

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

REKOMBİNANT HER3 ANTİJENİNİN ÜRETİLMESİ VE SAFLAŞTIRILMASI

Ahmet Kaan Dikici

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Arzu Atalay

Haziran

2022

ETİK BEYAN

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

Ahmet Kaan Dikici

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Arzu Atalay danışmanlığında Ahmet Kaan Dikici tarafından hazırlanan bu çalışma 21/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hakan GÜRDAL

İmza:

Üye: Doç. Dr. Füsun ÖZMEN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Arzu ATALAY

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Rekombinant HER3 Antijeninin Üretilmesi ve Saflaştırılması

Ahmet Kaan Dikici

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman Öğretim Üyesi Doç. Dr. Arzu Atalay

HER3, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör ailesinin dört üyesinden biridir. HER1, HER2, HER3 ve HER4'ü içeren bu reseptör tirozin kinaz ailesi, birçok kanser türü için terapötik bir hedeftir. HER3'ün meme, akciğer, kolon ve pankreas gibi çeşitli insan kanserlerinde aşırı ifadesi metastatik potansiyelin artışına ve tümör gelişiminin desteklenmesine yol açarak tedavide başarısızlığın ana nedenini oluşturur. Son yıllarda yapılan birçok çalışma HER3'ün önemini göstermiş ve HER3'ü hedef alan tedavilerin geliştirilmesine yönelik çok sayıda prelinik ve klinik çalışmanın başlamasını sağlamıştır. Artan HER3 ifadesi, kanser tedavisi sırasında anti-EGFR/HER1 ve anti-HER2 terapötiklerine karşı dirence neden olur. Bu direncin üstesinden gelmek ve terapötik etkinliği artırmak için HER3 sinyal yolağı temel aşağı akış mediyatörlerinin etkili inhibisyonu gereklidir. Bu nedenle, daha fazla HER3 inhibitörü terapötik ajan geliştirme çalışmasına ihtiyaç vardır. Bu reseptörlere bağlanan monoklonal antikolar geliştirilmiş olmasına ve bunları geliştirmeye yönelik çalışmalar halen devam etmesine rağmen, HER3'ü hedef alan bir monoklonal antikor henüz onaylanmamıştır. Anti-HER3 monoklonal antikor geliştirmeyi hedeflediğimizden, bu çalışmada ilk adım olarak rekombinant HER3 antijen olarak klonlanmış ve ifade edilmiştir. HER3 hücre dışı alanı, ligand bağlanmasının özgüllüğünü belirleyen iki sistein açısından zengin bölge (II ve IV) ve iki yan bölge (I ve III) içeren dört alt alandan (I-IV) oluşur. *Escherichia coli*'de 6xHis tag füzyonlu rekombinant antijeni ifade edebilmek için 1869 nükleotidlik uzunluktaki HER3 hücre dışı alanı pET-30a(+) plazmitine klonlanmıştır. Klonlama için *E.coli* DH5α-TR1 bakteri suşu kullanılmıştır. Klonlama doğrulaması sonrası BL21(DE3) suşunda rekombinant protein ifadesi gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel pET30 ekspresyon sisteminde ifadesi gerçekleştirilen rekombinant HER3-ECD proteini Ni-NTA rezin kullanılarak saflaştırılmıştır. Üretilen rekombinant protein başka bir çalışmada anti-HER3 nötralizan monoklonal antikor geliştirilmesi için antijen olarak kullanılacaktır.

2022, 80 sayfa

Anahtar kelimeler: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3 (HER3), HER3-ECD, Antijen, pET-30 ifade sistemi.

ABSTRACT

MSc Thesis

Production and Purification of Recombinant HER3 Antigen

Ahmet Kaan Dikici

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Arzu Atalay

HER3 is one of the four members of the Epidermal Growth Factor Receptor family. This receptor tyrosine kinase family, which includes HER1, HER2, HER3, and HER4, is a therapeutic target for many types of cancer. Overexpression of HER3 in various human cancers such as breast, lung, colon, and pancreas promotes tumor development, increases metastatic potential and is the main cause of treatment failure. In recent years, many studies indicated the importance of HER3, and numerous preclinical and clinical studies for the development of HER3-targeted treatments have begun. Increased HER3 expression causes resistance to anti-EGFR/HER1 and anti-HER2 therapeutics during cancer treatment. Effective inhibition of key downstream mediators of the HER3 signaling pathway is required to overcome this resistance and increase therapeutic efficacy. Therefore, more HER3 inhibitor therapeutic agent development studies are required. Although monoclonal antibodies binding to these receptors have been developed and studies to improve them are currently in progress, a monoclonal antibody targeting HER3 has not yet been approved. Since we aimed to develop an anti-HER3 monoclonal antibody, we first cloned and expressed recombinant HER3 as antigen. The HER3 extracellular domain consists of four subdomains (I-IV), which include two cysteine-rich regions (II and IV) and two flanking regions (I and III) that determine the specificity of ligand binding. The 1869 nucleotide full-length HER3 extracellular domain was cloned into pET-30a(+) plasmid, in order to express the recombinant antigen fused to 6xHis tag in *Escherichia coli*. *E.coli* DH5 α -TR1 bacterial strain was used for cloning. After verification of cloning, recombinant protein was expressed in BL21(DE3) strain. Recombinant HER3-ECD protein expressed in the bacterial pET30 expression system was purified using Ni-NTA resin. The produced recombinant protein will be used as an antigen for the development of anti-HER3 neutralizing monoclonal antibody in the further study.

2022, 80 pages

Keywords: Human epidermal growth factor receptor 3 (HER3), HER3-ECD, Antigen, pET-30 expression system.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tüm bilgisini ve tecrübesini bana aktaran ve bu süreç boyunca desteğiyle hep yanımda olan, yüksek lisans tez danışman hocam Doç. Dr. Arzu Atalay’a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda her türlü destekleriyle bana yardımcı olan arkadaşlarım Rümeysa Doğan, Merve Samur ve Çağrı Kavak’a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Sistem Biyoteknolojisi İleri Araştırma Birimi çalışanlarına teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi olarak değerli destekleriyle benim yanımda olan çok kıymetli babama, anneme ve kardeşime çok teşekkür ederim.

Ahmet Kaan Dikici

Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. İNSAN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (HER) AİLESİ	3
2.2. HER3 RESEPTÖRÜ.....	4
2.2.1. HER3 YAPISI	4
2.2.2. HER3'ÜN DÜZENLEDİĞİ HÜCRESEL SİNYAL YOLAKLARI	5
2.3. HER3 VE KANSER.....	9
2.4. HER3 HEDEFLİ TEDAVİLER	12
2.4.1. KÜÇÜK MOLEKÜLLER.....	12
2.4.2. MONOKLONAL ANTİKORLAR.....	13
3. GEREKÇE VE AMAC.....	19
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
4.1. MATERYAL.....	20

4.1.1. HÜCRE HATLARI	20
4.1.2. PLAZMİD VE BAKTERİ SUŞLARI	20
4.1.3. PLAZMİDLERİN İDAMESİ İÇİN LB VE LB-AGAR BESİYERİ HAZIRLANMASI	20
4.1.4. KİTLER	21
4.1.5. SOLÜSYONLAR VE TAMPONLAR	21
4.1.6. KİMYASALLAR VE ENZİMLER	23
4.2. YÖNTEM.....	24
4.2.1. HER3 RNA VE CDNA ELDESİ	24
4.2.1.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu	24
4.2.1.2. cDNA Sentezi	25
4.2.2. HER3-ECD KLONLAMA.....	25
4.2.2.1. Klonlama Primer Tasarımı ve PCR	25
4.2.2.2. pET30a(+) ve HER3-ECD PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi	27
4.2.2.3. Plazmid ve İnsert DNA Ligasyonu ve Transformasyon	28
4.2.2.4. Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonu	29
4.2.2.5. Klonlama Reaksiyonu Doğrulama.....	30
4.2.3. REKOMBİNANT HER3-ECD PROTEİN İFADESİ.....	31
4.2.3.1. HER3-ECD Rekombinant Protein Küçük Ölçekli İndüklenmesi.....	31
4.2.3.2. HER3-ECD Rekombinant Protein Orta Ölçekli İndüklenmesi	32
4.2.3.3. HER3-ECD Rekombinant Protein Çözünürlük Testi	32
4.2.4. REKOMBİNANT HER3-ECD SAFLAŞTIRILMASI	32

4.2.5. GENEL YÖNTEMLER	34
4.2.5.1. Kompetan Hücre Hazırlanması	34
4.2.5.2. Bakteriyel Transformasyon	34
4.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi	35
4.2.5.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	35
4.2.5.5. İmmünblotlama.....	35
4.2.5.6. Coomassie Blue Boyaması.....	36
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	37
5.1. ANTİJENİK BÖLGE BELİRLENMESİ VE ÇOĞALTILMASI	37
5.2. HER3 HÜCRE DIŞI ALANIN PET30(A)+ İFADE PLAZMİDİNE KLONLANMASI.....	38
5.2.1. HER3-ECD'İN PCR İLE AMPLİFİKASYONU.....	38
5.2.2. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM	38
5.2.3. LİGASYON VE TRANSFORMASYON	40
5.2.4. KOLONİLERDEN PLAZMİD DNA İZOLASYONU.....	40
5.2.5. HER3-ECD KLONLAMA KONTROLÜ	41
5.2.5.1. T7 Primerleri ile İnsert Kontrolü	41
5.2.5.2. Restriksiyon Endonükleaz Kesim Kontrolü	42
5.2.5.3. DNA Dizi Analizi	42
5.3. REKOMBİNANT HER3-ECD PROTEİN İFADESİNİN İNDÜKLENMESİ.....	43
5.3.1. HER3-ECD REKOMBİNANT PROTEİN ÇÖZÜNÜRLÜK TESTİ.....	44
5.4. REKOMBİNANT HER3-ECD SAFLAŞTIRILMASI	45
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	47

6.1. TARTIŞMA	47
6.2. SONUÇ.....	50
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>52</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>60</u>
Ek 1: pET-30a(+) Plazmid Haritası.....	60
Ek 2: HER3-ECD Nükleotid ve Amino Asit Dizileri.....	61
Ek 3: T7F_HER3ECD_Koloni4 ile HER3-ECD Referans Dizisi BLAST Analizi.....	62
Ek 4: T7R_HER3ECD_Koloni4 ile HER3-ECD Reverse Complement Referans Dizisi BLAST Analizi.....	63
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>64</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>65</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HER3 yapısı (18).....	5
Şekil 2.2. HER3'ün aktivasyonu (23).....	6
Şekil 2.3. HER3'ün düzenlediği hücrel sinyal yolları (25).....	8
Şekil 5.1. HER3-ECD PCR Ürününün Agaro Jel Görüntüsü.....	37
Şekil 5.2. HER3-ECD PCR Saflaştırma Ürününün Agaro Jel Görüntüsü.	38
Şekil 5.3. Restriksiyon Enzim Kesimi Agaro Jel Görüntüsü.	39
Şekil 5.4. Ligasyon Öncesi Saflaştırma Kontrolü Agaro Jel Görüntüsü.....	40
Şekil 5.5. Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonu.	41
Şekil 5.6. T7 Primerleri ile İnsert Kontrolü.....	41
Şekil 5.7. HER3-ECD Kolonilerinin Restriksiyon Enzim Kesim Kontrolü.	42
Şekil 5.8. DNA Dizi Analizi Sonucu.	43
Şekil 5.9. HER3-ECD Protein İfadesinin İmmünblotlama ile Analizi.	44
Şekil 5.10. HER3-ECD Rekombinant Proteininin Protein Çözünürlük Testi (Coomassie Blue Boyaması).	45
Şekil 5.11. Rekombinant HER3-ECD Saflaştırılması (Coomassie Blue Boyaması).	46
Şekil 5.12. Rekombinant HER3-ECD Saflaştırılması Sonrası İmmünblotlama Analizi.	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HER3 hedefleyen monospesifik antikorlar.....	14
Çizelge 2.2. HER3 hedefleyen bispesifik antikorlar.....	17
Çizelge 4.1. Kitler	21
Çizelge 4.2. 0,5 M EDTA Solüsyonu	21
Çizelge 4.3. 10X TBE Solüsyonu	22
Çizelge 4.4. 10X Koşturma Tamponu	22
Çizelge 4.5. 10X TBS Tamponu.....	22
Çizelge 4.6. Kimyasallar ve Enzimler	23
Çizelge 4.7. HER3-ECD Primerler	26
Çizelge 4.8. Klonlama PCR Koşulları	26
Çizelge 4.9. Restriksiyon Enzim Kesim Koşulları	27
Çizelge 4.10. Ligasyon Koşulları	28
Çizelge 4. 11. T7 F/R PCR Koşulları	30
Çizelge 4.12. RE Çift Kesim Kontrol PCR Koşulları.....	31

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ADCC	Antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksisite
ATCC	Amerikan tipi kültür koleksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
ddH ₂ O	Çift distile su
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ECD	Ekstraselüler alan
FDA	Amerikan gıda ve ilaç dairesi
HER3	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3
HRG	Heregulin
IPTG	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
IGF1-R	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü
LB	Luria bertani

M	Molar
MAPK	Mitojenle etkinleşen protein kinaz
mAb	Monoklonal antikör
NRG	Nörogulin
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
OD	Optik yoğunluk
PI3-K	Fosfoinositid-3 Kinaz
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SCCHN	Baş ve boyun yassı hücreli karsinom
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TKI	Tirozin kinaz inhibitörü
TBS	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TBS-T	Tween-20 içeren tris tamponlu tuz çözeltisi
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Yeni anti-kanser ilaçları piyasaya sürülmesine rağmen, her sene dünya genelinde kanser sebebiyle milyonlarca ölüm gerçekleşmektedir. Kanser gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli rol oynayan çeşitli hayatta kalma sinyal yollarını hedeflemek için yeni tedavi stratejileri keşfedilmeye çalışılmakla birlikte, kanser tedavisinde kapsamlı çalışılan ve başarı elde etmiş stratejilerden birisi monoklonal antikor temelli tedavilerdir. HER (EGFR) reseptör ailesinin kanser tedavisi için mükemmel hedefler olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. HER ailesi üyelerinin aşırı ifadesi çeşitli insan kanseri türlerinin karsinogenezinde ve ilerlemesinde rol oynamaktadır ve HER sinyal ağının kanserlerde düzensiz olduğu bilinmektedir. Bu reseptörler birçok kanser türünde anormal şekilde aktive edildiği için monoklonal antikor geliştirmek amacıyla ilaç hedefleri olarak kullanılmaktadır (1,2).

HER3 Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü ailesinin bir üyesidir. Genellikle "kinaz-ölü" bir reseptör olarak kabul edilen HER3, HER hedefli kanser tedavilerinden kaçışla ilişkilendirilmektedir. Tek başına ifade edildiğinde HER3 hücre dışı alanı veya tam uzunluktaki reseptör, ligand tarafından aktivasyona dirençlidir. HER3 ligand bağlanmasını takiben genellikle HER1 veya HER2 aile üyesi ile dimerizasyon yoluyla aktive olarak sinyalizasyonunu sağlamaktadır (3). HER3 sinyalinin aktivasyonunun kanser metastazını desteklediği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar HER3 ifadesinin kanser tedavisinde tedavi başarısızlığının başlıca nedeni olduğunu göstermektedir. HER3'ün yüksek ifadesi çeşitli insan kanserlerinde gözlemlenmiştir ve solid tümörlü kanser hastalarında daha kötü bir hayatta kalma ile ilişkilidir. Bu veriler tedavi direncinin üstesinden gelmek ve kanser hastalarının hayatta kalımını iyileştirmek için HER3'ün terapötik olarak inaktivasyonunun gerekli olduğu fikrini güçlü bir şekilde desteklemektedir (4).

