

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**Over Kanserinde Üretilen Anti Mullerian Hormon Reseptör II (AMHR2)
Proteininin Sitoplazmik ve Ekstrasellüler Domainlerinin Kansere İmmün
Terapide Kullanılmak Amacıyla Rekombinant Olarak Elde Edilmesi**

Proje No: ÇAP-12-4044

Proje Türü: Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yard. Doç. Dr. Çağrı ŞAKALAR
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji A.D.

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Halit Canatan
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji A.D.

Doç. Dr. Metin Aytekin
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji A.D.

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından ÇAP-12-4044 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
4. BULGULAR	15
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	23
6. KAYNAKLAR	25

ÖZET

Kanser immunterapi günümüzde geleneksel kanser tedavilerine takviye hatta alternatif olabilmesi amacıyla yoğun olarak çalışılan bir alandır. Kanserde üretilen proteinlere karşı antikorlar üretilerek ya da aşılama yoluyla immün terapi çalışmaları yapılmaktadır. Bizim önerdiğimiz çalışmada over kanserinde dokuya spesifik olarak üretilen bir antijen olan AMHR2 (Anti Müllerian Hormon Reseptör 2)'nin rekombinant olarak elde edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında, Anti Mullerian Hormon Reseptör 2 proteinin sitoplazmik domainini kodlayan komplement DNA fragmenti PQE80.L ekspresyon plazmitinin içine klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant vektör BL21star hücrelerine transforme edilmiştir. Bu bakterilerde rekombinant protein ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Kontrol ve değişen IPTG konsantrasyonlarında indüklenen bakterilerdeki rekombinant protein ekspresyonu, SDS-PAGE yöntemiyle protein bantları gözlemlenerek incelenmiş, ayrıca SDS-PAGE ve western-blot metoduyla proteinin ekspresyonu anti-His antikorlarıyla konfirme edilmiştir. Bu incelemeler sonucunda ekspresyon vektörüne klonlanan proteinin başarılı bir şekilde ekspres edildiği gözlemlenmiştir. Bir yandan anlamlı miktarda protein ekspresyonu tespit edilmesine rağmen, artan IPTG konsantrasyonu ile BL21Star hücrelerinde ekspresyon azalmış, bu durum da proteinin toksik olması ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Elde edilen vektör PQE80.L, AMHR2 proteininin sitoplazmik domainini kapsamaktadır. Toksik proteinler için uygun olan bakteri suşlarından birisi C43 (Overexpress) olarak bilinen bakteri suşudur. AMHR2 proteininin sitoplazmik domainini kapsayan PQE80.L vektörü C43 (Overexpress) bakterilerine kimyasal metodla transforme edilmiştir. Rekombinant protein ekspresyonu SDS-PAGE ve western blot yöntemleriyle incelenmiş ve bu bakteri suşunda rekombinant AMHR2'nin ekspresyonu daha yüksek elde edilmiştir.

Sonuç olarak, bu proje kapsamında, rekombinant protein ekspresyonu için iki farklı bakteri suşu kullanılmış ve rekombinant protein ekspresyonunun C43 (OverExpress) bakteri suşunda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen rekombinat protein kanser immünterapi çalışmalarında (özellikle fare kanser modellerinde) ve antikor üretim amaçlı kullanılabilecektir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, daha sonraki proje başvurularında

önemli bir önveri olarak kullanılacaktır. Ayrıca, bu proje ile rekombinant DNA teknolojisi ile klonlama yapma ve protein ekspresyonunu gerçekleştirme altyapısı oluşturulmuştur.

ABSTRACT

Cancer immunotherapy is an area which is intensively studied as a supportive or alternative therapy to traditional cancer therapies. Cancer immunotherapy involves production of monoclonal antibodies or vaccination against proteins produced in cancer cells. In this project, it was aimed to recombinantly produce Anti Mullerian Hormone Receptor Type 2 (AMHR2) which is an ovarian cancer tissue specific antigen.

In this study, the DNA fragment encoding cytoplasmic domain of AMHR2 was cloned into PQE80.L expression plasmid. Obtained rekombinant vector was transformed into BL21Star competent bacterial cells. Recombinant protein expression levels were investigated in BL21Star cells. Expression of recombinant protein was visualized as protein band using SDS-PAGE method in control and IPTG induced bacterial cells. Additionally, recombinant protein expression was confirmed by SDS-PAGE and western blot using anti-His antibody. This experiments indicated succesfull recombinant expression of cytoplasmic domain of AMHR2. On the other hand, recombinant protein expression was observed to decrease gradually when IPTG concentrations were increased in BL21Star cells. This observation suggested that the recombinant protein is toxic to BL21Star bacterial cells. Therefore, C43 (Overexpress), another bacterial strain that is designed for the expression of toxic proteins was utilized. Recombinant PQE80.L expression vector that expresses the cytoplasmic domain of AMHR2, was transformed in to C43 (Overexpress) cells. Expression of the recombinant protein was checked by SDS-PAGE and western blot methods and importantly, higher levels of expression was observed in C43 (Overexpress) cells.

In conclusion, two different bacterial strains were utilized for recombinant protein expression and it was shown that the expression of recombinant protein was higher in C43 (Overexpress) bacterial strain. The recombinant AMHR2 protein that was produced in this Project, is going to be used in cnacer immunotherapy studies (especially in mouse models) and for the production of monoclonal antibodies. The findings of this study can be used as preliminary data for further project applications. Additionally, the infrastructure and know-how for cloning, recombinant DNA technology and recmbinant protein expression was established throughout the project.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM:

Kanser immunterapi günümüzde geleneksel kanser tedavilerine takviye hatta alternatif olabilmesi amacıyla yoğun olarak çalışılan bir alandır. Kanserde üretilen proteinlere karşı antikorlar üretilerek ya da aşılama yoluyla immün terapi çalışmaları yapılmaktadır. Bizim önerdiğimiz çalışma over kanserinde dokuya spesifik olarak üretilen bir antijen olan AMHR2'nin sitoplazmik ve ekstrasellüler kısımlarının rekombinant olarak elde edilmesidir. BAP projesiyle elde edilecek rekombinant protein kanser immunterapiye yönelik aşı çalışmalarında daha önce çalışılmamıştır. Ayrıca AMHR2'nin rekombinant olarak ekspresyonu da yapılmamıştır.

