wang Q, Gavin W, Masiello N, Tran KB, Laible G, Shepherd PR. Cetuximab produced from a goat mammary gland expression system is equally efficacious as innovator cetuximab in animal cancer models. *Biotechnol Rep* (Amst). 2020 Sep 22;28:e00533. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00533. PMID: 33024714; PMCID: PMC7528048.

175. https://www.proteogenix.science/monoclonal-antibody-production/stable-cell-line-generation/faqs-stable-cell-lines/main-cell-lines/Erişim Aralık 2022

176. SnapGene (https://www.snapgene.com/) Erişim Aralık 2022

177. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:367-401. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367. PMID: 11264462.

178. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*. 1997 Sep 25;15(13):1573-81. doi: 10.1038/sj.onc.1201324. PMID: 9380409.

179. Zeiss CJ. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol.* 2003 Sep;40(5):481-95. doi: 10.1354/vp.40-5-481. PMID: 12949404.

180. DMEM. Thermo Fischer (https://www.thermofisher.com/) (https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11965092) Erişim Kasım 2022

181. RPMI 1640. Thermo Fischer (https://www.thermofisher.com/) (https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/classical-media/rpmi.html?SID=fr-rpmi-main) Erişim Kasım 2022

182. EX-CELL CD Hybridoma. Sigma Aldrich (https://www.sigmaaldrich.com/TR/en) (https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/h4409) Erişim Kasım 2022

183. Plazmid Deposu Addgene (https://www.addgene.org/) Erişim Kasım 2022

184. Proteus Protein A Antibody Purification Handbook (https://www.mstechno.co.jp/html/protocolFile/ms575fa43f25829/ProteinA_Handbook.pdf) Erişim Kasım 2022

185. pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 62988 ; http://n2t.net/addgene:62988 ; RRID:Addgene_62988)

186. pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 48138 ; http://n2t.net/addgene:48138 ; RRID:Addgene_48138)

187. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Nat Protoc. 2013 Nov;8(11):2281-308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. Epub 2013 Oct 24. 10.1038/nprot.2013.143 PubMed 24157548

188. Proteogenics (https://www.proteogenix.science/) WHAT ARE THE MAIN CELL LINES USED FOR THE STABLE PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES?Erişim Kasım 2022 (https://www.proteogenix.science/monoclonal-antibody-production/stable-cell-line-generation/faqs-stable-cell-lines/main-cell-lines/)

189. Kimura, H., Sakai, K., Arao, T., Shimoyama, T., Tamura, T., & Nishio, K. (2007). Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer science*, 98(8), 1275–1280. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00510.x

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TERAPÖTİK MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU VE VERİMİNİN ARTTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%5	%2	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	bezmialem.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
5	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.hse.gov.uk İnternet Kaynağı	<%1
7	Xu Han, Zhifang Song, Wenwen Wang, Hui Tang. " Polymorphism in the 5□ regulatory region of gene and association with age at first lay and egg production ", British Poultry Science, 2022 Yayın	<%1

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☐**Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☒**Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Burcu Nur AYDIN
(İmza)

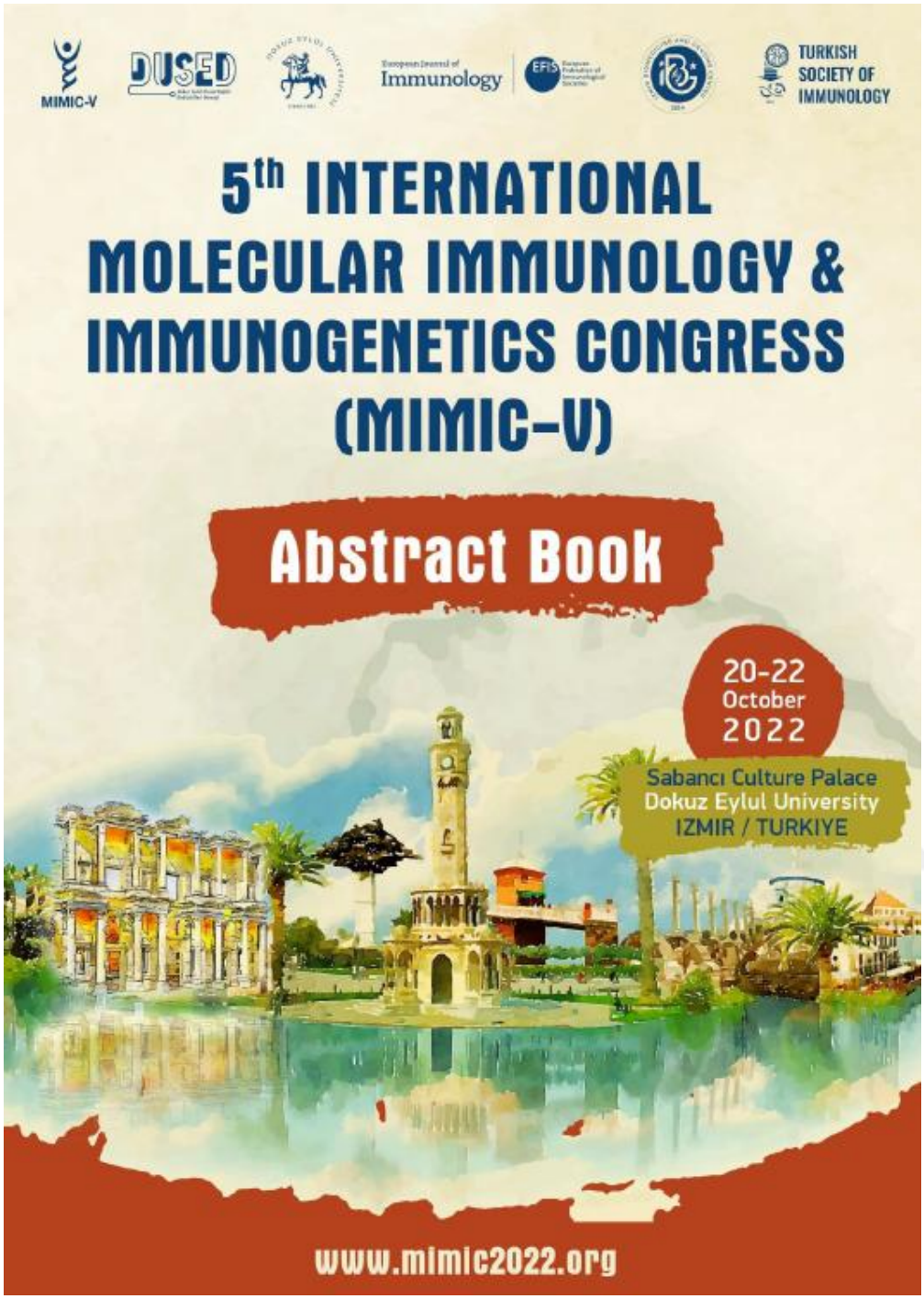
KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐**Kurum izni gerekmektedir.**