Anti-HER1/HER2 monoklonal antikorlara, tirozin kinaz inhibitörlerine ve hormonal tedaviye karşı HER3 aracılı direnç mekanizmaları ve HER3'ün kanserde terapötik hedeflemesine yönelik farklı yaklaşımlar kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (5). Bu doğrultuda temel stratejinin HER3 hücre dışı alanını bağlı bir oto-inhibe edilmiş konformasyona kilitleyebilen, ligand bağlanmasını bloke edebilen, diğer EGFR'lerle dimerizasyonu önleyebilen, reseptör internalizasyonunu indükleyebilen veya immün

efektör hücreleri çalıştırarak antikor bağımlı hücresel sitotoksositeye yol açabilen monoklonal bir antikorla hedeflemek olduğu ortaya konmuştur (6). HER3 reseptörü üzerindeki farklı epitoplara saldırarak kendine özgü farmakolojik özellikler ve etki mekanizmaları sergileyen birkaç antikorun halen klinik çalışmaları devam etmekle birlikte henüz FDA tarafından onaylanmış bir anti-HER3 monoklonal antikorunu bulunmamaktadır (7).

Bu tez çalışmasında yeni bir anti-HER3 monoklonal antikor geliştirilmesinin ilk basamağı olacak, HER3 hücre dışı alanı rekombinant antijen olarak klonlanmış ve ifade edilmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. İNSAN EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (HER) AİLESİ

Epidermal büyüme faktörü ailesi tirozin kinaz reseptörleri sınıfı içerisinde yer almaktadır. Büyüme faktörleri çok hücreli organizmaların gelişimi, büyümesi ve homeostazı için gerekli olan ve hücre yüzeyinde bulunan büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak hücreler arasındaki iletişimi sağlayan ve çeşitli hücresel faaliyetlerin oluşumunu indükleyen sinyal molekülleridir. Büyüme faktörü reseptörleri esas olarak, hücre dışı sinyalleri hücre içi habercilerin aktivasyonu yoluyla veya doğrudan reseptör translokasyonu yoluyla hücre çekirdeğine iletmekle görevlidir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesinin üyeleri hücre çoğalması, hücre hayatta kalımı, hücre gelişimi, hücre farklılaşması ve hücre göçünün düzenlenmesi gibi süreçlerde temel rollere sahiptir (8). Tirozin kinaz reseptörleri sınıfına ait olan, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör ailesinin (ErbB) 4 üyesi vardır: EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 ve ErbB4/HER4 (9). Her bir olgun ErbB reseptörü, hücre dışı alanda (extracellular) ligand bağlanma bölgesi, bir transmembran (TM) alan (domain) ve hücre içi kısımda (intracellular) tirozin kinaz alanına sahiptir ve bu alanlar regülatör bölgelerle birbirine bağlıdır (10). ErbB reseptörleri aralarında EGF, TGF ve nörogulinlerin de bulunduğu en az 12 farklı büyüme faktörü ile kontrol edilirler. Büyüme faktörü bağlanması reseptörün homo- veya hetero-dimerizasyonuna yol açmakta, bunun sonucunda trans-otofosforilasyon gerçekleşmekte ve ardından SH2 alan-bağımlı olarak altındaki sinyal yollarının aktivasyonu gerçekleşmektedir (11).

EGFR ailesi, sinyal iletimi ve onkogenezdaki genel rolü nedeniyle en çok araştırılan reseptör protein tirozin kinaz aileleri arasındadır. 35 yılı aşkın bir süredir- reseptör protein kinaz sinyal iletim yollarının fizyolojik ve patolojik işlevlerini belirlemek için önemli çalışmalar yapılmıştır. Tirozin kinaz aktivitelerinin bozulması sebebiyle kanser, diyabet, otoimmün, hematopoietik, kardiyovasküler, inflamatuvar ve sinir bozuklukları gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıktığı bilinmektedir. Bu reseptörler birçok kanser türünde anormal şekilde aktive edildiğinden dolayı ilaç hedefleri ve biyobelirteçler olarak modern tedavi yaklaşımları amacıyla kullanılmaktadır. EGFR ailesinin üyeleri sinyal iletimindeki ve akciğer, mide, meme, kolorektal, baş ve boyun ve pankreas karsinomları dahil olmak üzere

çeşitli malignitelerin patogenezindeki genel rolü nedeniyle kapsamlı bir şekilde araştırılmaya devam etmektedir (12).

2.2. HER3 RESEPTÖRÜ

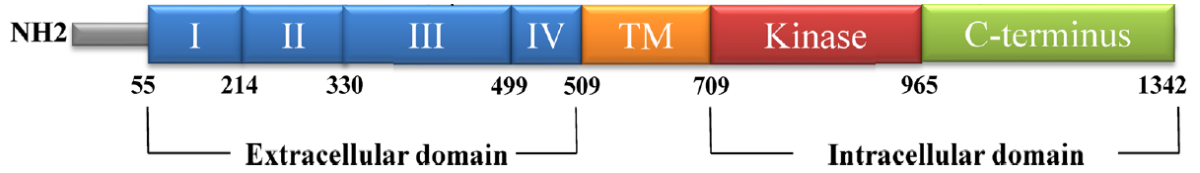
1989 yılında Kraus ve ark. HER3 reseptörünün kromozom 12'nin (12q13) uzun kolunda lokalize olduğunu tespit etmişlerdir. ErbB3 olarak da adlandırılan bu reseptör 23.651 baz çifti tarafından kodlanmakta ve sonrasında 1342 amino aside çevrilmiştir (13). HER3 diğer HER ailesi üyelerinden farklı olarak temel katalitik rezidülerden yoksundur ve otofosforilasyonunu engelleyen bozulmuş (zayıf) bir kinaz aktivitesine sahiptir. HER3'ün minimal intrinsik kinaz aktivitesine sahip olması özelliğinden dolayı Src kinaz, PI-3K/Akt, MEK/MAPK, Jak/Stat yollarını aktive etmek için EGFR/HER-1 veya HER-2 gibi başka bir reseptör tirozin kinaz (RTK) ile etkileşime girmesi gereklidir (14). HER3 kalp, deri, endokrin, sinir sistemi, gastrointestinal, üreme, solunum ve idrar yolları hücrelerinde ifade edilmektedir (15).

2.2.1. HER3 YAPISI

HER3 ekstraselüler domaini, iki sistein açısından zengin bölge (II ve IV) ve ligand bağlanmasının özgüllüğünü belirleyen iki yan bölge (I ve III) içeren dört alt domainden oluşur. Domain II dimerizasyon kolunu içermesi sebebiyle HER3'ün diğer HER ailesi üyeleriyle heterojen kenetlenme yoluyla dimerizasyonuna izin vererek transfosforilasyonunu kazanmasına olanak sağlar. HER3'ün intraselüler domaini bir jukstamembran alanından, bir tirozin kinaz alanından ve bir C-terminal alanından oluşur. Karboksi terminal kuyruğu tirozin fosforilasyon bölgelerini yapısında barındırmaktadır. Hücre içi alan fosfoinositid 3 kinazın (PI3K) p85 düzenleyici alt birimi için altı kenetlenme bölgesi içermektedir (14,16). HER3'ün hücre dışı alanı EGFR (HER1) ve HER2'nin hücre dışı alanları ile yaklaşık olarak %50 oranında aynıdır. HER3'ün hücre içi alanı ise EGFR ve HER2'nin hücre içi alanları ile yaklaşık olarak %60 oranında aynıdır (15). Bununla birlikte, EGFR ve HER2'nin protein kinaz alanlarına bakıldığında %83 amino asit dizisi özdeşliğine sahip oldukları görülmüştür. Bu veri EGFR ve HER2'nin birbirleri arasında HER3'e kıyasla daha yakın bir ilişkiye sahip olduğunu belirtir. EGFR, HER2 ve HER3 arasında yapılan bir protein kinaz dizi karşılaştırması Cys-721, His-740 ve Asn-815 gibi belirli rezidülerin HER3'te konservatif olmayan ikamelere (yerine geçmelere) sahip

olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu amino asit değişiklikleri HER3'ün tirozin kinaz alanındaki katalitik aktivitesini zayıflatmaktadır (17).

Şekil 2.1.'de HER3 reseptörünün hücre dışı ve hücre içi alanları bölümlerinin ve transmembran bölümünün karşılık geldiği amino asit rezidülerinin başlangıç ve bitiş noktaları gösterilmektedir (18).



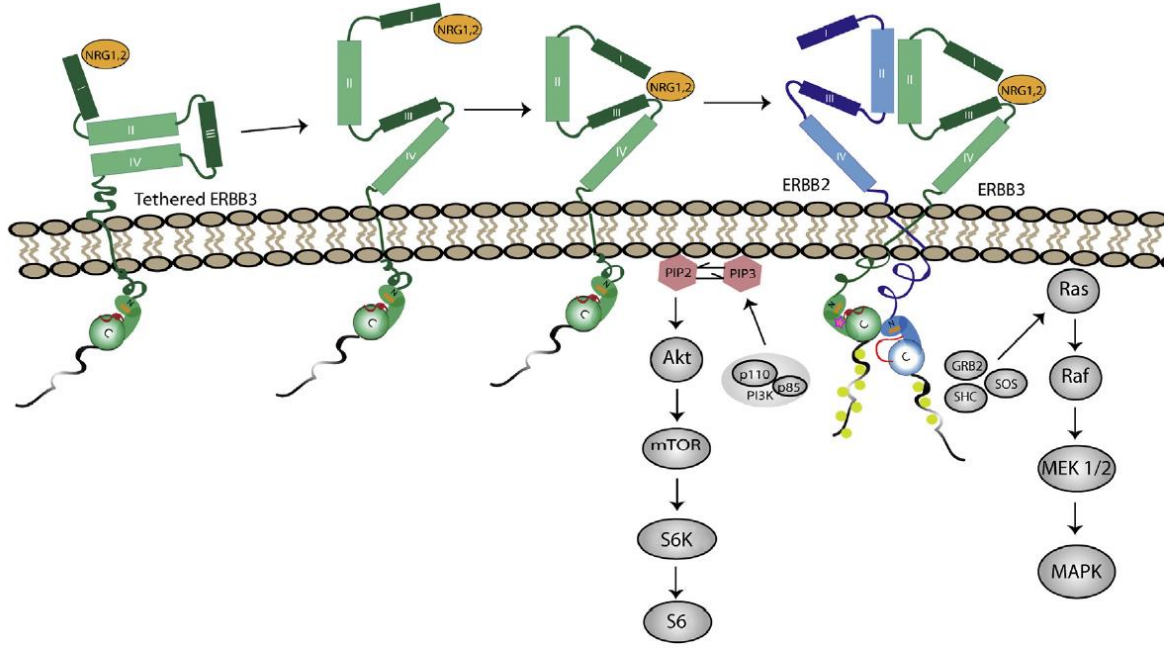
Şekil 2.1. HER3 yapısı (18)

2.2.2. HER3'ÜN DÜZENLEDİĞİ HÜCRESEL SİNYAL YOLAKLARI

HER (ErbB) reseptörlerinin fonksiyonlarını icra edebilmeleri ve aşağı akış sinyal yollarını aktive edebilmeleri için birbirleri ile dimerize olmaları önemli ve gerekli bir adımdır. Normalde HER2 haricindeki HER reseptörleri, dimerizasyonu engellemek için moleküler katlanmalara sahip doğal konformasyonlarıyla inaktif monomerler halinde bulunurlar (19). Ligand yokluğunda HER3, ekstraselüler alandaki sistein açısından zengin bölgeleri (II ve IV) arasındaki etkileşimlerle stabilize edilerek bağlı (tethered) bir konformasyonda kalır ve böylece dimerizasyonunu önler. EGFR ve HER4 gibi HER3 reseptörü de kendisine bağlanan spesifik ligandları vasıtasıyla aktivasyonunu kazanabilmektedir. Nörogulinler (heregulinler olarak da bilinirler) HER3 ve HER4 reseptörlerine bağlanan ligandlardır. Bunların içinden sadece NRG-1 ve NRG-2 ligandları HER3'e bağlanırken, NRG-1, NRG-2, NRG-3 ve NRG-4 ise HER4'e bağlanırlar (20).

NRG'nin bağlanması dimerizasyon kolu açılan ve bağlı (kilitli) olmayan bir HER3 yapısı oluşturacak olan konformasyonel değişikliği indükler. Bağlı olmayan (untethered) HER3'ün homodimerleri yalnızca çok verimsiz bir şekilde oluşturduğu düşünülmektedir. Bağlı olmayan HER3 molekülleri homodimerler oluşturmak yerine tercihen HER2 ile heterodimerize olur ve böylece reseptör aktivasyonu gerçekleşerek güçlü bir mitojenik tepki indüklenir (21). HER3 katalitik kinaz aktivitesinden, HER2 de ligand bağlama aktivitesinden yoksun olduklarından dolayı her iki reseptör de işlevsel olarak birbirlerine bağımlı durumdadır. Bu sebeple EGFR ailesi içerisinde HER3, çoğunlukla HER2 ile

etkileşime girer. HER3 diğer EGFR ailesi üyelerinden HER1 ile de doğrudan etkileşime girebilir. HER1 ligandı olan EGF, HER1'in tirozin kinaz alanını aktive edebilir ve aynı zamanda HER3'ü de çapraz bir şekilde aktive edebilir. HER-3 ve HER-4 birbirleri arasında heterodimer oluşturabilir, ancak bu ikili arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır (22).