Proteinin rekombinant olarak üretilmesi literatüre kendi başına bir katkı olacaktır. Daha da önemlisi AMHR2 over'e has bir protein olması ve over kanserlerinde üretilmesi nedeniyle kanser immunterapi için uygunluğu yüksek bir antijendir. Rekombinant olarak üretilen protein bir sonraki aşamada fare aşılama ve antikor üretiminde kullanılacak, aşı ve antikorların farede yumurtalık ve göğüs kanseri modellerinde tedavi edici etkisi araştırılacaktır. Böylece bu çalışma yumurtalık kanseri immunterapi alanında yeni bir hedef antijenin literatüre girmesini sağlayacaktır. Kanser immunterapide günümüzde önemli bir ihtiyaç da yeni antijenlerin keşfedilmesidir. Çünkü eldeki hedef antijenlerin bir çoğu kanserlerde üretimi artmış olan fakat diğer organlarda da üretilen antijenlerdir. Oysa ki bizim sunduğumuz şekilde dokulara spesifik olan antijenlerin hedef alınması kanser immunterapide daha fazla sayıda antijenin güvenli bir şekilde hedef alınmasını sağlayabilecektir ve AMHR2 ile olan çalışmamız yumurtalık kanseri immün terapisi için yeni bir hedef alanı açmayı olanaklı kılacaktır.

Amaçlar:

- a) İnsan ve farede over ve over kanserlerinde üretilen bir protein olan anti mullerian hormon reseptör II (AMHR2)'yi moleküler biyoloji ve genetik metodları kullanılarak bir vektöre klonlamak
- b) AMHR2'yi taşıyan vektörü bakterilere aktararak, bakteriler tarafından kültür ortamında AMHR2 proteininin rekombinant olarak ekspresyonunu sağlamak

c) Bakteriler tarafından üretilen rekombinant AMHR2'yi kanser immun terapide kullanılmaya yetecek miktarda izole ederek, saflaştırmak

AMHR2'nin yumurtalık kanserlerinde üretilen bir protein olması sebebiyle, rekombinant olarak üretilen proteini ileride yumurtalık kanserini hedef alan kanser immunterapi çalışmalarında kullanmak. Bu amaçla, BAP projesinden elde edilecek sonuçlar ve üretilen rekombinant proteini kullanarak daha kapsamlı ulusal (TUBİTAK, DPT) ve uluslararası (AB 7. Çerçeve) projeler yazmak

GENEL BİLGİLER

Anti Mullerian Hormon Reseptör II (AMHR2):

AMHR2 ağırlıklı olarak over ve testislerde üretilen organ spesifik bir antijendir (1, 2). AMHR2, anti mullerian hormonun (AMH) bağlandığı transmembran bir reseptördür. Farede AMHR2 568 aminoasit büyüklüğündedir. N terminalden yaklaşık 140 aminoasit AMHR2'nin ekstrasellüler kısmını oluşturur. Devam eden yaklaşık 30 aminoasit hidrofobik transmembran domainidir. C terminale doğru yaklaşık 400 aminoasit ise sitoplazmik domaini oluşturur. AMHR2, AMH'nin bağlanmasıyla, AMH'nin tetiklediği sinyal yollarının çalışmasını sağlar. AMHR2'ye bağlanan AMH, erkeklerde fetüs evresinde gelişim sırasında müllerian kanalların gerilemesini sağlayarak fallop tüpleri, uterus ve vajinanın oluşmasını engeller ve normal erkek üreme sisteminin gelişmesini sağlar (3, 4).

AMHR2 geni farelerde 15. Kromozomda bulunmaktadır. Genin büyüklüğü yaklaşık 9000 baz çiftidir ve AMHR2 geni, toplam büyüklüğü 1885 baz çifti olan 11 tane ekzondan oluşmaktadır. Toplam büyüklüğü 1885 olan AMHR2 mRNA'sının protein kodlayan kısmı 1707 baz çifti büyüklüğündedir. Aşağıda AMHR2 geninin ekzon-intron haritası eklenmiştir (Koyu yeşil kutucuklar ekzonlardır).



Şekil 1: AMHR2 geni ekzon-intron haritası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/110542>)

AMHR2, fare over kanser modellerinde ve insan over kanserlerinde üretilen bir protein olup, transgenik bir over kanseri modeli olan TgMISIIR-Tag fareleri spontane olarak over kanseri olurlar ve tümörlerinde AMHR2 ekspresyonu olmaktadır. Üstelik bu farelerin genetik dizaynında sadece over kanseri olmaları için AMHR2 geninin promotörü kullanılmıştır.

Ayrıca fare over kanseri hücre hatları olan MOVCAR ve ID8 hatlarında da AMHR2 ekspresyonu görülmektedir (5).

AMHR2 insanlarda over kanserlerinin çoğunluğunda üretilen bir antijendir. Over kanserlerinin değişik tür ve aşamalarında AMHR2'nin üretilme durumu aşağıda belirtildiği gibidir. Primer epitel kökenli over kanserlerinin 90%'ında, sınırda (borderline) over kanserlerin 78%'inde, genel epitel kökenli kanserlerin 50% ile 69%'unda, epitel kökenli olmayan over kanserlerinin 86%'sında ve 3 ve 4. derece metastaz yumurtalık kanserlerinin 56%'sında AMHR2 ekspresyonu tespit edilmiştir (6-8).

AMHR2 sadece over kanserlerinde üretilmemektedir, göğüs kanseri hücrelerinde de ekspresyonu rapor edilmiştir. C3(1) T antijen transgenik göğüs kanseri modelindeki tümörlerin ve insan göğüs kanseri hücre hattı MDA-MB-468'in AMHR2 ekspresyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir (9).