☒**Kurum izni gerekmemektedir.**

Burcu Nur AYDIN
(İmza)


MIMIC-V
DUSED
European Journal of Immunology
EFIS
TURKISH SOCIETY OF IMMUNOLOGY
5th INTERNATIONAL MOLECULAR IMMUNOLOGY & IMMUNOGENETICS CONGRESS (MIMIC-V)
Abstract Book
20-22 October 2022
Sabancı Culture Palace
Dokuz Eylul University
IZMIR / TURKIYE
www.mimic2022.org

[PP-04]

The Utility Of CRISPR/Cas9 Technology To Attenuate Apoptotic Pressure in Monoclonal Antibody (Mab) Producing Cells

Burcu Nur Aydin[1], Nesibe Selma Cetin[2], Esmahan Avci[3], Arif Kayguzuz[4], Mehmet Ziya Doymaz[5]
[1]Department of Medical Microbiology, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, Istanbul, Turkiye; Beykoz Institute of Life Sciences and Biotechnology at Bezmialem Vakıf University (BILSAB), Istanbul, Turkiye
[2]Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Bezmialem Vakıf University, Istanbul, Turkiye
[3]Beykoz Institute of Life Sciences and Biotechnology at Bezmialem Vakıf University (BILSAB), Istanbul, Turkiye
[4]Department of Medical Microbiology, Cerrahpaşa Faculty of Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, Istanbul, Turkiye
[5]Beykoz Institute of Life Sciences and Biotechnology at Bezmialem Vakıf University (BILSAB), Istanbul, Turkiye; Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Bezmialem Vakıf University, Istanbul, Turkiye

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are getting wider acceptance in many areas of medicine and biotechnology. The mAbs can be recovered from the medium in which the producer mammalian cells are grown. However, presence of serum in medium complicates purification and isolation of products. Removal of serum causes stress on cells and induces apoptosis. Previous studies have shown that cells lacking the *Bak1* and *Bax* genes (*Bak1*$^{-/-}$ - *Bax*$^{-/-}$), which initiate apoptosis by causing mitochondrial permeability in cells, do not respond to apoptotic stimuli and grow normally.
In this study, we aimed to permanently inhibit the pro-apoptotic *Bak1* and *Bax* genes of K1 strain of Chinese Hamster Ovary Cells (CHO-K1 cells) with clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR-associated protein 9 (Cas9) technology and to transfer CHO-K1 cells to serum-free suspension culture for supporting mAb (*Cenaximab_Erbinox®*) production.
The CRISPR/Cas9 system and multiplex single guide RNA (sgRNA) cassette design, which are among the methods were used during this study, was applied to CHO-K1 cells for the first time and the method was utilized for the purpose of knocking out pro-apoptotic genes. CHO-K1 *Bak1*$^{-/-}$ - *Bax*$^{-/-}$ cells were able to produce approximately 10 times more functional mAbs in suspension cultures compared to un-modified parents. These studies demonstrate that attenuation of apoptotic pressure on mAb producing cells contributes significantly to the production of mAbs and CRISPR-Cas9 technology could be a vessel to reach this goal.

Keywords: Monoclonal Antibody, CHO-K1 Cell Line, CRISPR/Cas9, Suspension Culture, Serum-Free Media Adaptation, *Cenaximab_Erbinox®*