Şekil 2.2. HER3'ün aktivasyonu (23)

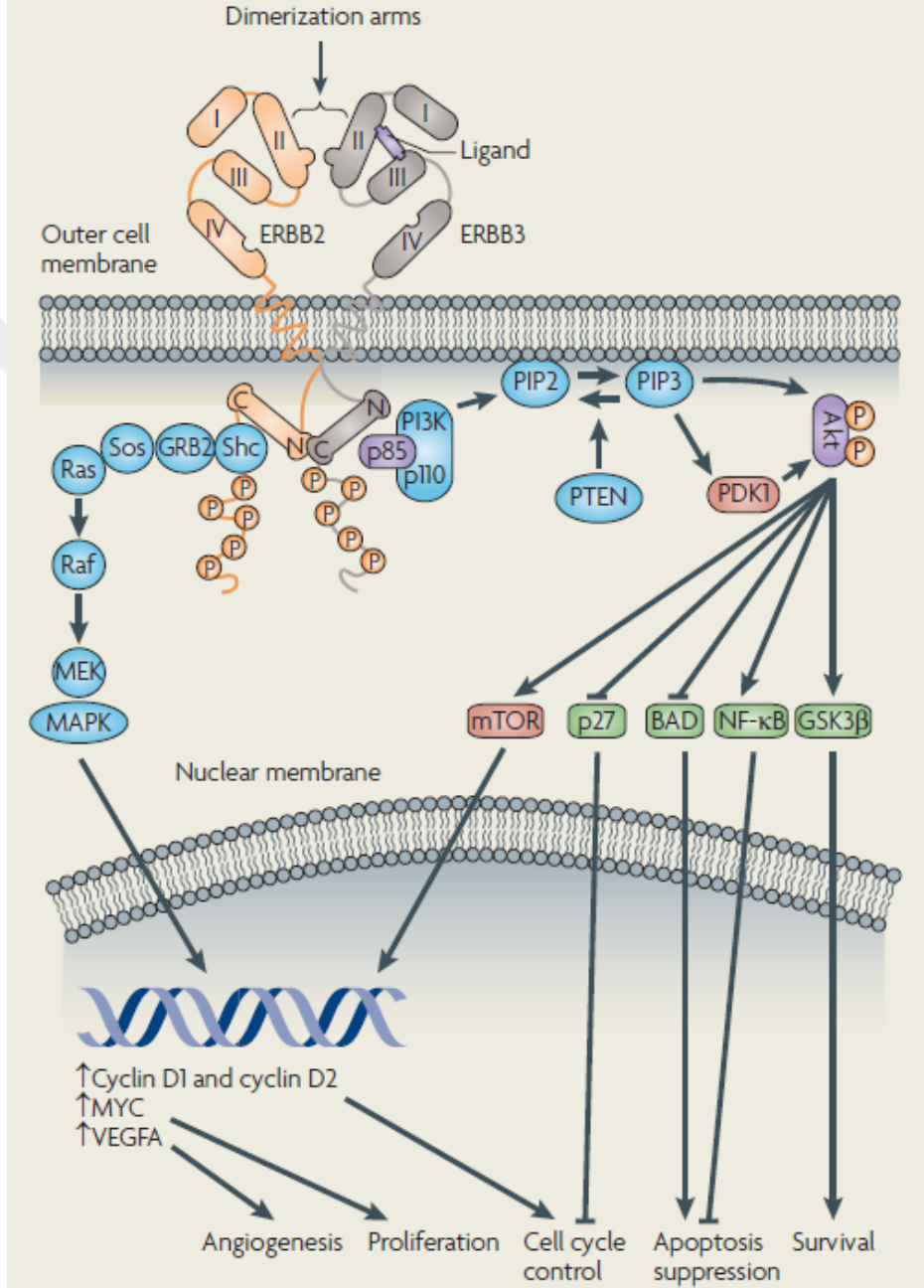
Şekil 2.2.'de HER3'ün aktivasyon süreci gösterilmektedir. Ligand bağlanması heterodimerizasyon için hazır hale gelen bağı olmayan bir HER3 yapısının oluşumunu sağlar. Bunun için ilk olarak, bağı (inaktif) yapıdaki HER3'ün ekstraselüler domainin I. bölgesine ligandı olan nörogulin-1 veya nörogulin-2 bağlanır. Ligand bağlanması II ve IV domainlerinin ayrılmasını takiben I ve III domainlerini bir araya getiren ve diğer EGFR reseptörleri ile heterodimerizasyonun meydana gelmesine izin veren konformasyonel değişikliği indükler. Sonrasında HER3 ve diğer EGFR üyesi reseptör arasındaki asimetrik dimer oluşumu gerçekleşir. Bu dimerizasyon işlemi şu şekilde meydana gelir: HER3 tirozin kinaz domaininin C-terminal kısmı ile diğer reseptör tirozin kinaz domainin N-terminal kısmı etkileşime girer, bu da aktivasyon döngüsünün genişlemesine ve ardından her iki reseptörün C-terminal kuyruğunun fosforilasyonuna izin vererek HER3'ün transfosforilasyonuna yol açar. Reseptörlerin fosforilasyonu kinaz aracılı sinyal iletimi için C-terminal kuyrukları içinde kenetlenme bölgeleri sağlar. Fosforile edilmiş C-terminal

kuyrukları daha sonra sinyal yollarını aktive etmek için adaptör proteinleri toplayabilir. Bu etkileşimlerin sonucunda hücre içinde adaptör proteinler toplanarak PI3K/AKT ve MEK/MAPK gibi sinyal yollarının aktivasyonunu indükler (23,24).

HER ailesi dimerleri tarafından aktive edilen iki temel sinyal yolağı vardır. Bunlardan birisi proliferasyonu uyaran MAPK yolağı, diğeri ise tümör hücresinin hayatta kalmasını destekleyen PI3K-Akt yolağıdır. MAPK yolağının aktivasyonu hücresel proliferasyonun yanı sıra hücre göçü, hücre farklılaşması ve anjiyogenez sağlayan genlerin de transkripsiyonuna yol açar. Serin-treonin kinazlar olan Akt ailesinin aktivasyonu ise, hücre hayatta kalımını, apoptozun baskılanmasını ve hücre döngüsü kontrolünü sağlayan süreçlerin başlamasına olanak sağlayan proteinlerin fosforilasyonu yoluyla aktivasyona izin verir (25). Dört HER reseptörü arasında HER3, PI-3 K/Akt sinyalini aktive etmek için en uygun olanıdır. HER1 ve HER2 PI3-K'yi adaptör proteinleri aracılığıyla aktive edebilirken, HER3 PI3-K'nın p85 alt birimi için doğrudan bağlanma bölgelerine sahiptir. Fosforile edildikten sonra C-terminal kuyruğunda en fazla tirozin rezidüsüne sahip olduğundan daha sonra bu rezidüler doğrudan PI-3 K'nin p85 alt birimine bağlanabilir (26).

Şekil 2.3.'te HER3 reseptörü vasıtasıyla aktive edilen iki önemli aşağı akış sinyal yolağı görselleştirilmiş olarak ifade edilmektedir. HER3 tarafından aktive edilen en önemli sinyal yolu fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/3 fosfoinositid bağımlı protein kinaz (PDK) 1/protein kinaz B (AKT) yolağıdır. PI3K'nın aktivasyonu HER3'ün HER1 veya HER2 ile dimer oluşumu ile indüklenir. PI3K, P110 katalitik alt birimi ve P85 düzenleyici alt biriminden oluşan dimerik bir protein kinazdır (27). P85 alt birimi, SH2 alanı vasıtasıyla HER3'e özgü olan bağlantı bölgelerine bağlanır ve ardından P110 alt birimi, fosfatidilinositol 4,5-bifosfatın (PIP2) 3,4,5-trifosfat fosfatidilinositole (PIP3) fosforilasyonunu katalize eder. PIP3 seviyesi kromozom 10 üzerinde delesyona uğramış fosfataz ve tensin homologu (PTEN) tarafından düzenlenir (28). PI3K hücre zarında PDK1/AKT birikmesini sağlar ve bunu fosforilasyon yoluyla aktive ederek aşağı akış sinyalini indükler. PI3K sinyal yolağı hücre büyümesi, hücre apoptozu ve tümör hücresi istilasının yanısıra metastaz ve kemoterapi direncini de regüle eder. HER3 tarafından aktive edilen önemli bir diğeri sinyal yolu ise, Ras/Raf/MEK/ mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağıdır. HER-3'ün heterodimerizasyon sonrası aktivasyonunu takiben tirozin kinazın alanının fosforilasyonu gerçekleşir. Fosforilasyon işlemi bağlantı bölgelerine Grb2-SOS kompleksinin

bağlanmasını indükler. Daha sonra SOS'un üç boyutlu yapısı değiştirilir ve bu da kümelenerek bir araya toplanan inaktif Ras-GDP'den aktif Ras-GTP'nin oluşmasını sağlayarak Raf, MEK ve MAPK'nın aktivasyonuna yol açar. Aktive edilen MAPK, hücre dışı uyarıcıları hücre içine aktararak hücre çekirdeğindeki transkripsiyon faktörlerini regüle eder ve böylece hücre göçü ve hücre çoğalmasını gibi hücresel süreçleri indükler (29,30).



Şekil 2.3. HER3'ün düzenlediği hücresel sinyal yolları (25)

2.3. HER3 ve KANSER

Bazı insan kanserlerinde HER3'ün yüksek düzeyde ifade edilmesi, erken dönem için bu büyüme faktörü reseptörünün potansiyel bir terapötik hedef olabileceği önerisine yol açmıştır. Bununla birlikte, kısmen bozulmuş kinaz aktivitesi nedeniyle kanserlerde HER3'ü hedeflemeye yönelik çabalar geride kalmıştır. Ancak aynı HER2 gibi HER3'ün de ErbB(HER) sinyalizasyon ağının ana pozitif düzenleyicisi olarak fonksiyon gösteren, çoğunlukla modülatör bir role sahip olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda, ErbB reseptörleri arasındaki sinyalizasyonu kuvvetlendiren ve çeşitlendiren çapraz konuşma, kanser hücrelerinin temel bir özelliği olarak ortaya çıkmaktadır ve bu bağlamda HER3'ün kilit bir öneme sahip olabileceği düşünülmektedir. Bunu destekler nitelikte yapılan çalışmalar, HER3'ün EGFR veya HER2'yi hedefleyen terapötik ajanlara karşı oluşan tümör direncinden sorumlu olduğunu göstermiş ve böylece kanserdeki kritik rolünü aydınlatmıştır (17,31).

HER3'ün yüksek ifadesi klinik sonuçları kötü olan çeşitli insan kanserlerinde sıklıkla gözlenmektedir. Bilindiği üzere HER3 hücre sinyalini iletmek için başka bir reseptör ile etkileşime girmelidir, ve bu reseptör de genellikle HER2'dir. HER3 genellikle HER2 aşırı ekspresyonu olan tümörlerde onkojenik aktivitesini sergilemek için HER2 ile eşleşir (32). HER3'ün aşırı ekspresyonunun kolorektal kanser, mide kanseri, meme kanseri, melanom, yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri, pankreas kanseri ve rahim ağzı kanseri dahil olmak üzere kanserli hastalarda daha kötü bir hayatta kalma oranı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca HER3 varlığının klinik sonuçlar üzerindeki etkisinin HER2'yi aşırı ifade eden tümörlerde çok daha yaygın olarak görüldüğü bildirilmiştir (33). Bu durum HER2/HER3 heterodimerinin kanser ilerlemesinde çok önemli bir rol oynadığı argümanını desteklemektedir. Yabani tip veya mutant HER3 tek başına ifade edildiğinde, tutunmadan-bağımsız (anchorage-independent) büyümeyi desteklemediği de bildirilmiştir. HER3 mutantlarının çoğu, HER2 ile ifade edildiğinde bu büyümeyi desteklemektedir (34). Yapılan bir çalışmada, gelişmiş HER3 sinyalinin metastatik meme kanserinde tümör hücresi hareketliliğini ve intravazasyonu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (35). Ayrıca HER3 sinyalinin HER2 aşırı ifade eden meme kanseri, kastrasyona dirençli prostat kanseri, platine dirençli refrakter yumurtalık kanseri ve EGFR tirozin kinaz inhibitörü (TKI) dirençli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) dahil olmak üzere ilaca direnç

fenotipi sergileyen insan kanserlerinin gelişiminde çok önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (32).

Büyük ölçekli genomik çalışmalar sayesinde özellikle kolon (%7) ve meme kanserinde (%2) HER3 mutasyonlarının varlığı bildirilmiştir. Jaiswal ve diğerleri mide ve kolon kanserlerinin %11'inde HER3 somatik mutasyonları tanımlamıştır. HER3 mutasyonlarının onkojenik aktivitesinin kinaz aktif HER2'ye bağlı olduğunu bulmuşlardır. Çeşitli insan tümörlerinde tanımlanan HER3 mutasyonlarının çoğu hücre dışı alan bölgesinde kümelenirken, az sayıda da olsa HER3'ün kinaz alanında ve hücre içi kuyruğunda yer alan mutasyonlar da saptanmıştır. HER3 mutasyonlarından bazılarının NRG yokluğunda onkojenik özellik gösterirken, diğer bazı mutasyonların ise NRG'nin eklenmesiyle daha da uyarılmış hale geldiği belirtilmiştir (36). HER3 ligandları olan NRG1 ve NRG2'nin aşırı ifadesi meme, yumurtalık, kolorektal, küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu (NSCLC), prostat ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (SCCHN) dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde HER3 sinyalini yönlendirmektedir. Daha sonra ise HER3 sinyali otokrin, jukstakrin ve parakrin biçimiyle hareket etmektedir. NRG1 ve NRG2 genlerinde alternatif birleşme ve çoklu promotörlerin kullanımı yoluyla çok sayıda izoformun oluşumu gözlenmektedir. Yeterince çalışılmamış olmasına karşın, bu farklı NRG izoformlarının HER3 sinyalini aktive ettiklerinde farklı biyolojik etkiler sergilediklerini gösteren kanıtlar bulunmaktadır (23).

Hayatta kalma sinyali PI-3K/Akt yolağının özellikle HER2 ile etkileşimler aracılığıyla HER3 tarafından aktivasyonu kanser tedavisinde kemorezistansa yol açmaktadır. Yapılan bir çalışmada insan meme kanseri hücre hatlarında HER2 ve HER3'ün birlikte ifadesinin PI-3K/Akt sinyalinin aktivasyonunu indüklediğini ve paklitaksel, doksorubisin, 5-florourasil, etoposid ve kamptotesin gibi kemoterapötik ajanlara karşı artan direnç ile ilişkili olduğunu göstermiştir (37). Başka bir çalışmada ise, kemoterapötik bir ilaç olan doksorubisinin HER3 ligandlarını upregüle ederek yumurtalık kanseri hücrelerinde HER3/PI-3K/Akt sinyalini aktive etmesinden dolayı bu hücrelerde kemorezistansa katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, HER3'ün hedeflenmesinin yumurtalık tümörlerini, platin bazlı veya diğer kemoterapi ajanlarının öldürücü etkilerine karşı önemli ölçüde duyarlı hale getirebileceği bildirilmiştir (38). HER3 günümüzde özellikle meme, prostat, melanom, kolon ve akciğer kanserinde ve ayrıca HER2 veya HER1'i aşırı eksprese eden

birçok kanserde ana oyuncularından biri olarak kabul edilmektedir. Önemli hususlardan birisi, HER3'ün upregüle olarak ifadesinin artması sonucu birçok kanserde tedavi direncine neden olabileceğidir. Yine başka bir çalışmada bu direncin HER2'yi aşırı ifade eden meme kanserinde trastuzumabı içeren hedefe yönelik tedaviye bir yanıt olarak HER2 inhibisyonu ile ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (39).