Over Kanseri:

Over kanseri kadınlarda ölüme sebebiyet veren önemli faktörlerden biri ve en yaygın jinekolojik kanserlerdendir. Over kanserlerinin 90%'dan fazlası epitel kökenlidir (10, 11). Over kanseri tedavisinde carboplatin ve paclitaxel'e dayalı kemoterapi kullanılmaktadır. Tedavide ilk cevap genelde olumlu olmasına rağmen, hastalık büyük oranda kendini tekrar etmektedir (12). Dünyada yılda 200,000'den fazla insana over kanseri teşhisi konmakta ve her yıl yaklaşık 125,000 kişi over kanseri nedeniyle hayatını yitirmektedir. Over kanserine en fazla A.B.D. ve Kuzey Avrupa'da ve en az Afrika ve Asya'da rastlanmaktadır. Daha detaylı bir istatistik veri sunacak olursak, Amerikan kanser enstitüsünün tahminlerine göre Amerika'da 2011 yılında yaklaşık 16000 kadın over kanserinden hayatını kaybedecek ve 22000 kadına da over kanseri tanısı konacaktır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye'de over kanseri insidansı yaklaşık 100000'de 6'dır. Bu oran göğüs kanseri için 100000'de 18'dir. Over kanseri vakalarında hastalık teşhisinden sonraki 5 yılda hayatta kalma oranı düşüktür ve sadece 43.8%'dir. Karşılaştırmak gerekirse bu oran göğüs kanseri için 80%'den yüksektir. Over kanserinin kendini tekrar etmesinin yanısıra bir diğer dezavantajı hastalığın ancak ileri safhalarında teşhis edilebilmesidir. Over kanserlerinin 60%'ı hastalık metastaz olduktan sonra teşhis edilebilmektedir. İleri safhalarda teşhis edilen hastalarda 5 yıllık hayatta kalma oranı ise

sadece 27% civarındadır.(13). Bu istatistikler yumurtalık kanserinde yeni tedavi modalitelerine olan ihtiyacın aciliyetini göstermektedir.

Kanser İmmun Terapi:

Kanser immün terapi kanser tedavisinde immün sistemin uygun metodlarla aktive edilip kullanılmasıdır. Amaç immün sisteme ait hücrelerin kanser hücrelerini hedef alarak yok etmesini sağlamaktır. Bu temel olarak üç yöntemle sağlanabilir.

- a) Birinci metod kanserde üretilen proteinler kullanılarak hastaların aşılmasındır.
- b) İkinci metod terapi amaçlı spesifik antikörlerin hastaya verilmesidir.
- c) Üçüncü metod ise hastaya sitotoksik T lenfosit ya da dendritik hücreler gibi hücrelerin transfer edilmesidir.

Bu yöntemlerden klinik uygulamalara en fazla aktarılan ve onaylananı terapiye yönelik antikörlerdir (14). Günümüzde ilaç olarak üretilen başlıca antikörler Trastuzumab, Cetuximab, Bevacizumab, Alemtuzumab, Rituximab gibi monoklonal antikörlerdir. Hedef aldıkları başlıca kanserler göğüs kanseri, kolon kanseri ve çeşitli kan kanserleridir. Bunlar vasküler endotelial büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü 2 gibi kanseri destekleyen büyüme faktörlerini veya CD52 ve CD20 gibi kanser hücrelerinde spesifik olarak üretilen antijenleri hedef alır. Kullanımı çok yeni olan ve CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) adlı antijeni bloke ederek kanserin immün sistemi inhibe etmesini engelleyen Ipilimumab monoklonal antikoru kullanılarak ileri safha melanom hastalarında başarı elde edilmiştir. (14-18).

Over kanserinde immünterapi amacıyla Her-2, CA-125, ve NY-ESO-1 gibi bu kanserde ekspresyonu artmış antijenler hedef alınmıştır. Fakat şimdiye kadar doku spesifik antijenler over kanserinde henüz klinik aşı çalışmalarında kullanılmamıştır. Buna karşılık prostat kanserinde doku spesifik antijenlerin hedef alınması ümit verici sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmayla yumurtalık kanserinde üretilen doku spesifik bir antijen olan AMHR2'yi rekombinant olarak üreterek kanser immünterapide kullanmak ve over kanseri immünterapi alanına klinik kullanıma aday yeni bir antijen kazandırmak istenmiştir (19-22). **Bu proje ile amacı kanserde üretilen AMHR2'ye karşı monoklonal antikör üretmenin ve kanser**

modellerinde aşı denemeleri yapmanın ilk aşaması olan rekombinant AMHR2 üretimini sağlayarak ulusal ve uluslararası projelere başvuru temellerini oluşturmak amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM:

1. PCR yöntemiyle çoğaltılan fragmentlerin ekspresyon vektörüne klonlanması:

a) Fragmentlerin agaroz jel elektroforezde koşturularak jelden izolasyonu ve TOPO vektörüne sekans analizi için aktarılması:

PCR ile çoğaltılan fragmentler, agaroz jelde koşturulacak ve uygun büyüklükteki fragmentler UV yardımıyla jelden kesilip alınarak jelden DNA izole edilmiştir. İzole edilen fragmentler TOPO plazmitine aktarılmıştır.

b) Fragmentlerin ekspresyon vektörüne klonlanması:

TOPO vektöründe doğruluğu teyit edilmiş fragmentler ve ekspresyon vektörü, BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleriyle kesilerek, Qiagen'den PQE80 ekspresyon vektörüne aktarılmıştır. Bu aktarım için Ligation Kit kullanılmıştır. Daha sonra ligasyon miksi kompetent bakterilere aktararak amfisilin adlı antibiyotik içeren LB-agar medyumunda aktarım gerçekleşmiş vektörü içeren bakteriler seçilmiştir.