HER3 melanom ve pankreas kanserinde, EGFR'nin tercih ettiği bir dimerizasyon ortağı olarak rapor edilmiştir. İlgili deneysel çalışmalarda, HER3'ün susturulması melanom hücre göçünü ve hücre istilasını azaltırken, HER3'ün aşırı ifadesi ise pankreas adenokarsinomunda hem *in vitro* hem de *in vivo* hücre proliferasyonunu önemli ölçüde artırmıştır. Ayrıca, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunda (SCCHN), membranöz HER3 ekspresyonunun azalmış sağkalım ile ilişkili olduğu bulunmuştur (17). Kolon kanseri hücre dizilerinde ve kolorektal tümörlerde artan HER3 mRNA seviyeleri bildirilmiştir ve HER3 ekspresyonu kolorektal tümörlerin %30-90'ında saptanabilmektedir. HER3 ekspresyonunun kolon kanseri hastalarında hastalığın ilerlemesine sebebiyet verdiği gösterilmiştir. Ayrıca anti-HER3 antikor tedavisi ile HER3'ün ifadesinin azaltılmasıyla hücre proliferasyonu, hücre göçü ve hücre istilasının inhibisyonu, G2-M hücre döngüsü durması ve kolon kanseri hücre dizilerinde apoptoz indüksiyonu gibi hücresel süreçlerin meydana geldiği gösterilmiştir (40). Melanom metastazlarında IHC (immünohistokimya) boyaması yapılarak yüksek HER3 ifadesi bildirilmiştir ve HER3'ün insan melanom hücrelerinde sıklıkla ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca mikrodizin analizi kullanılarak HER3'ün melanomda yukarı yönde regüle edilen gen gruplarından biri olduğu bulunmuştur. Aynı şekilde mikrodizin analizi kullanılan başka bir çalışma, normal bir prostata kıyasla prostat kanserinde HER3 ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Daha sonra IHC boyaması kullanılarak insan prostat kanserinin %90'ının önemli ölçüde HER3 ifadesi gösterdiği ve böylece prostat kanserinde HER3 sinyalizasyonunun önemli bir yeri olduğu ortaya koyulmuştur (41). HER3 aşırı ekspresyonu ile çeşitli kanserlerdeki solid tümörlerde sağkalımı birbirine bağlayan bir meta-analiz çalışması, HER3 aşırı ifadesi olan kanserlerin medyan yüzdesinin %42.2 olduğunu ve HER3'ün hem 3 yıllık hem de 5 yıllık dönemde daha kötü genel sağkalım (OS) ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalar HER3'ün çeşitli kanserlerin ilerlemesinde rol oynadığını göstermektedir (33).

2.4. HER3 HEDEFLİ TEDAVİLER

Monoklonal antikorlar (mAb) ve küçük molekülü tirozin-kinaz inhibitörleri (TKI), çeşitli tümör tiplerinde EGFR ve HER2'nin hedeflenmesinde kullanılan gerekli temel ajanlar olmuşlardır. Bununla birlikte, bozulmuş kinaz aktivitesi nedeniyle HER3 terapötik bir hedef olarak uzun süre göz ardı edilmiştir. Ancak son zamanlarda, HER3'ün tümör progresyonu ve ilaç direncindeki önemi ortaya çıktığından dolayı, HER3 daha fazla odak haline gelmeye başlamıştır (42). HER3'ü hedefleyen başlıca protein ajanlar arasında monospesifik ve bispesifik antikorlar bulunmaktadır. Bu ajanlar ligand bağlanmasının inhibisyonu, reseptör dimerizasyonunun inhibisyonu, HER3'ün hücre yüzeyinde ifadesinin azalması, Fc aracılı fonksiyonların görevlendirilmesi ve HER3'ün inaktif bir konformasyonda kilitlenmesi gibi mekanizmalarla tümör hücre büyümesine müdahale etmektedirler (43). Monospesifik ve bispesifik antikorlar dışında HER3'e karşı hedeflenen tedaviler arasında ise anti-HER3 aşılı, HER3 için bispesifik ligand tuzakları (ligand traps), HER3-kilitli nükleik asit (LNA) temelli RNA inhibitörleri ve HER3-psödokinaz aktivitesine karşı küçük molekül inhibitörleri yer almaktadır (14).

2.4.1. KÜÇÜK MOLEKÜLLER

HER3 hedefli tedavi yaklaşımları çoğunlukla antikorlara dayalıdır. Bunun yanında HER3'ü hedeflemek için temelde bu reseptörün ekspresyonuna müdahale eden ve proteasomal degradasyonunu indüklemek için HER3'e bağlanan modifiye edilmiş ATP-rekabetçi moleküller dahil az sayıda farmakolojik yaklaşım geliştirilmiştir. Bir çalışmada, AC3573 bileşiğinin aktif HER2-HER3 heterodimer kompleks oluşumunu ve NRG kaynaklı sinyalizasyonu inhibe ederek aşağı akış sinyalini ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (44). HER3'ün farmakolojik olarak hedeflendiği bir çalışmada, küçük moleküllerin bu reseptörün biyolojik işlevini bozabilecek kapasitede olabileceği gösterilmiştir. Seçici bir küçük molekül olan TXI-85-1'in, HER3'ün ATP bağlayıcı cebinde Cys721 ile etkileşime girdiği belirtilmiştir. TXI-85-1'in bir türevi olan TX-121-1'in ise HER3'ün kısmi olarak degradasyonuna neden olduğu ve, c-Met ve HER2 ile dimerizasyona müdahale ettiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu seçici küçük molekülün HER3 aracılı sinyal iletimini bozduğu gösterilmiştir. HER3 hedefli terapötiklerde bu küçük molekülü inhibitörlerin rolünü doğrulamak için daha fazla çalışmanın gerekli olduğu belirtilmektedir (45).

2.4.2. MONOKLONAL ANTİKORLAR

HER3'ün yüksek ifadesi birçok kanserde kanser progresyonunu destekler ve birçok kanserli hastada daha kötü bir hayatta kalma oranı ile ilişkilidir, bu da HER3 reseptörünü spesifik olarak hedefleyen ve inhibe eden etkili terapötikler geliştirilmesinin gerekliliğini ve önemini ortaya çıkarmaktadır. Bu direncin üstesinden gelmek ve kanser hastalarını etkili bir şekilde tedavi etmek için HER3'ün inaktivasyonunun gerekli olduğuna inanılmaktadır. Düşük kinaz aktivitesi nedeniyle, klinik öncesi çalışmalarda ve ilerlemiş solid tümörleri olan hastalarda HER3'ü bloke edici bir antikor ile hedeflemek en çok incelenen strateji olmuştur. Varolan tüm HER3 hedefli tedavi yaklaşımları arasında, klinik geliştirmedeki HER3 hedefli terapilerin neredeyse tamamı antikor sınıfına aittir. HER3 hedefli terapiyi tanımlayabilmek için ilerlemeler kaydedilmiştir. Bazı anti-HER3 antikorlarının, in vivo anti-tümör aktivitesi görüldüğünden geliştirilmeye çalışılan bu monoklonal antikorlar yeni kanser terapötik adayları olarak umut vaat etmektedirler (16,32).

Şu anda klinik olarak onaylanmış bir anti-HER3 monoklonal antikor tedavisi bulunmamakla birlikte birtakım ilaç adayı antikorlar klinik geliştirmenin çeşitli aşamalarında. HER3 monoklonal antikorları monospesifik ve bispesifik olarak iki grup halinde bulunmaktadır. Bu ajanların çoğu faz I çalışmalarda güvenlik, tolere edilebilirlik ve ön etkinlik açısından solid tümör tiplerinde test edilmiştir (42).

Monospesifik Antikorlar

HER3 hedefli monospesifik monoklonal antikorlar geliştirilmiş olup, bunlar arasında terapötik amaçlı klinik çalışmalarda değerlendirilip başarı elde etmiş olan antikorlar Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. HER3 hedefleyen monospesifik antikorlar

Monospesifik mAb Adı	Format	Hedef	Klinik Faz	Üretici	Referanslar
Lumretuzumab	İnsansı IgG1	HER3	Faz I/II	Genentech/Roche	(46,47)
Elgemtumab	İnsan IgG1	HER3	Faz I/II	MorphoSys/Novartis	(48,49)
AV-203	İnsansı IgG1	HER3	Faz I	Aveo Oncology	(50)
REGN1400	İnsan IgG	HER3	Faz I	Regeneron Pharmaceuticals	(51)
KTN3379	İnsan IgG1	HER3	Faz II	Celldex Therapeutics	(52)
ISU104	İnsan	HER3	Faz I	ISU Abxis	(53)

Lumretuzumab (RG7116) Roche tarafından geliştirilen insansı ve glikolize edilmiş, HER3 ekstraselüler domain I'i hedefleyen bir IgG1 antikorudur. Bu antikor da ligand bağlanmasını ve reseptör heterodimerizasyonunu önler ve liganda bağlı HER3 ve Akt fosforilasyonunu inhibe eder. Fc bölgesi immün efektör hücreler üzerinde Fc-gama reseptörüne (FcγRIIIa) yönelik afiniteyi artırmak için glikolize edilmiştir. Bu glikolize edilmemiş antikora kıyasla hem in vivo hem de in vitro antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksitenin (ADCC) daha güçlü bir aktivasyonunu mümkün kılmıştır (46). Lumretuzumab HER2 ve HER3 ifade eden metastatik meme kanseri hastalarında pertuzumab ve paklitaksel ile kombinasyon halinde [NCT01918254] değerlendirilmiş ve faz I çalışmaları tamamlanmıştır. İlk insan çalışmasından elde edilen sonuçlar, lumretuzumabın iyi tolere edildiğini ve klinik aktivite endikasyonlarının olduğunu göstermiştir. Etkinliği in vivo olarak, birincil NSCLC ksenograftlarının bir panelinde değerlendirilmiş ve burada 17 NSCLC hücre hattından 10'unda % 50'den büyük bir oranda

tümör büyümesi inhibisyonuna neden olduğu ve hatta bazı durumlarda tam tümör gerilemesine neden olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, lumretuzumab'ın ileri evre NSCLC'li hastalarda paklitaksel ve karboplatin ile kombinasyon halinde değerlendirildiği bir faz II çalışması [NCT02204345] ise sponsor firma tarafından sonlandırılmıştır. Bu antikorun tamamlanan faz I klinik testi sonuçlarına göre metastatik HER3 pozitif tümörü olan hastaları [NCT01482377] tedavi etmek için tek başına kullanıldığında iyi tolere edildiği görülmüştür (47).

Elgemtumab HER3'ün II ve IV domainleri arasında lokalize edilmiş bir epitop ile bağlanarak HER3'ü inaktif bir konformasyonda kilitleyebilen tamamıyla bir insan mAb'dur. Bağlandığı epitop bölgesi sebebiyle, farklı bir etki mekanizmasına sahiptir. Hem ligand bağımlı hem de ligand bağımsız HER3 aktivitesini inhibe ettiği ve hem NRG'ye bağlı hem de HER2 güdümlü kanser modellerinde tümör büyümesini önlediği bildirilmiştir. Bu mAb NRG bağlanmasını engellemezken anti-EGFR (setuksimab) ve anti-HER2 (trastuzumab) antikorları ile sinerjik olarak etki etmektedir. Faz I çalışmaları, gelişmiş solid tümörlerde elgemtumab'ın güvenli ve iyi tolere edildiğini göstermiştir. İleri HER2-pozitif meme veya mide kanseri olan hastalarda trastuzumab ile kombinasyon halinde bir faz I çalışmasında [NCT01602406] güvenli görülmüş ve stabil hastalık elde eden hastaların %40'ında ön etkinlik sonuçları sağlamıştır. Ayrıca, elgemtumab ileri solid tümörler, yassı hücreli baş ve boyun karsinomu (SCCHN), mide ve meme kanseri olan hastaların klinik faz I çalışmalarında [NCT01911936, NCT01598077] monoterapi olarak değerlendirilmiştir (48,49).

AV-203 AVEO Oncology tarafından üretilen insansı IgG1 formatındaki bir mAb'dur. AV-203'ün reseptöre ligand bağlanmasını bloke ettiği ve HER3 degradasyonunu indüklediği gösterilmiştir. AV-203 HER3'ün hem NRG kaynaklı hem de HER2'ye bağlı aktivasyonunu inhibe ettiği ve HER2-HER3 dimerizasyonunu önleyerek aşağı akış sinyal yollarının güçlü bir inhibitörü olarak hareket ettiği bildirilmiştir. Bu antikor hastadan türetilmiş tümör eksplant modellerine karşı klinik öncesi aktivite göstermiştir. AV-203 meme ve pankreas tümörleri gibi çeşitli kanser modellerinde test edildiğinde etkili görülmüş ve güvenliği, metastatik veya ilerlemiş solid tümörleri olan hastalar üzerinde faz I klinik çalışmada başarıyla test edilmiştir. Çeşitli ileri solid tümörleri olan hastalarda yapılan bir faz I klinik

Çalışma [NCT01603979], AV-203'ün 2 haftada bir maksimum 20 mg dozun altında güvenli ve iyi tolere edildiğini göstermiştir (50).

REGN1400 HER3'e yönelik ve NRG bağlanmasını inhibe edebilen tamamıyla insan bir IgG molekülüdür. Bu antikorun çoklu insan tümör hücre dizilerinde HER3 ve Akt'nin fosforilasyonunu ve bu hücre dizilerinin *in vitro* büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bu mAb'un anti-EGFR antikorları ile kombinasyon halinde hayvanlarda, baş ve boyun yassı hücreli karsinom ve kolorektal kanser modellerinin gerilemesini sinerjik olarak teşvik edebileceği bildirilmiştir. REGN1400'n tek başına veya erlotinib ve setuksimab ile birlikte, kabul edilebilir bir güvenlik profiline sahip olduğu bir faz I deneyinde [NCT01727869] test edilmiştir. Setuksimab (% 23) veya erlotinib (% 18) ile birlikte kullanıldığında stabil hastalık vakaları bildirilmiştir (51).

KTN3379 domain II ve domain III arasındaki bir epitopa bağlanarak HER3' aktif olmayan bir konfigürasyonda kilitleyen tam insan anti-HER3 IgG1 monoklonal antikorudur. Bu mAb liganda bağlı ve ligandan bağımsız HER3 sinyallemesini inhibe eder. Bir faz I denemede KTN3379, yeni teşhis konmuş HNSCC hastalarına [NCT02473731] pre-operatif olarak uygulanmış ve hastaların %42'sinde tümör yükünde küçülme gözlenmiştir. Tümör küçülmesi olan hastalarda hem NRG1 hem de HER3 ifade eden tümörlerin olduğu bildirilmiştir. Bir faz I alışması ileri solid tümörlü hastalarda [NCT02014909] tek başına veya setuksimab, erlotinib, vemurafenib veya trastuzumab ile birlikte KTN3379'un güvenliğini kanıtlamıştır. KTN3379'un cetuximab [NCT03254927] ile birlikte değerlendirildiği faz II klinik denemesi tamamlanmıştır. Trametinib [NCT03580382] ile birlikte kullanıldığı faz I alışması ise sonlandırılmıştır (52).

ISU104 tamamıyla insan anti-HER3 antikorudur. Bu antikor HER3 ekstraselüler domain III'e bağlanır ve domain I ile de zayıf bir şekilde etkileşime girer. ISU104'n sadece HER3 reseptörüne ligand bağlanmasını engellemekle kalmadığı, aynı zamanda HER3'n diğer EGFR partnerleri ile dimerizasyonunu bloke ederek aşağı akış sinyal yollarının inaktivasyonunu sağladığı bildirilmiştir. Bu antikorun güvenliğini, tolere edilebilirliğini ve farmakokinetiğini değerlendirmek için ileri solid tümörü olan hastaların [NCT03552406] dahil olduğu bir faz I klinik çalışma devam etmektedir (53).

Bispesifik Antikorlar

HER3 hedefli geliştirilen ve klinik denemelerde başarı elde etmiş olan bispesifik antikorlar Çizelge 2.2.'de yer almaktadır.

Çizelge 2.2. HER3 hedefleyen bispesifik antikorlar

Bispesifik mAb Adı	Format	Hedef	Klinik Faz	Üretici	Referanslar
Duligotuzumab	İkisi bir arada simetrik IgG1	HER3/EGFR Bispesifik	Faz II	Genentech/Roche	(54,55)
MM-111	Füzyon molekülü	HER3/HER2 Bispesifik	Faz I	Merrimack Pharmaceuticals	(56,57)
Istiratumab	2 scFv'ye kaynaşmış IgG1	HER3/IGF1R Bispesifik	Faz II	Merrimack Pharmaceuticals	(58,59)
Zenocutuzumab	Ortak hafif zincir IgG1	HER3/HER2 Bispesifik	Faz I/II	Merus	(60)

Duligotuzumab (MEHD7945A) Genentech tarafından geliştirilen bispesifik bir HER3 hedefleme yaklaşımıdır. Bu simetrik antikor her biri EGFR veya HER3'ün hücre dışı alanı III'ü bağlayabilen iki özdeş bağlanma bölgesine sahiptir. Duligotuzumabın hem EGFR hem de HER3'ün in vitro ve in vivo ligand bağlanmasını ve sinyalizasyonunu etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. İnsanda ilk faz I çalışmasında duligotuzumab, tekrarlayan epitel kaynaklı tümörleri olan kanser [NCT01207323] hastalarında çok iyi bir güvenlik profili göstermiştir (54). Duligotuzumab'ın erlotinib ve setuksimab gibi anti-EGFR ilaçlarına dirençli hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği ve üçlü negatif meme kanserinin preklinik modellerinde PI3K inhibitörleri ile sinerji oluşturabildiği gösterilmiştir. Duligotuzumabın

tek başına ve çeşitli kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halindeki klinik faz II çalışmaları [NCT01577173, NCT01652482] tamamlanmıştır (55).

MM-111 hem HER2 hem de HER3'e yönelik tasarlanan bir antikor füzyon molekülüdür. Bu bispesifik antikor, HER2'yi aşırı ifade eden kanser hücrelerinin preklinik modellerinde (BT474, meme kanseri, N87 ve mide karsinomu hücre hatlarında) özellikle lapatinib veya trastuzumab ile kombine edildiğinde tümör büyümesini azaltma yeteneği göstermiştir (56). MM-111'in kemoterapi (taksol, platinyum) veya anti-HER2 tedavileri gibi çeşitli ilaçlarla birlikte güvenliği, HER2 pozitif kanserli hastalarla gerçekleştirilen bir faz I denemesinde gösterilmiştir. MM-111 tek başına ve trastuzumab, lapatinib ve kemoterapötiklerle çeşitli kombinasyonlar halinde HER2-pozitif meme kanserleri [NCT01304784] ve diğer HER2-amplifiye solid tümörlerin [NCT00911898] klinik deneylerinde araştırılmıştır. MM-111'in terapötik etkisinin reseptörlere eşzamanlı bağlanmasına bağlı olduğu ve HER2-aşırı ifade seviyesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (57).

Istiratumab (MM-141), ikisi insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörüne (IGF1-R) ve ikisi HER3'e spesifik olmak üzere 4 yüksek afiniteli bağlanma bölgesi barındıran tetravalan bispesifik bir antikordur. Istiratumab hem NRG'nin HER3'e bağlanmasını hem de IGF-1/IGF-2'nin IGF1R'ye bağlanmasını bloke eder ve PI3K/Akt sinyal yolağı aktivasyonunu inhibe eder. Ayrıca bu tetravalan antikor, her iki reseptörün ve HER3 veya IGF-1R içeren reseptör komplekslerinin degradasyonunu indükler (58). Istiratumab'ın kemoterapötik ajanların antitümoral aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Bu antikorum metastatik pankreas kanseri [NCT02399137] hastalarında kemoterapötiklerle kombinasyon halinde kullanıldığı bir faz II klinik çalışma tamamlanmıştır (59).

Zenocutuzumab (MCLA-128) HER2 ve HER3 reseptörlerini hedefleyen insansı bir bispesifik IgG1 antikorudur. Geliştirilmiş antikor bağımlı hücrel sitotoksiste (ADCC) aktivitesine sahiptir. Bu antikorum liganda bağımlı HER2/HER3 heterodimerizasyonunu ve aşağı yönlü sinyallemeği inhibe ettiği bildirilmiştir. Zenocutuzumabın bir faz I klinik çalışmada, 25 HER2 pozitif metastatik mide kanseri hastası arasından 1 hastada klinik yanıt ve 9 hastada stabil hastalığa neden olduğu belirtilmiştir. Halihazırda bu antikor bir faz I/II klinik çalışmada NRG1 füzyonu barındıran solid tümörlerde [NCT02912949] test edilmektedir ve iyileştirme aşamasındadır (60).

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Tirozin reseptör kinazlar sınıfına ait olan, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör ailesinin dört üyesinden biri olan HER3'ün meme, akciğer, kolon ve pankreas gibi çeşitli insan kanserlerinde aşırı ekspresyonu metastatik potansiyeli artırarak ve tedavi başarısızlığının ana nedeni olarak tümör gelişimini desteklemektedir. Ayrıca kanser tedavisi sırasında EGFR/HER1 ve HER2 terapötiklerine karşı kazanılan direnç HER3 ifadesinin artışı neden olmaktadır. Direncin üstesinden gelmek ve terapötik etkinliği arttırmak için HER3'ün ve/veya HER3 sinyal yolağının temel aşağı akış mediyatörlerinin etkili inhibisyonu gereklidir. HER1, HER2, HER3 ve HER4'den oluşan EGFR reseptör ailesi pek çok kanser için terapötik hedef teşkil etmektedir. Özellikle HER1 ve HER2 dahil olmak üzere, bu reseptörlere bağlanan monoklonal antikorlar geliştirilmiş olup, halen daha üstünlerinin geliştirilme çalışmaları devam etmekle birlikte EGFR ailesinin bir diğer önemli üyesi olan HER3 görece olarak diğer aile üyelerine kıyasla daha geride kalmıştır (12,14).

Ancak son yıllarda HER3'ün önemini gösteren çalışmaların birikmesinin doğrultusunda, HER3 hedefleme ajanları ile çok sayıda prelinik ve klinik araştırmalar ortaya çıkmaya başlamıştır. Reseptör tarafından aktive edilen aşağı akış yollarını hedefleyen tedaviler gibi doğrudan HER3'ü hedefleyen monoklonal antikor temelli klinik çalışmalar da sürmektedir. Pek çok anti-HER3 monoklonal antikor HER3 inhibisyonu için faz çalışması aşamasındadır ve yeni mAb'lar geliştirilmeye devam edilmektedir. Ancak henüz HER3'ü hedefleyen bir monoklonal antikor veya başka bir terapötik ajan klinik olarak onay almış değildir (42).

Anti-HER3 monoklonal antikor geliştirmek amacı ile öncelikle HER3 antijeni üretilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında HER3 ekstraselüler alanına karşı rekombinant protein üretilmesi ve saflaştırılması amaçlanmıştır. Üretilmiş olan rekombinant protein daha sonraki çalışmada anti-HER3 monoklonal antikor geliştirilmesi için antijen olarak kullanılacaktır.

4. MATERİYAL ve YÖNTEM

4.1. MATERİYAL

4.1.1. HÜCRE HATLARI

Bu çalışmada kullanılan hücre hatları ATCC'den temin edilmiştir. Çalışmada SKBR-3 (ATCC Cat. No: HTB-30) meme kanseri hücre hattı ve CaCO-2 (ATCC Cat. No: HTB-37) kolorektal kanser hücre hattı HER3 cDNA eldesi için kullanılmıştır.

4.1.2. PLAZMİD VE BAKTERİ SUŞLARI

Vektör olarak pET-30a(+) (Novagen, 69909) ifade plazmidi kullanılmıştır (Ek 1). Klonlama bakteri suşu olarak *E. coli* DH5 α -TR1 (Invitrogen, 12297016), protein ifade bakteri suşu olarak ise *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, 693873) kullanılmıştır.

4.1.3. PLAZMİDLERİN İDAMESİ İÇİN LB VE LB-AGAR BESİYERİ HAZIRLANMASI

400 ml % 2,5 LB besiyeri hazırlamak için 10 gr Sigma-LuriaBroth (L3522) tartılarak cam şişeye aktarıldı. 400 ml %2'lik LB-Agar besiyeri hazırlamak için ise 10 gr Sigma-LuriaBroth (L3522) ve 8 gr AppliChem-Agar (A0949) tartıldı ve bir başka cam şişeye aktarıldı. Sonrasında cam şişeler 400 ml'ye kadar otoklovlanmış çift distile su ile doldurularak iyice çalkalandıktan sonra çözünme işlemi için manyetik karıştırıcıda bekletildi. Ardından hazırlanan besiyerleri 121 °C'de, 20 dk otoklavlandı. Hazırlanan 400 ml LB-Agar karışımına 400 μ l Kanamisin (Applichem, A1493.0010) eklenip çalkalandı. Hazırlanan besiyeri 18-20 ml olacak şekilde petri kaplarına dökülüp soğumaya bırakıldı ve sonrasında parafilmle soğuk odaya kaldırıldı.

4.1.4. KİTLER

Çalışma kapsamında kullanılan kitler aşağıda Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kitler

Kit Adı	Markası, Katalog Numarası
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, 217004
The Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, 04-379-012-001
Gel/PCR Purification Kit	FavorPrep, FAGCK001
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, 11-754-777-001
Western Bright-Sirius Chemiluminescent Detection Kit	Advansta, K-12043-D10
cComplete™ lysis-M	Roche, 04-719-956-001
cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, 11-697-498-001

4.1.5. SOLÜSYONLAR VE TAMPONLAR

Bu tez çalışmasında kullanılan solüsyonlar ve tamponlar aşağıda yer almaktadır.

Çizelge 4.2. 0,5 M EDTA Solüsyonu

İçerik	Miktar (g/L)
EDTA (Sigma, E5134)	93 gr
NaOH (Riedel-de-Haen, 06203)	20 gr
ddH ₂ O	400 ml

500 ml 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlamak için 93 gram EDTA disodyum tuzu tartıldı ve 400 ml deiyonize çiftdestile suda çözüldü. Solüsyon pH'ı NaOH çözeltisi ile 8'e ayarlandı. Hazırlanan solüsyon 500 ml son hacme kadar çift distile su ile tamamlandı.

Çizelge 4.3. 10X TBE Solüsyonu

İçerik	Miktar (g/L)
Tris (Ambresco, 0826)	108 gr
Borik Asit (Ambresco, 0588)	55 gr
0,5 M EDTA	40 ml

108 gr Tris bazı ve 55 gr Borik Asit tartıldı ve 900 ml deiyonize çift distile suda çözöldü. 40 ml 0,5 M EDTA eklendikten sonra son hacim çift distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

Çizelge 4.4. 10X Koşturma Tamponu

İçerik	Miktar (g/L)
Tris (Ambresco, 0826)	30 gr
Glisin (Ambresco, 0167)	144 gr
SDS (Sigma, L4390)	10 gr
ddH ₂ O	700 ml

30 gr Tris ve 144 gr Glisin tartıldı ve 700 ml çift distile suda çözöldü. Sonra 10 gr SDS eklendi ve çözünmesi sağlandı. Çözeltinin pH'ı 8,3'e ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Çizelge 4.5. 10X TBS Tamponu

İçerik	Miktar (g/L)
Tris (Ambresco, 0826)	24 gr
Sodyum Klorür (Sigma, S3014)	88 gr
ddH ₂ O	900 ml

24 gr Tris ve 88 gr Sodyum Klorür tartıldı ve 900 ml çift distile suda çözöldü. Çözeltinin pH'ı 7,6'ya ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı.

1X Transfer Tamponu hazırlandı. Soğuk 1400 ml çift distile su üzerine 200 ml 10X koşturma tamponu eklendi. Çözeltiye 400 ml Methanol (Merck, 1.06009.2511) eklendikten sonra +4 °C'de muhafaze edildi.

TBS-T solüsyonu hazırlandı. 100 ml 10X TBS ile 900 ml ddH₂O karıştırıldı ve üzerine 2 ml Tween-20 (Sigma, P9416) eklendi.

% 5 BSA (Ambresco, 0332) solüsyonu hazırlandı. 100 ml TBS-T içerisinde 5 gram BSA çözüldü.

4.1.6. KİMYASALLAR VE ENZİMLER

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve enzimler aşağıda Çizelge 4.6.'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.6. Kimyasallar ve Enzimler

Kimyasal/Reaktif/Enzim Adı	Markası, Katalog Numarası
FastDigest BamHI	ThermoScientific, FD0054
FastDigest SalI	ThermoScientific, FD0644
FastDigest RE Tamponu	ThermoScientific, B64
T4 DNA Ligaz	ThermoScientific, EL0011
T4 DNA Ligaz Tamponu	ThermoScientific, B69
Taq DNA Polimeraz	ThermoScientific, 10342053
Kanamisin	Applichem, A1493.0010
Anti His-Tag Antibody	Cell signaling, 2365S
Beta Actin HRP	Abcam, ab630394
IPTG	Applichem, A4773
6X Örnek Yükleme Boyası	NewEngland Biolabs, B7021S
Agaroz	Sigma, A9539
100 bp DNA Ladder	ThermoScientific, SM0321
1 kb DNA Ladder	NewEnglandBiolabs, N3232S
Protein Dual Color Standard	Bio-Rad, 1610374

4.2. YÖNTEM

4.2.1. HER3 RNA VE CDNA ELDESİ

4.2.1.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

SKBR-3 ve CaCO2 kanser hücre hatlarından miRNeasy Mini Kit (Cat: 217004-QIAGEN) ve QIAzol Lysis Reagent (Cat: 1023537-QIAGEN) ile kit sağlayıcısının talimatları doğrultusunda RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Hücrelerin mikroskopta gözlenmesi sonucu yoğunlukları ve büyüme oranları dikkate alınarak RNA izolasyonu işlemi için ayrı ayrı hücre peleti elde edildi.

Hücreler 10 ml soğuk PBS ile yıkandıktan sonra 700 µl Qiazol Lysis Reagent hücrelerin üzerine eklenip 5 dakika inkübe edildi ve ardından hücreler kazınarak toplandı. Hücre lizatları homojenizasyon sağlanması için yaklaşık 15 saniye vortekslendi. Hücreler 7 dakika inkübe edildikten sonra 140 µl kloroform eklendi ve tüpler kuvvetlice çalkalandı. 3 dakika inkübasyondan sonra tüpler 5 saniye vortekslendi. Sonra tüpler 4 °C'de 12.000 x g'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında RNA içeren üstteki sulu fazdan 400 µl yeni bir toplama tüpüne alındı. RNA sıvı fazının üzerine 530 µl %100 etanol eklendi ve karıştırıldı. Kit sağlayıcısının protokolüne göre çalışılan numunenin max 700 µl'ye kadar RNeasy mini kolonuna eklenebileceği belirtilmektedir. Bu sebeple toplam numuneden 500 µl RNeasy mini kolonuna eklendi ve 24 °C'de 8000 x g'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra toplama tüpüne geçen sıvı atılarak, tüp geri takıldı. Sonra geriye kalan 430 µl numune aynı RNeasy mini kolonuna eklenerek aynı işlem tekrar uygulandı. Mini kolona 700 µl Buffer RWT eklendi ve 8000 x g'de, oda sıcaklığında, 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne akan sıvı atıldı. Ardından mini kolona 500 µl Buffer RPE eklendi ve 8000 x g'de, 1 dakika santrifüjlendikten sonra toplama tüpüne akan sıvı atıldı. Mini kolona tekrar 500 µl Buffer RPE eklendi ve 8000 x g'de, 2 dakika santrifüjlendi. Altta kalan sıvı atıldıktan sonra RNeasy mini kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek membranı iyice kurutmak için tam hızda 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası mini kolon tüpünün altına 1.5 ml'lik yeni bir toplama tüpü koyuldu. Sonra 50 µl RNase free water eklendi ve tüp tertibatı 8000 x g 'de, 1 dakika santrifüjlenerek RNA elüe edildi.