2. Ekspresyon vektöre klonlanan AMHR2 fragmentlerinin *E. Coli*'de üretimi ve fragmentlerin toksik olması durumunda toksik proteinlere özel bir *E. Coli* straini kullanımı:

Seçilen pozitif bakterilerden miniprep yöntemiyle plazmit izolasyonu yapılmıştır ve restriksiyon enzimleriyle kesilen plazmit ve açığa çıkan insert DNA agaroz jel elektroforez yöntemiyle analiz edilerek klonlama teyit edilmiştir. Doğruluğu teyit edilen plazmitler ekspresyon için uygun bakteri strainlerine aktarılmıştır.

İki farklı bakteri straini kullanılmıştır. Bu iki bakteri straini Invitrogen'den BL21(DE3)Star ve Lucigen'den C43(OverExpress)'tir. BL21(DE3)Star protein ekspresyonu için yaygın olarak kullanılan bir bakteri strainidir. Proteinin toksik olması durumunda ya transformasyon sonucunda koloni elde edilemeyecek ya da ekspresyon indüklendiğinde bakteriler kültürde

çoğalamayacaktır. Bu durumda toksik proteinlerin üretimi için tasarlanmış C43(OverExpress) strainleri kullanılmıştır. C43(OverExpress) straini ise toksik proteinlere dirençli olmasını sağlayan mutasyonlara sahiptir.

3. Bakteride Rekombinant Protein Ekspresyonunun Uyarılması:

Ekspresyon plazmiti *lac* operatör sekansını içermektedir ve bu normal koşullarda ekspresyonu inhibe eder. Ekspresyonun aktivasyonu için operatör bölgeye repressör proteinlerin bağlanmasını engelleyen IPTG denilen bir kimyasal kullanılmaktadır. Öncelikle ekspresyon plazmitini içeren bakterilerde LB medyumuna IPTG (Isopropyl β -D -1-thiogalactopyranoside) eklenerek protein ekspresyonu başlatılır. Değişen IPTG konsantrasyonları (0.01, 0.1, 0.5 ve 1 mM) ve 4 saat zaman aralıklarında bakteri numuneleri alınmıştır. Protein ekspresyonu iki metodla analiz edilmiştir.

4. SDS-PAGE (SDS-Poliakrilamit Jel Elektroforezi):

1. Metotta İndüklenmiş numuneler ve kontrol olarak indüklenmemiş olan numune SDS-PAGE (polyakrilamide jel elektroforez) yoluyla analiz edilmek üzere SDS-PAGE sample buffer'da SDS-PAGE jele yüklenmeye hazır olacak şekilde 5 dakika 95 santigrat derecede inkübe edilir. SDS-PAGE jele yüklenen örnekler 100-200 volt ile koşturulur ve jel proteinleri boyayan coomassie blue boyasıyla boyanır. Boya yıkanır (destain edilir) ve elde edilen protein bantları incelenir. Umulan sonuç indüklenen bakteri örneklerinde ekspres edilen proteinin kilodalton ağırlığına uygun pozisyonda protein ekspresyonunu gösteren bir protein bandı edilmesidir. Bu bandı sağlayan bakteri klonu ve koşullar kullanılarak protein izolasyonu safhasına geçilir.

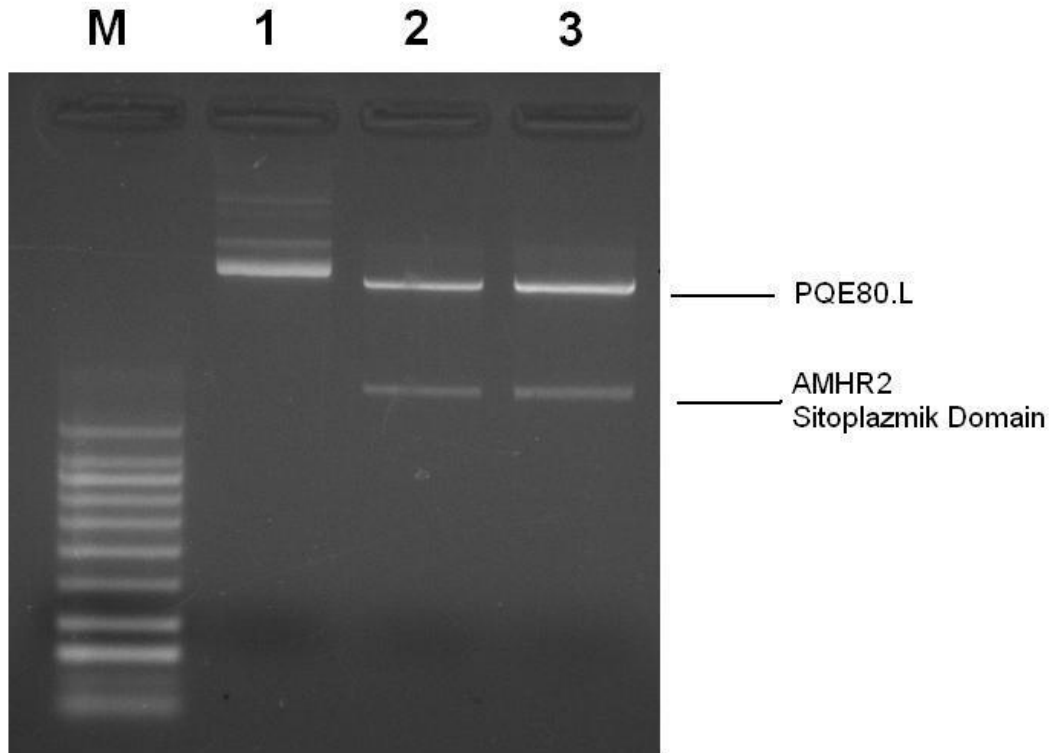
5. Western Blot:

2. Metod Western Blottur. Örneklerin koşturulduğu SDS-PAGE jeli western blot yöntemiyle PVDF membrana transfer edilmiştir.. Daha sonra protein ekspresyonu ekspres edilen proteindeki 6xHis tagı tanıyan anti Penta-His HRP antikoru kullanılarak DAB tabletler kullanılarak görüntülenmiştir.