İzole edilen total RNA örnekleri konsantrasyonları ölçümü Nano-Drop-ND spectrophotometer cihazı ile gerçekleştirildi.

4.2.1.2. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA örneklerini cDNA'ya çevirmek için Roche - The Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat No: 04 379 012 001) kullanıldı.

-80 derecede muhafaza edilen RNA örnekleri çıkartılarak buz üzerine alındı. Çalışma öncesi nanodrop ölçüm sonuçlarından elde edilen konsantrasyonlara göre cDNA'ya çevrilecek tüm RNA örnekleri 1 µg'a eşitlendi. Bunun için 1000/nanodrop sonucu hesaplaması kullanılarak, RNA örneklerinin ölçüm sonuçlarına göre her örnekten kaç µl çekileceği hesaplandı. Nükleaz içermeyen PCR tüplerinde toplam hacim 13 µl olacak şekilde her bir RNA örneği için reaksiyon bileşenleri kuruldu. RNA numuneleri dikkatlice karıştırıldı ve numuneleri tüplerin altında toplamak için kısa süreli spin atırıldı. Ardından bütün numune tüpleri, heated lid thermal block cycler'da +65 °C'de 10 dk ısıtıldı ve buz üzerine alındı. Başka bir tüpe RT-Reaction Buffer, Protector RNase Inhibitor, dNTP Mix ve Reverse Transcriptase bileşenleri kullanılarak RT-Mix hazırlandı. Thermal cycler'dan alıp buz üzerine koyulan tüpler üzerine 7'şer µl RT-Mix eklendi. Böylece RNA numunelerinin total hacmi 20 µl oldu. Reaktifler dikkatlice karıştırıldı ve numuneleri tüplerin altında toplamak için kısa süreli spin atırıldı. Kit protokolüne göre RT reaksiyonunun inkübasyon süresi kullanılan primere ve hedef mRNA'nın uzunluğuna göre değişiklik göstermektedir. Buna göre HER3 hedef mRNA'nın uzunluğu 5615 baz çiftinden oluşması sebebiyle PCR tüpleri heated lid thermal block cycler'da 60 dk, 50 °C'de ve Reverse Transcriptase'ı inaktive etmek için 5 dk, 85 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası elde edilen cDNA'ları içeren reaksiyon tüpleri muhafaza edilmek üzere -20 °C dolabına kaldırıldı.

4.2.2. HER3-ECD KLONLAMA

4.2.2.1. Klonlama Primer Tasarımı ve PCR

Uniprot P21860-1 dizisine göre BamHI ve SalI restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri eklenmiş HER3 primerleri (Oligomer) tasarlanarak, 1869 nükleotidlik HER3 ECD (hücre dışı alan)'ın PCR ile çoğaltılması planlandı. Ek 2'de 1869 nükleotidlik dizi ve kodladığı amino asit dizisi yer almaktadır.

Çizelge 4.7. HER3-ECD Primerler

Gen Adı	Primer Dizisi (5'-3')
HER3 ECD-F <u>Bam</u> HI	GACAAGGGGATCCCTTCCGAGGTGGGCAACTCTCAGG
HER3 ECD-R <u>Sal</u> I	AATAGGTCGACTCAGATGGGTTTTGCCGATCAGCACC

Primerler sentez raporunda belirtilen miktarlarda Molecular Grade Water ile çözülerek 100 µM stok primerler hazırlandı. PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere 10 µl stok primere 90 µl Molecular Grade Water eklenerek 100 µM stok primer 10 µM yapıldı.

HER3-ECD klonlama işlemi amacıyla SKBR-3 cDNA'sı HER3-ECD-F ve HER3-ECD-R primerleri ile her biri 50 µl hacminde 2 tüp PCR reaksiyonu aşağıda Çizelge 4.8.'de gösterilen şartlarda kuruldu.

Çizelge 4.8. Klonlama PCR Koşulları

Reaksiyon Bileşen Miktarları	PCR Koşulları
SKBR-3 cDNA : 1 µl, H ₂ O : 34 µl	1- 94 °C 2 dk 2- 94 °C 20 sn
10X Buffer : 5 µl dNTP : 4 µl	3- 58 °C 20 sn 4- 72°C 6 dk
Pfu DNA Polimeraz : 1 µl	5- 72°C 6 dk 6- 4°C sonsuz
HER3-ECD-F : 2,5 µl HER3-ECD-R : 2,5 µl	2-3-4 ; 35 döngü...

2 tüp halindeki 45 µl PCR ürünü, 9 µl yükleme boyası ile birlikte 4 µl 100bp marker (ThermoScientific, SMO321) ile %1'lik agaroz jelde geniş tarakta 80V, 45 dakika yürütüldü. Ardından jel GeneGenius cihazında görüntülendi ve beklenen bölgede gözlenen bantlar neşter yardımıyla kesilerek ependorf tüplere alındı. Jel bandlarının ağırlığı ölçüldü ve kesilen bandlar saflaştırma kiti protoklündeki maksimum hacim olan 300 miligramı geçmediği için tek bir tüpte toplandı. Agaroz jelden DNA izolasyonu için FavorPrep Gel/PCR Purification Kit (Cat. No: FAGCK001) kullanıldı.

Ependorf tüpteki jel kesiti üzerine 500 µl FADF tamponu eklendikten sonra numune vorteksenerek karıştırıldı. Jel kesiti 55 °C su banyosunda 10 dakika bekletildi ve arada vorteksenerek iyice çözündürüldü. Kit içerisinde sağlanan toplama tüpüne FADF kolonu yerleştirildikten sonra örnek karışımın 800 µl'si kolona aktarıldı. Ardından tüp tertibatı 11.000 x g'de, 30 saniye santrifüjlendi ve toplama tüpüne akan sıvı atıldı. FADF kolonuna 750 µl Yıkama Tamponu eklendi ve 11.000 x g'de, 30 saniye santrifüjlendikten sonra akan sıvı atıldı. Kolonu kurutmak için tam hızda 3 dakika santrifüj yapıldıktan sonra FADF kolonu yeni bir tüpe alındı. Kolon membranına 40 µl Elüsyon Tamponu eklendi ve 1 dakika inkübe edildi. Sonrasında tam hızda 1 dakika santrifüj yapılarak DNA elüe edildi.

4.2.2.2. pET30a(+) ve HER3-ECD PCR Ürününün Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi

Saflaştırılan HER3 ECD PCR ürününün ve pET-30a(+) plazmid DNAsının BamHI ve SalI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesimi gerçekleştirildi.

Son hacim 15 µl olacak şekilde BamHI ve SalI ile kesim yapmak için aşağıdaki Çizelge 4.9.'da gösterilen koşullarda kesim reaksiyonu kuruldu.

Çizelge 4.9. Restriksiyon Enzim Kesim Koşulları

Tüp no	Kesilecek plazmid / PCR ürünü	ddH ₂ O	10 x FastDigest buffer	BamHI	SalI
1	Pet30-BamHI 0,2µl	12,3 µl	1,5 µl	1 µl	
2	Pet30-SalI 0,2µl	12,3 µl	1,5 µl		1 µl
3	Pet30- BamHI/SalI 0,2µl	11,3 µl	1,5 µl	1µl	1 µl
4	Her3-BamHI/SalI 10µl	1,5 µl	1,5 µl	1 µl	1 µl

37 °C 60 dakika (inkübasyon) ve 80 °C 5 dakika (inaktivasyon) şartlarında restriksiyon enzim kesim reaksiyonu gerçekleştirildi.

Restriksiyon Enzim Kesimi Sonrası AgaroZ Jelden DNA İzolasyonu

Kesim sonrası elde edilen örnekler 6:1 oranında ayarlanan yükleme boyası ile %1 agaroz jelde 45 dk yürütüldü. Jelin solundaki kuyucuğa 100 bp (ThermoScientific, SM0321) DNA ladder, jelin sağındaki kuyucuğa ise 1 kb (NewEnglandBiolabs, N3232S) DNA ladder yüklendi. Kesilmemiş 250 ng pet30(+) plazmidi ilk kuyucuğa yüklendikten sonra diğer örnekler yukarıdaki sırasıyla agaroz jele yüklendi.

Agaroz jel GeneGenius cihazında görüntüledi ve beklenen bölgede gözlenen pet30 plazmid DNA ve HER3-ECD insert bantları neşter yardımıyla kesilerek ependorf tüplere alındı. Jel bandlarının ağırlığı ölçüldü ve kesilen bandlar ayrı tüplerde toplandı. FavorPrep Gel/PCR Purification Kit (Cat. No: FAGCK001) ile agaroz jelden DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

4.2.2.3. Plazmid ve İnsert DNA Ligasyonu ve Transformasyon

Jelden saflaştırılan kesim ürünleri ile pET30 plazmid DNA - HER3ECD PCR ürünü 1:3 oranında ve son hacim 15 µl olacak şekilde aşağıda Çizelge 4.10.'da gösterildiği gibi ligasyon reaksiyonu kuruldu.

Çizelge 4.10. Ligasyon Koşulları

Tüp no	Purifiye Plazmid DNA	Purifiye Insert	ddH ₂ O	T4 DNA ligase buffer	T4 DNA ligase
1)	Pet30-BamHI 2 µl	-	11 µl	1.5 µl	0.5 µl
2)	Pet30-SalI 2 µl	-	11 µl	1.5 µl	0.5 µl
3)	ddPet30 2µl	-	11 µl	1.5 µl	0.5 µl
4)	ddPet30 2µl	ddHER3 10 µl	1 µl	1.5 µl	0.5 µl

22°C 60 dk (inkübasyon) ve 70 °C 5 dakika (inaktivasyon) şartlarında ligasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Ligasyon ürünlerinin tamamı -80°C'den alınan DH5α-TR1 kompetan

bakteri suşuna transforme edilerek LB-Agar-Kanamycin petrilerine ekildi ve 37°C’de gece boyu inkübe edildi.

4.2.2.4. Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonu

Transforme edilen pET30dd + HER3-ECD-dd kolonileri toplandı ve sıvı kültüre alındı. Kolonileri büyütmek için 40 ml LB içerisine 40 µl Kanamisin eklenerek sıvı besiyeri hazırlandı ve besiyeri 8 adet falkona dağıtıldı. İlgili koloniler ilgili falkonlara 10 µl’lik pipet ucuyula alınarak, direkt pipet uçlarının besiyerine atılması vasıtasıyla inokülasyon gerçekleştirildi. 7 adet pet30.HER3-ECD kolonisiyle birlikte 1 adet kesilmemiş pet30 kolonisi LB besiyerine inoküle edildi. Falkonlar 37°C, 180rpm’de, gece boyu (14-16 saat) inkübe edildi.

Sıvı kültürde büyütülen kolonilerden Roche - High Pure Plasmid Isolation Kit (Cat.No: 11-754-777-001) kullanılarak Miniprep plazmid DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon öncesi 8 adet tüpe inkübe olan örneklerden 1,5 ml eklendi ve 13.000 rpm, 1 dakika santrifüj edildi. Supernatanlar döküldükten sonra 1,5 ml daha ilgili kültürlerden eklenip aynı şekilde tekrar santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelletleri üzerindeki sıvı mümkün olduğunca uzaklaştırıldıktan sonra kit sağlayıcısının talimatlarına uygun olarak plazmid DNA izolasyon protokolü uygulandı.

Öncelikle pelletler 250 µl Suspension Tamponu ile çözündürüldü. Sonra tüplere 250 µl Lysis Tamponu eklendi ve 3-6 kere alt üst edilerek yavaşça karıştırıldı. 5 dk buz üzerinde inkübasyon yapıldı. 350 µl soğuk Binding Tamponu eklendikten sonra tüpler yavaşça karıştırıldı ve 5 dk buz üzerinde inkübe edildi. 13000 rpm’de, 10 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpü içerisine filtre tüpü yerleştirilerek tüp düzeneği kurulduktan sonra süpernatant filtre tüpü içerisine aktarıldı ve son hızda 1 dakika daha santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tam hızda 20 saniye santrifüj yapıldı ve toplama tüpü atılarak yenisi takıldı. Preparat yıkama işlemi için 700 µl Yıkama Tamponu II filtre tüpü üzerine eklendi ve 1 dakika tam hızda santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. DNA’yı elüe etmek için filtre tüpü yeni ependorf tüp içerisine yerleştirildi. 100 µl Elüsyon Tamponu filtre tüpü üzerine eklendi ve 1 dakika tam hızda santrifüj yapıldı. Sonrasında kolonilerden izole edilen plazmid DNA konsantrasyonları nanodrop ile ölçülüp agaroz jelde yürütülerek kontrol edildikten sonra örnekler -20°C’ye kaldırıldı.

4.2.2.5. Klonlama Reaksiyonu Doğrulama

Klonlaması gerçekleştirilen ve elde edilen kolonilerden plazmid DNA'ların saflaştırıldığı pET30.HER3-ECD örnekleri ile pET30 plazmidine spesifik T7F-T7R primerleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi. Böylece HER3-ECD insert DNA'sının pET30 plazmidine girip girmediği kontrol edilmiş oldu. Ayrıyeten HER3 ECD plazmid DNA'larının BamHI ve Sall restriksiyon enzimleri ile kesim kontrolü gerçekleştirildi.

T7F-R Polimeraz Zincir Reaksiyonu

pET30 plazmidine spesifik T7 primerleri ile 24 µl hacminde PCR reaksiyonu aşağıda Çizelge 4.11.'de gösterilen şartlarda kuruldu.

Çizelge 4. 11. T7 F/R PCR Koşulları

Reaksiyon Bileşen Miktarları	PCR Koşulları
H ₂ O : 16,8 µl	1- 94 °C 3 dk 2- 94 °C 45 sn
10X Buffer : 2,5 µl MgCl ₂ : 1,5 µl	3- 58 °C 30 sn 4- 72°C 3dk
dNTP : 0,5 µl Taq Polimeraz : 0,2 µl	5- 72°C 10dk 6- 4°C sonsuz
pet30 T7/F : 1,25 µl pet30 T7/R : 1,25 µl	2-3-5 ; 35 döngü...