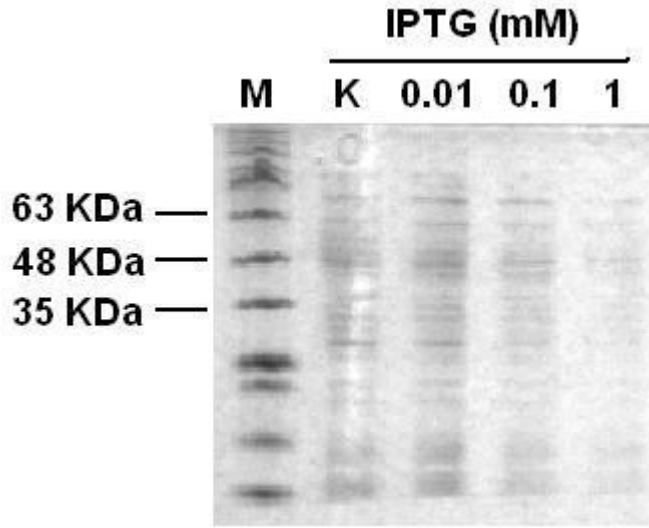
BULGULAR:

Anti Mullerian Hormon Reseptör 2 proteinin sitoplazmik domainini kodlayan komplement DNA fragmenti PQE80.L plazmitinin içine klonlanmıştır. Daha sonra hedef DNA parçasını içeren vektör, klonlamada kullanılan iki enzim olan BamHI ve HindIII ile kesilerek, PQE80.L plazmiti ve yaklaşık 1200 bp'lik AMHR2 sitoplazmik domainine karşılık gelen DNA fragmenti agaroz jelde gözlemlenmiştir (Figür 1). Ayrıca elde edilen vektör BL21star hücrelerine transforme edilmiştir. Bu bakterilerde rekombinant protein ekspresyonu incelenmiştir. Değişik indükleme koşullarında protein ekspresyonuna bakılmıştır. SDS-PAGE yöntemiyle kontrol ve değişen IPTG konsantrasyonlarında indüklenerek bakterilerdeki protein bantları incelenmiş, ayrıca SDS-PAGE ve western-blot metoduyla proteinin ekspresyonu anti-His antikorlarıyla incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda ekspresyon vektörüne klonlanan proteinin başarılı bir şekilde ekspres edildiği gözlemlenmiştir (Figür 2 ve 3). Anlamli miktarda protein ekspresyonu tespit edilmesine rağmen, artan IPTG konsantrasyonu ile ekspresyon azalmış, bu durum da proteinin toksik olması ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle toksik proteinlerin ekspresyonu için uygun diğer bakteri suşları (C43 overexpress, BL21(DE3) PlysS gibi) denenerek maximum ekspresyon miktarına ulaşmaya çalışılması mantıklıdır.

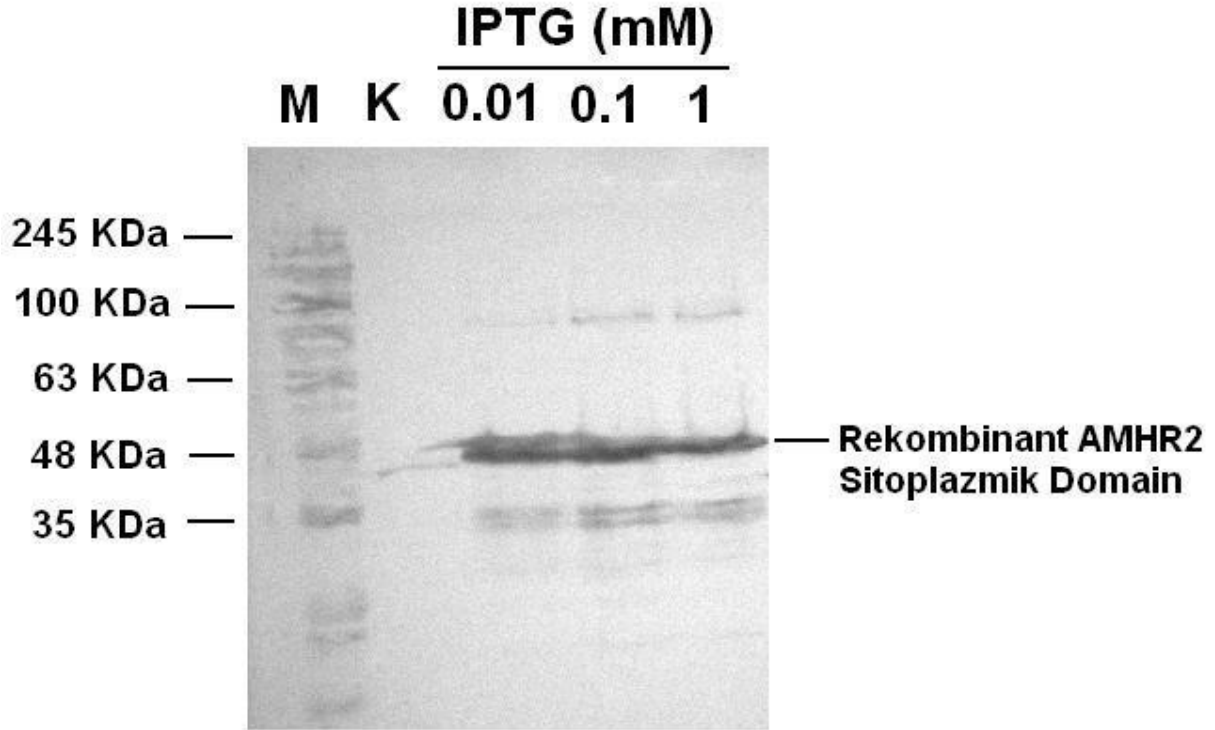
Figür 1: AMHR2 cDNAsından elde edilen sitoplazmik domaine ait fragmentin PQE80.L vektörüne klonlanması ve BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ile klonlanan fragmentin ve plazmitin iki ayrı bant olarak gözlemlenmesi. M=Marker, 1= kesilmemiş inserti içeren vektör, 2, 3= restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu açığa çıkan insert DNAsı ve PQE80.L plazmiti.



Figür 2: Transforme edilen BL21-Star bakteri hücrelerinin artan miktarlarda IPTG ile indüklenmesi sonrası, total lisatın SDS-PAGE elektroforezde yürütülerek protein bantlarının Coomasie ile görüntülenmesi. M= Protein Marker K= indüklenmemiş kontrol , 0.01, 0.1, 1= IPTG konsantrasyonları (mM). KDa = KiloDalton.



Figür 3: Transforme edilen BL21-Star bakteri hücrelerinin artan miktarlarda IPTG ile indüklenmesi sonrası, total lisatın SDS-PAGE elektroforezde yürütüldükten sonra, PVDF membrana aktarılması ve anti-His antikorlarıyla rekombinant proteinin spesifik olarak görüntülenmesi. protein M= Protein Marker K= indüklenmemiş kontrol , 0.01, 0.1, 1= IPTG konsantrasyonları.

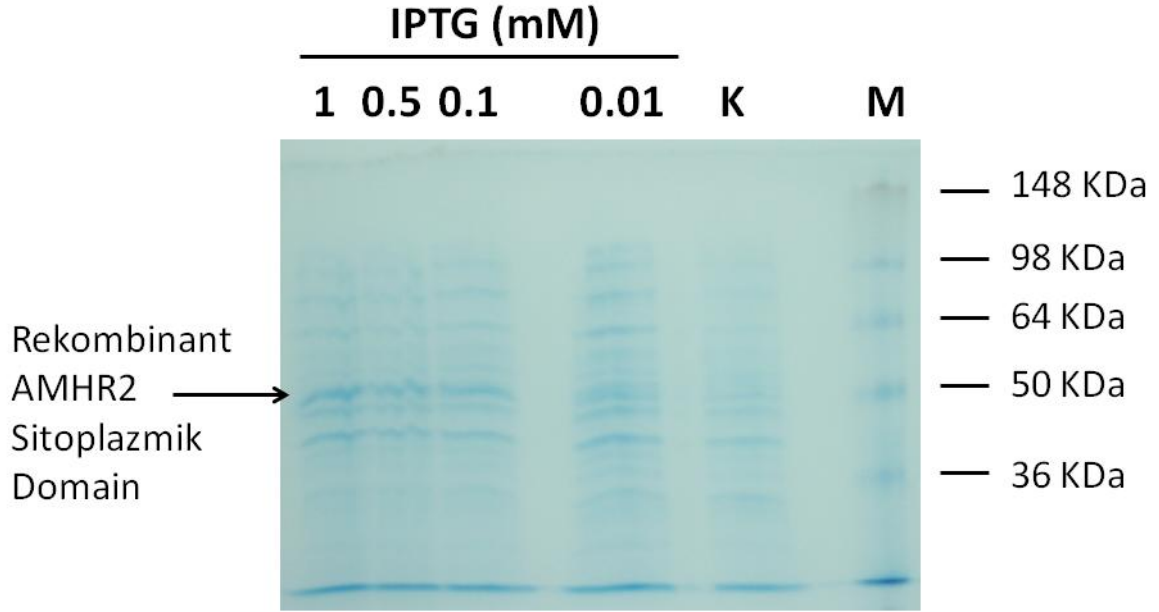


Elde edilen vektör PQE80.L, AMHR2 proteininin sitoplazmik domainini kapsamaktadır. Bu vektör yukarıda bahsedildiği gibi BL21Star hücrelerine transformasyon ile aktarıldığında, rekombinant protein ekspresyonu elde edilmiştir. Bu ekspresyon SDS-PAGE ve western blot yöntemleriyle izlenmiştir. İlginç olarak ekspresyonun artan IPTG konsantrasyonlarında giderek azaldığı tespit edilmiştir (Figür 3). IPTG rekombinant protein ekspresyonunu normal şartlarda indüklemektedir, ekspresyonun artan IPTG konsantrasyonlarında azalması bu rekombinant proteinin BL21Star hücrelerinde toksik olduğunu göstermektedir. Bu durumda yeni bir bakteri suşu kullanılması kararlaştırılmıştır. Toksik proteinler için uygun olan bakteri suşlarından birisi C43 (Overexpress) olarak bilinen bakteri suşudur. Bu bakteri suşu Lucigen firmasından temin edilerek, -80 derecede muhafaza edilmiştir. AMHR2 proteininin sitoplazmik domainini kapsayan PQE80.L vektörü C43 (Overexpress) bakterilerine kimyasal metotla transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu pozitif olan bakteriler amfisilin içeren katı agar besiyerlerinde 37 derecede inkübasyon sonucunda koloniler oluşturmuşlardır. Elde edilen koloniler, amfisilin antibiyotiği içeren sıvı LB (Lucia Broth) besiyerlerinde shaker inkübatörlerde 37 derecede 200 rpm hızla çalkalanarak büyütülmüştür. Sonrasında büyüyen bakteriler, yeni LB (Lucia Broth) besiyerlerine alınarak, optik dansitesi (OD600) 0.5 olana kadar çalkalanmıştır. Bu aşamada, IPTG ile rekombinant protein ekspresyonunu indüklemeye başlamıştır. Farklı konsantrasyonlarda IPTG bakterilerin büyüdüğü LB besiyerlerine eklenerek 4 saat boyunca inkübasyon yapılmıştır. Kullanılan IPTG konsantrasyonları 0.01, 0.1, 0.5 ve 1 milimolardır. 4 saat inkübasyon sonrasında bakteri kültürleri son hızda santrifüj edilerek bakteri pelletleri kullanılabilecek kadar -80 derecede muhafaza edilmiştir.