T7F: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

T7R: 5' -GCTAGTTATTGCTCAGCGG- 3'

Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

Kolonilerden izole edilen plazmid DNA'ları ile Çizelge 4.12.'de gösterilen şartlarda klonlama enzimleri ile kesim reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 4.12. RE Çift Kesim Kontrol PCR Koşulları

Reaksiyon Bileşen Miktarları	RE Çift Kesim PCR Koşulları
DNA + H ₂ O: 8 µl 10 X FD Buffer: 1 µl BamHI: 0,5 µl Sall: 0,5 µl	1- 37 °C 60 dakika 2- 80 °C 5 dakika

DNA Dizi Analizi

T7F-T7R primerleri ile Çizelge 4.11.'deki şartlarda PCR reaksiyonu gerçekleştirildi, 50 mikrolitre PCR reaksiyonu ve 10pmol/ul primerler Genolysis'e DNA dizi analizi için gönderildi.

4.2.3. REKOMBİNANT HER3-ECD PROTEİN İFADESİ

4.2.3.1. HER3-ECD Rekombinant Protein Küçük Ölçekli İndüklenmesi

-80°C'den alınan *E. coli* BL21(DE3) kompetan hücre suşlarını içeren ependorflara kesilmemiş pET30 ve seçilen kolonilerden 2 µl miniprep plazmit ürünü eklendikten sonra transformasyon gerçekleştirildi. Transforme edilen BL21.pET30, BL21.pET30.HER3-ECD#2 ve BL21.pET30.HER3-ECD#4 kolonileri LB besiyerinde 37°C, 180 rpm'de, gece boyu (14-16 saat) inkübe edilerek sıvı kültüre alındı.

Sıvı kültürde büyütülen BL21.HER3-ECD kolonileri IPTG ile indüklendi. İnkübasyona bırakılan kültürlerden 100'er µl, 5 ml LB-Kanamisin besiyeri içeren falkonlara inoküle edildi.

Hazırlanan falkonlar 28°C, 180 rpm, 2.5 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi içinde IPTG solüsyonu hazırlandı. 0,1 M stok solüsyon hazırlamak için 0,24 gram IPTG (Applichem, A4773) 9,9 ml çift distile su içerisinde çözüldü. Homojen bir şekilde hazırlanan solüsyon Minisart 0,45 µm (Cat. No: 16555) ile filtre edildikten sonra 500 µl olacak şekilde 20 adet ependorfa dağıtıldı. İnkübasyon sonrası kültürler 2.5 ml - 2.5 ml olacak şekilde ikiye bölündü. Eldeki 6 adet falkondan 3 adeti IPTG (+) olarak etiketlendi. IPTG (+) olan falkonlara 12.5 µl IPTG eklendi. Böylece 0.5 mM IPTG ile indükleme yapılmış oldu. Ardından falkonlar 28°C, 180 rpm, 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası önceden etiketlenen soğuk ependorflara sıvı kültürlerden 15'er µl eklendi ve ependorflar sıvı azota

atıldı. Sıvı azotta dondurulan hücreler -80 °C’de muhafaza edildi. HER3ECD, 6xHis tag ile füzyon halinde ifade ettirildiğinden 6X Anti-HisTaq antikor (Cell Signaling, 2365S) ile immünblotlama gerçekleştirildi.

4.2.3.2. HER3-ECD Rekombinant Protein Orta Ölçekli İndüklenmesi

Transforme edilen BL21.pET30, BL21.pET30.HER3-ECD#2 ve BL21.pET30.HER3-ECD#4 kolonileri LB besiyerinde 37°C, 180 rpm’de, gece boyu (14-16 saat) inkübe edilerek sıvı kültüre alındı. Geceboyu inkübasyona bırakılan kültürlerden 4’er ml, 100 ml LB-Kanamisin besiyeri içeren erlenmeyer flasklara inoküle edildi. Orta ölçekli sıvı kültürde büyütülen BL21.HER3-ECD kolonileri 0.5 mM IPTG ile indüklendi. Sonrasında önceden etiketlenen soğuk ependorflara sıvı kültürlerden 15’er µl eklendi ve kültürlerden pellet alındı. Sıvı azotta dondurulan hücreler -80 °C’de muhafaza edildi.

4.2.3.3. HER3-ECD Rekombinant Protein Çözünürlük Testi

1 mg lizozim, 10 ml 1X STE içerisinde hazırlanmış 5 mM imidazol ve 0,4 ml EDTA-free proteaz inhibitör karıştırıldı. Bu karışımdan 500 µl alınarak 1,5 ml bakteriyel kültürden elde edilen pellet çözündürüldü. Çözülen pellet 15 dk buz üstünde inkübe edildi. 15 dk sonunda üzerine 2,5 µl 1M DTT ve 87,5 µl %10 N-sarkozil eklendi. Tüp 3-6 kez 10’ar saniye sonike edildi. 13.000 rpm 4°C’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni ve temiz bir ependorf tüpe aktarıldı (A-çözünür fraksiyon). Elde edilen pellet 500 µl 8M üre içinde çözöldü. 1 saat 4°C’de end-over rock platformunda inkübe edildi. 13.000 rpm 4°C’de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni ve temiz bir ependorf tüpe aktarıldı. (B-üre fraksiyonu) Oluşan pellet 500 µl 1XSDS-PAGE yükleme tamponunda (1X laemni buffer) içinde çözöldü (C-çözünür olmayan fraksiyon/inklüzyon cisimcikleri). Örneklerin SDS-PAGE ile analizi için her bir fraksiyon 20 µl + 4 µl yükleme tamponu (6X Laemni Buffer) ile karıştırıldı (61).

4.2.4. REKOMBİNANT HER3-ECD SAFLAŞTIRILMASI

30 ml 1X STE Buffer, 3 mg lizozim, 1,2 ml EDTA-free proteaz inhibitör karıştırıldı. -80°C derin dondurucuda saklanmış indüklenmiş bakteriyel pellet buz üzerinde getirildi. Pelletin yavaşça ve nazik bir biçimde çözünmesi sağlandı. İlk hazırlanan solüsyondan pellet üzerine 10 ml eklendi. Pellet bu solüsyon içinde çözöndürüldü. Çözülen pellet 15 dk buz

üzerinde inkübe edildi. 15 dk sonunda pellet üzerine 50 µl 1M DTT ve 1,75 ml %10'luk N-sarkozil eklendi. Vortekslemeden pipetajla güzelce karıştırıldı. Tüp buz üzerine yerleştirildi. Sonikasyon cihazında 3 kez 30'ar saniye 3. seviye sonikasyon yapıldı. Tüp 10.000 rpm 4°C'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni 50 ml falkon tüpe aktarıldı. Süpernatant üzerine 2,75 ml %10'luk Triton-X 100 solüsyonu eklendi. Tüp vorteks ile karıştırıldı. Bu aşamada SDS-PAGE için örnek alındı. HisPure ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific, 88229) kolonlarının 15-20 dk oda ısısında bekletilerek dengelenmesi sağlandı. Bir kolon için 10 ml equilibration buffer, 20 ml wash buffer hazırlandı. Kolonun alt emzik kısmı açılarak 50 ml falkon tüpe oturtuldu. Kolon 700xg 4°C'de 2 dk santrifüj edildi. Falkon tüp boşaltıldı. Üzerine 6 ml equilibration buffer eklendi. Buffer eklendikten ve santrifüje koymadan önce kolon altından ilk damlanın geldiği gözlemlendi. Kolon 700xg 4°C'de 2 dk santrifüj edildi. Bu esnada 13 ml protein örneği üzerine 50 µl 2 mM imidazol ve 100 µl 10X PBS eklendi. Santrifüj sonrası kolonların altları emzikle kapatıldı. Üzerine protein örnekleri eklendi. Kolon soğuk odada end-over rock platforma yerleştirildi 45 dk dönerek inkübasyona bırakıldı. 45 dk sonunda kolon end-over rock platformdan alındı ve temiz 50 ml falkon tüpe oturtuldu. Kolon 700xg 4°C'de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamada santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için örnek alındı. Kalan eluat uzaklaştırıldı. Kolon üzerine yıkama için 6 ml wash buffer eklendi. Kolon 700xg 4°C'de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşama 2 kez daha tekrar edildi. Bu aşamada (3. yıkamadan sonra) santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için örnek alındı. Kalan eluat uzaklaştırıldı. Elüsyon aşamasına geçildi. Kolon yeni ve temiz 50 ml falkon tüpe oturtuldu. Üzerine 3 ml elution buffer eklendi. Kolon 700xg 4°C'de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamada (1. elüsyondan sonra) santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için ve BCA testi için örnek alındı. Kalanı Elüsyon 1 protein örneği olarak etiketlenerek buza gömüldü. Kolon yeni ve temiz 50 ml falkona oturtuldu. Üzerine 3 ml elution buffer eklendi. Kolon 700xg 4°C'de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamada (2. elüsyondan sonra) santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için ve BCA testi için örnek alındı. Kalanı Elüsyon 2 protein örneği olarak etiketlenerek buza gömüldü. Kolon yeni ve temiz 50 ml falkona oturtuldu. Üzerine 3 ml elution buffer eklendi. Kolon 700xg 4 C'de 2 dk santrifüj edildi. Bu aşamada (3. elüsyondan sonra) santrifüj sonrası falkon tüpe inen eluattan SDS-PAGE için ve BCA testi için örnek alındı. Kalanı elüsyon 3 protein örneği olarak etiketlenerek buza gömüldü (61).

4.2.5. GENEL YÖNTEMLER

4.2.5.1. Kompetan Hücre Hazırlanması

BL21(DE3) (Novagen, 693873) ve DH5 α -TR1 (Invitrogen, 12297016) stok bakteri suşlarından kompetan hücre hazırlandı.

Bunun için 2 adet 50 ml'lik falkon LB içinde DH5 α ve LB içinde BL21(DE3) şeklinde etiketlendi. Falkonlara 10'ar ml LB besiyeri eklendi. -80 dolabından DH5 α ve BL21(DE3) stokları çıkarıldı ve stoklar 10 μ l'lik pipetle, pipetin ucunu değdirerek katı haldeyken alındı ve LB içine eklendi. Hazırlanan hücreler çalkalamalı inkübatörde 180 rpm, 37 °C'de gece boyu (14-16 saat) inkübasyona bırakıldı. Gece boyu inkübe edilen hücreler alındı ve parafilmleli buza gömüldü. Bu aşamadan itibaren aseptik olarak çalışıldı. 500 ml'lik iki adet flask içerisine 100'er ml LB besiyeri koyuldu. Flasklardan birine 1 ml BL21(DE3), diğerine 1 ml DH5 α -TR1 serolojik pipetle eklendi ve flasklar 2 saat 30 dk, 180 rpm, 37 °C'de inkübe edildi. Süre sonunda hücre kültürlerinden 1'er ml alınarak Bio-Rad SmartSpec spektrofotometre cihazında OD ölçümü yapıldı. OD₆₀₀ değeri 0.2-0.4 arasına gelineye dek inkübasyona devam edildi. Santrifüj için hücreler 2'şer falkona bölündü ve falkonlar 4700 rpm'de, 15 dk, 4 °C'de santrifüjlendi. 4 falkona 50'şer ml soğuk 0,1 M CaCl₂ eklendi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. DH5 α 1. falkondaki hücre pelleti 10 ml soğuk 0,1 M CaCl₂ ile çözüldü. Çözülen pellet 40 ml kalan 0,1 M CaCl₂ içerisine konuldu. Tekrar serolojik pipet ile 10 ml 0,1 M CaCl₂ alındı ve 2. DH5 α falkonundaki pellet çözülüp kalan 40 ml CaCl₂ içerisine eklendi. CaCl₂ ile pellet çözme işlemi aynı şekilde BL21(DE3) hücreleri için de uygulandı. Falkonlar 4700rpm, 15 dk, 4°C'de santrifüj edildi ve sonrasında süpernatantlar uzaklaştırıldı. 2 adet falkonda 9 ml soğuk 0,1 M CaCl₂ içerisine soğuk 1 ml glycerol eklenerek hazırlanmış olan soğuk 10 ml CaCl₂+Glycerol karışımı ile pelletler çözüldü. Sonrasında ilgili hücreler buza gömülmüş 1.5ml'lik ependorflara 100'er μ l olacak şekilde paylaştırıldı. Ependorflar 30 dk buz üzerinde bekletildikten sonra etiketli bir şekilde -80°C'ye kaldırıldı.

4.2.5.2. Bakteriyel Transformasyon

Ligasyon ürünlerinin tamamı -80°C'den alınan DH5 α -TR1 kompetan hücre suşlarını içeren ependorflara ayrı ayrı olarak eklendi. Tüpler 30 dakika buz üzerinde inkübe edildi ve ardından 42°C su banyosunda 30 sn ısı şoku uygulandı. Tüpler buz üzerinde 2 dakika

inkübe edildi. Tüplere 1'er ml LB besiyeri eklendikten sonra 37°C, 180 rpm'de, 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi. LB-Agar-Kanamycin petri kapları soğuk odadan alındı ve şu şekilde etiketlendi: DH5α + Kesilmemiş PET30, DH5α +PET30/BamHI, DH5α +PET30/Sall, DH5α +ddPET30, DH5α +ddPET30+ddHER3-ECD. İnkübasyon sonrası 13.000 rpm'de, 1 dakika santrifüj yapıldı. 900 µl hacminde supernatan uzaklaştırıldıktan sonra geriye kalan 100 µl ile pellet çözüldü. Aseptik ortamda cam drigalski baget ile kültürlerin LB-Agar-Kanamycin petrilerine ekim işlemi gerçekleştirildi. Petri kapları 37°C' de gece boyu (14-16 saat) ters çevrilerek inkübe edildi.

4.2.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri (New England Biolabs, B7021S) yükleme boyası ile birlikte %0.8-1'lik agaroz jelde 1XTBE tamponu ile koşturuldu. Klonlama protokolü boyunca 100 bç DNA ladder (Thermo Scientific, SM0321) ve 1 kb DNA ladder (NewEnglandBiolabs, N3232S) kullanıldı.

4.2.5.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Bakteri kültürleri / protein lizatları %0.5 B-merkaptotanol eklenmiş Laemmli tamponu eklenerek 85 °C'ye ayarlı ısı bloğunda 5-10 dakika denatüre edildi. BioRad Any kDa hazır jeller 1X Koşturma Tamponu kullanıldı. Hazır jelin kuyucukları enjektör vasıtasıyla tampon ile yıkandı. Örnekler jele yüklendi ve 100V, 60 dakika koşturuldu.