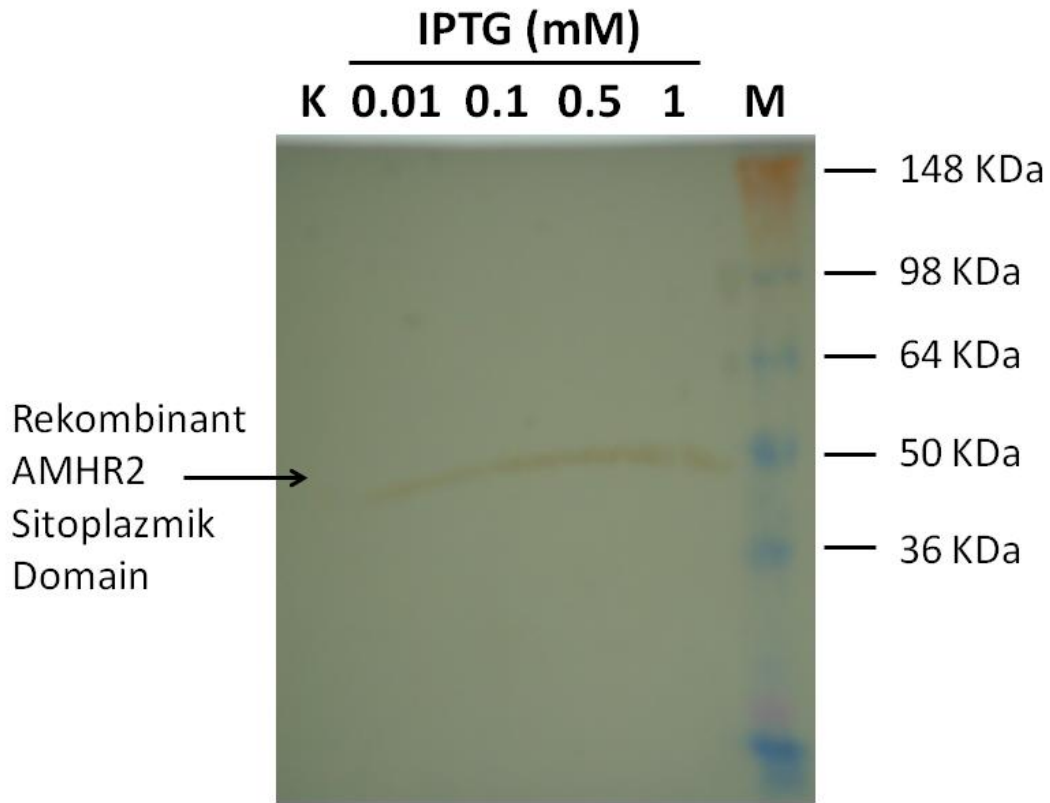
Elde edilen bakteri pelletlerindeki protein ekspresyonu iki metod kullanılarak incelenmiştir. Birinci metodta bakteri pelletleri SDS deterjanı ve beta-merkaptoetanol içeren protein yükleme tamponunda 95 derecede parçalanmış ve %12.5 poliakrilamid jelde koşturulmuştur. Boyutuna göre ayrıştırılan proteinler coomassie blue ile boyanarak protein bantları gözlemlenmiştir (Figür 4). Ayrıştırılan protein bantlarında, artan IPTG konsantrasyonu ile 50 KDa büyüklüğünün hemen altında ekstra bir bant gözlemlenmiştir. Bu bantın miktarı artan IPTG ile artmaktadır (Figür 4). Bu bant rekombinant olarak ekspres edilen AMHR' sitoplazmik domainidir. Bu bantın konfirmasyonu western blot yöntemiyle yapılmıştır. Aynı ayrı IPTG konsantrasyonlarıyla indüklenmiş bakteri pelletlerinden elde edilen proteinler, SDS-PAGE ile koşturulmuş, sonrasında PVDF membrana transfer edilmiştir. Bloklanmış membran rekombinant proteinde bulunan 6 tane Histidin aminoasitine spesifik bir antikorla inkübe edilmiştir. Bu

antikor HRP ile konjuge olup, DAB ve H₂O₂ ile muamele edildiğinde antikorun bağlandığı bölgelerde kahverengi bir bant oluşmuştur (Figür 5). Aynı şekilde rekombinant AMHR2 sitoplazmik domain ekspresyonu western blot ile böylece gösterilmiştir.

Figür 4: Transforme edilen C43 (OverExpress) bakteri hücrelerinin artan miktarlarda IPTG ile indüklenmesi sonrası, total lisatın SDS-PAGE elektroforezde yürütülerek protein bantlarının Coomasie ile görüntülenmesi. M= Protein Marker K= indüklenmemiş kontrol, 0.01, 0.1, 0.5, 1= IPTG konsantrasyonları (mM). KDa = KiloDalton.



Figür 5: Transforme edilen C43 (OverExpress) bakteri hücrelerinin artan miktarlarda IPTG ile indüklenmesi sonrası, total lisatın SDS-PAGE elektroforezde yürütüldükten sonra, PVDF membrana aktarılması ve anti-His antikorlarıyla rekombinant proteinin spesifik olarak görüntülenmesi. protein M= Protein Marker K= indüklenmemiş kontrol, 0.01, 0.1, 0.5, 1= IPTG konsantrasyonları (mM). KDa = KiloDalton.



TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma ile Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında ve Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Araştırma Merkezinde Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak klonlama yapma ve aynı zamanda Rekombinant protein ekspresyonunu gerçekleştirme amaçlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak klonlama yapma ve Rekombinant protein ekspresyonu için gerekli cihaz altyapısının oluşturulması ve gerekli teknik becerinin bölümde ve araştırma merkezinde uygulamaya geçirilmesi projenin öncelikli amaçlarındandır.

Yapılan proje ile Rekombinant DNA teknolojisi kullanılmış, AMHR2 reseptör proteininin sitoplazmik domainine karşılık gelen DNA dizisi PQE80.L plazmitine klonlanmıştır (Figür 1). İkinci aşamada klonlanan rekombinant bölgenin bakterilerde rekombinant protein olarak ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Hem SDS-PAGE, hem de western blot teknikleri kullanılarak rekombinant protein ekspresyonunun başarıyla gerçekleştirildiği konfirme edilmiştir (Figürler 2-5). Rekombinant protein ekspresyonu için iki farklı bakteri suşu kullanılmış ve rekombinant protein ekspresyonunun C43 (OverExpress) bakteri suşunda daha yüksek miktarlarda olduğu tespit edilmiştir (Figüre 2-3 vs. Figür 4-5). Bunun temel olarak proteinin toksik olmasından kaynaklandığı değerlendirilmektedir. Ayrıca proteinin bir diğer kısmı olan, ekstrasellüler kısmının çok toksik olduğu ve elimizdeki iki bakteri suşunda da üretilemediği gözlemlenmiştir. C43 (OverExpress) bakteri suşu, BL21Star bakteri suşuna göre toksik proteinlerin ekspresyonuna daha dirençli bir suş olup, temel olarak bu amaçla kullanılmaktadır. Böylece C43 (OverExpress) bakteri suşunun AMHR2'nin sitoplazmik domaininin için yüksek ekspresyon sağlaması nedeniyle, bundan sonraki çalışmalarda rekombinant proteinin ekspresyonunda kullanılması planlanmaktadır.

Elde edilen rekombinant protein kanser immünterapi çalışmalarında (özellikle fare kanser modellerinde) ve antikor üretim amaçlı kullanılabilir. Rekombinant proteinle aşılamanın farelere sonrasında kanser hücreleri enjekte edilecek ve aşılamanın farede tümör büyümesi üzerine etkisi incelenecektir. Ayrıca rekombinant proteinle tekrarlı olarak aşılamanın farelerin B lenfositleri monoklonal antikor üretimi için kullanılacaktır. Elde edilen monoklonal antikor western blot yönteminde proteinin tanısı için kullanılabilir. Monoklonal antikorun bir diğer kullanım alanı biomarker tespiti olması planlanmaktadır. Over kanserli hastaların serumunda AMHR2 miktarı ölçülerek, bu hastaların serumunda bu antijen miktarının

biomarker olarak kullanılmasının uygun olup olmadığı test edilecektir. Daha ileri proje başvurularında elimizde üretime ve kullanıma hazır rekombinant proteinin olması önemli bir önveri olarak kullanılacaktır.

Ayrıca, bu proje ile rekombinant DNA teknolojisi ile klonlama yapma ve protein ekspresyonunu gerçekleştirme altyapısı oluşturulmuştur. Böylece bu teknik altyapı ve beceri birikimi başka hedef proteinlerin de rekombinant olarak üretilmesine, bunların terapötik amaçlarla kullanım için test edilmesine ve ileride gerektiğinde bu proteinlere karşı monoklonal antikor üretim çalışmaları yapılmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR:

1. Baarends WM, et al. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the mullerian duct. *Development*, 120:189–197
2. Teixeira J, et al. (1996). Developmental expression of a candidate mullerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinology*, 137:160–165
3. Jossen N, di Clemente N, Gouédard L. (2001). Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 179:25–32
4. MacLaughlin DT, Donahoe PK. (2002). Mullerian inhibiting substance: an update. *Adv Exp Med Biol*, 511:25–38
5. Connolly DC, et al. (2003). Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 63:1389–1397
6. Masiakos PT, et al. (1999). Human ovarian cancer, cell lines, and primary ascites cells express the human Mullerian inhibiting substance (MIS) type II receptor, bind, and are responsive to MIS. *Clin Cancer Res*, 5:3488–3499
7. Bakkum-Gamez JN, et al. (2008). Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers. *Gynecol Oncol*, 108:141–148
8. Song JY, et al. (2009). The expression of Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone type II receptor protein and mRNA in benign, borderline and malignant ovarian neoplasia. *Int J Oncol*, 34:1583–1591
9. Gupta, V., Carey, J.L., Kawakubo, H., Muzikansky, A., Green, J.E., Donahoe, P.K., MacLaughlin, D.T., Maheswaran, S. (2005). Mullerian inhibiting substance suppresses tumor growth in the C3(1)T antigen transgenic mouse mammary carcinoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
10. Yancik R. (1993). Ovarian cancer. Age contrasts in incidence, histology, disease stage at diagnosis, and mortality. *Cancer* 71 (2 Suppl): 517-23.
11. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, et al. (2005). Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*. 2005;55:10–30.
12. Coukos G, Rubin SC. (1998). Chemotherapy resistance in ovarian cancer: new molecular perspectives. *Obstet. Gynecol*. 91(5 Pt 1), 783–792.
13. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA, Edwards BK (eds). (1975-2008). SEER Cancer Statistics Review.
14. Waldmann, Thomas A. (2003). "Immunotherapy: past, present and future". *Nature Medicine* 9 (3): 269–277.

15. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer". *N Engl J Med* 350 (23): 2335–2342.
16. Keating MJ, Cazin B, Coutre S, Bihiray R, Kovacsovics T, Langer W, Leber B, Maughan T et al. (2002). "Campath-1H treatment of T-cell prolymphocytic leukemia in patients for whom at least one prior chemotherapy regimen has failed". *J Clin Oncol* 20 (1): 205–213.
17. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N et al. (1994). "Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20". *Blood* 83 (2): 435–445.
18. Hodi FS, et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363:711–723.
19. Bookman MA, et al. (2003). Evaluation of monoclonal humanized anti-HER2 antibody, trastuzumab, in patients with recurrent or refractory ovarian or primary peritoneal carcinoma with overexpression of HER2: a phase II trial of the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol*, 21:283–290.
20. Rosen DG, et al. (2005). Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 99:267–277.
21. Odunsi K, et al. (2003). NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 63:6076–6083.
22. Kantoff PW, et al. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*, 363:411–422.