4.2.5.5. İmmünblotlama

Jelden membrana transfer için Bio-Rad Trans-Blot Turbo cihazı kullanıldı. Transfer işlemi için öncelikle membran metanol içinde 30 saniye kadar yıkandı. 1X Transfer Tamponu içeren bir kapta 14 adet filtre kağıdı ıslatıldı. Cihazın haznesinin alt kısmına ıslatılan filtre kağıtlarından 7 adeti yerleştirildikten sonra 1X Transfer Tamponu ile yıkanan membran filtre kağıtlarının üzerine yerleştirildi. Membranın üzerine jel yerleştirildikten sonra diğer 7 adet filtre kağıdı jelin üzerine konuldu. Transfer düzeneği kurulurken her aşamada merdane ile hava kabarcıklarının uzaklaştırılmasına dikkat edildi. Cihaz haznesindeki arta kalan sıvı uzaklaştırıldıktan sonra transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer işlemi sonrası membran 25 ml % 5 BSA solüsyonu içeren cam bir kaba koyuldu ve oda ısısında, orbital çalkalayıcıda, 1 saat boyunca inkübe edildi. Bloklama sonrası membran üzerindeki BSA

solüsyonu uzaklaştırıldı. 6X HisTaq antikoru (2365S) % 5 BSA solüsyonu içerisinde 1/1000 dilüsyonda (10 ml BSA, 10 µl antikor) hazırlandı ve membranın üzerine eklendi. Soğuk odada (+4 °C) orbital çalkalayıcı cihazında gece boyu inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası membran 25 ml 1X-TBST ile 10 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda yıkandı. Membran yıkama işlemi toplamda 3 defa yapıldı. 35 ml BSA solüsyonu içerisine 3,3 µl Beta Actin HRP (ab630394) eklenerek sekonder antikor hazırlandı. Hazırlanan sekonder antikor membran üzerine eklendi ve oda ısısında karanlıkta, orbital çalkalayıcı cihazında 1,5 saat inkübasyon yapıldı. İnkübasyonun ardından membran 25 ml 1X-TBST ile 10 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda yıkandı. Membran yıkama işlemi toplamda 3 defa yapıldı. Görüntüleme işlemi LI-COR Odyssey cihazında yapıldı. Görüntüleme için WesternBright-Sirius Kiti (Cat. No: K-12043-D10) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan WesternBright-Sirius ve WesternBright-Peroxide bileşenlerinden 750'şer µl alınarak ependorf tüpte karıştırıldıktan sonra membranın üzerine eklendi ve görüntüleme yapıldı.

4.2.5.6. Coomassie Blue Boyaması

SDS-PAGE ile yürütülen jel temiz ve boş cam kaba alındı. Jelin üzerine 20 ml fiksasyon solüsyonu (%40 ddH₂O, %10 asetik asit, %50 methanol) eklendi. 45 dk oda ısısında orbital çalkalayıcıda düşük devirde inkübe edildi. Ardından jel üzerinden fiksasyon solüsyonu uzaklaştırıldı. Jel üzerine 20 ml coomassie blue boya solüsyonu (%40 ddH₂O, %10 asetik asit, %50 methanol, %0,25 Coomassie Brilliant Blue R-250) eklendi. Kabin ağzı hava almayacak şekilde kapatılıp, +4 °C'de orbital çalkalayıcıda düşük devirde gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün boya jel üzerinden uzaklaştırıldı. Jel, oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde berraklaşana kadar boya giderici solüsyon (%67,5 ddH₂O, %7,5 asetik asit, %25 methanol) ile yıkandı. Bantlar belirginleşince jel fotoğraflandı (61).

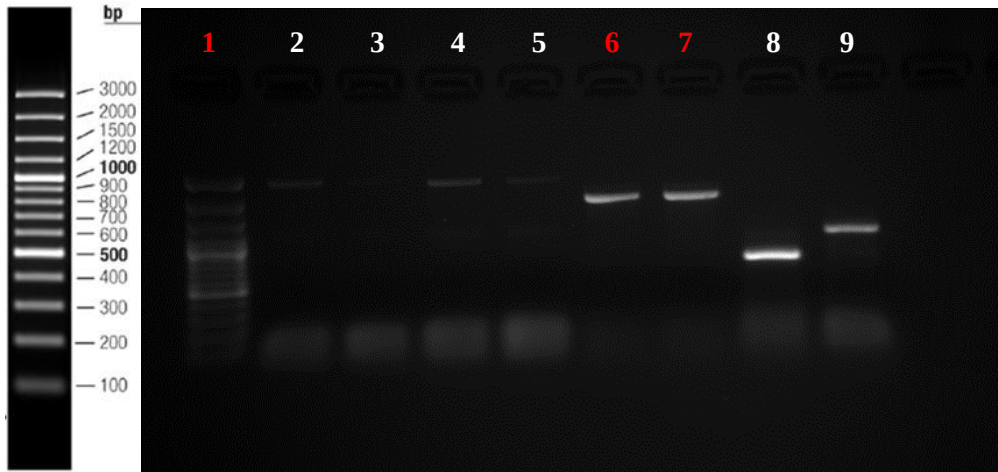
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

HER3'ü yüksek seviyede ifade ettiği bilinen SKBR-3 ve CaCO2 hücrelerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak HER3-ECD-F ve HER3-ECD-R primerleri ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Agaroz jelde yürütülüp görüntülenen PCR örnekleri sonucuna dayanarak istenen bölgede belirgin bir şekilde daha parlak band gözlenen, SKBR-3 cDNA'sı ile klonlama işlemine devam edilme kararı verildi.

5.1. ANTİJENİK BÖLGE BELİRLENMESİ VE ÇOĞALTILMASI

1342 amino asitlik HER3'ün (Uniprot P21860-1), 20-643 aminoasitlerden oluşan 1869 baz çifti tarafından kodlanan hücre dışı alanı (ECD) rekombinant protein üretimi için antijenik bölge olarak belirlendi. SKBR-3 hücre hattından RNA elde edildi, cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA kalıp DNA olarak kullanılarak HER3-ECD bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldı.

Agaroz jele 5 µl PCR ürünü ve 1 µl yükleme boyası (NewEngland Biolabs, B7021S) yüklendi ve PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 5 µl 100bp marker (ThermoScientific, SM0321) ile birlikte 80V, 45 dk koşturuldu. Agaroz jelde görüntüleme sonrası HER3 hücre dışı alanının (ECD) PCR ile çoğaltıldığı gözlemlendi (Şekil 5.1.).

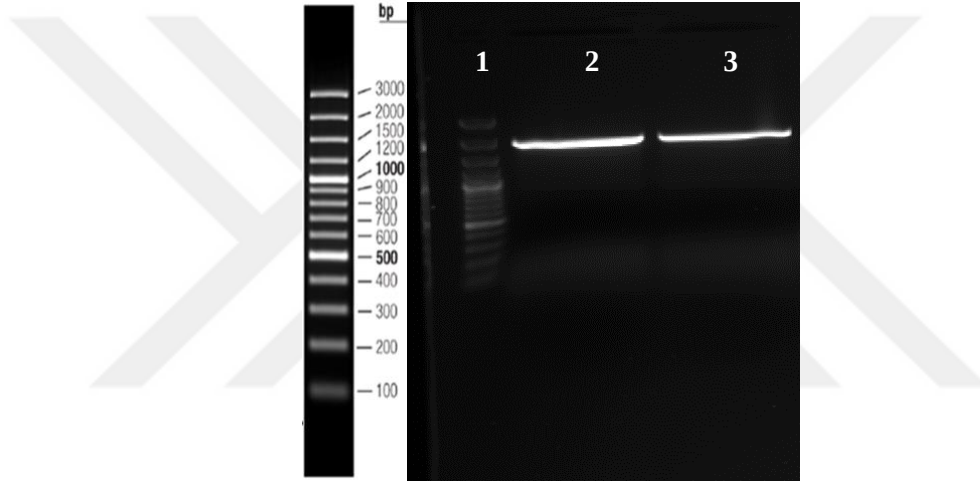


Şekil 5.1. HER3-ECD PCR Ürününün Agaroz Jel Görüntüsü. Kuyu 1, 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific #SM0321); kuyu 6-7, HER3-ECD PCR ürünü.

5.2. HER3 HÜCRE DIŞI ALANIN PET30(A)+ İFADE PLAZMİDİNE KLONLANMASI

5.2.1. HER3-ECD'İN PCR İLE AMPLİFİKASYONU

SKBR-3 meme kanseri hücre hattından total RNA izolasyonunu takiben elde edilen cDNA kalıp DNA olarak kullanılarak HER3-ECD bölgesi PCR ile çoğaltıldı. BamHI ve SalI restriksiyon enzim kesim bölgelerinin de dahil edildiğı primerler ile 1869 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edildi. Agaroz jele 45 µl PCR ürünü ve 9 µl yükleme boyası (NewEngland Biolabs, B7021S) yüklendi ve PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 4 µl 100bp marker (ThermoScientific, SM0321) ile birlikte 80V, 60dk koşturuldu (Şekil 5.2.).

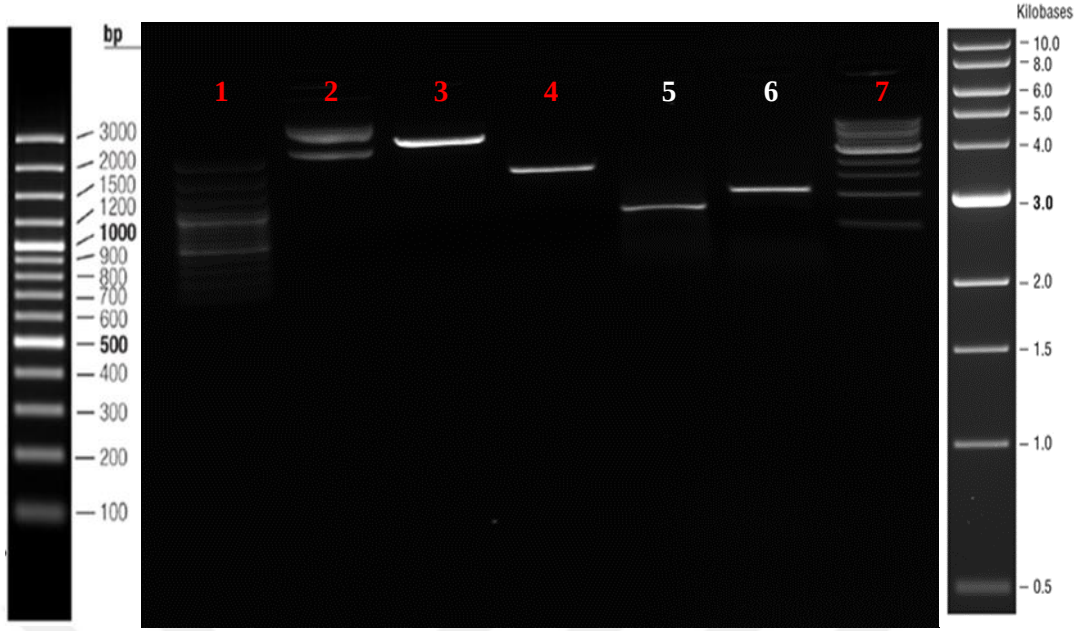


Şekil 5.2. HER3-ECD PCR Saflaştırma Ürününün Agaroz Jel Görüntüsü. Kuyu 1, 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific #SM0321). Kuyu 2-3, HER3-ECD PCR ürünü.

Elde edilen HER3-ECD PCR ürünleri jelden bantlar kesilerek saflaştırılmış ve saflaştırılan ürünler restriksiyon enzim kesim reaksiyonunda kullanılmıştır.

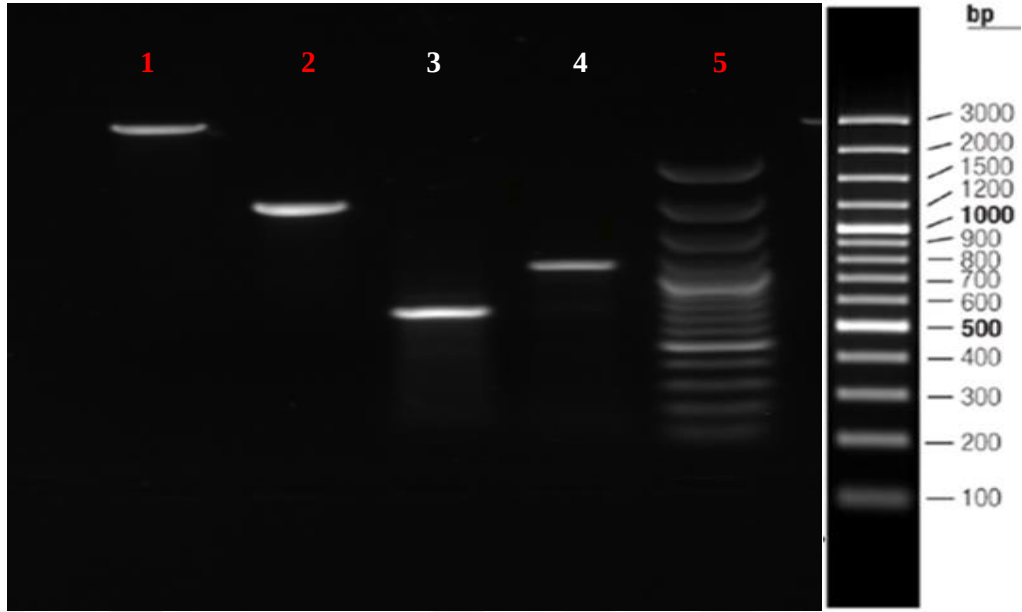
5.2.2. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİM

Saflaştırılmış HER3 ECD PCR ürünü ve pET-30a(+) plazmid DNAsı BamHI ve SalI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Elde edilen kesim ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra DNA fragmentlerinin büyüklükleri UV ışık altında doğrulandı. Sonrasında Şekil 5.3.'de verilen agaroz jelden sırasıyla 3. ve 4. kuyulara yüklenen plazmid ve insert bantları kesilerek saflaştırıldı.



Şekil 5.3. Restriksiyon Enzim Kesimi Agaroz Jel Görüntüsü. Kuyu 1, 100 bç DNA ladder (Thermo Scientific #SM0321); kuyu 2, kesilmemiş pET30; kuyu 3, pET30- BamHI/Sall; kuyu 4, HER3-ECD - BamHI/Sall; kuyu 7, 1000 bç DNA ladder (NewEnglandBiolabs #N3232S).

Şekil 5.4.'te agaroz jelden saflaştırılan enzim kesim ürünlerin ligasyon öncesi saflaştırma kontrolü agaroz jel görüntüsü verilmiştir. 8 µl'si %1'lik agaroz jele yüklenen örnekler 80V, 40dk koşturulmuştur.



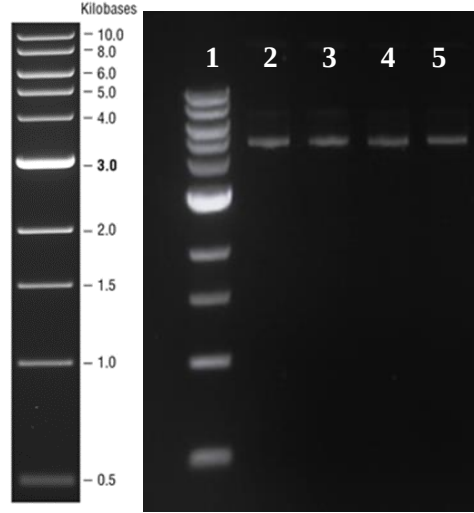
Şekil 5.4. Ligasyon Öncesi Saflaştırma Kontrolü Agaroz Jel Görüntüsü. Kuyu 1, pet30-BamHI/Sall; kuyu 2, HER3-ECD - BamHI/Sall; kuyu 5, 100 bç DNA ladder (Thermo Scientific #SM0321).

5.2.3. LİGASYON VE TRANSFORMASYON

Jelden saflaştırılan pET30 plazmid DNA ve HER3-ECD PCR kesim ürünleri ile ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve ligasyonu takiben reaksiyon ürünleri kompetan *E. coli* DH5 α -TR1 klonlama suşuna transforme edilmiştir.

5.2.4. KOLONİLERDEN PLAZMİD DNA İZOLASYONU

Transformasyon sonrası seçilen koloniler LB besiyeri sıvı kültüründe büyütüldükten sonra kolonilerden plazmid DNA elde edilmiş ve örnekler %1'lik agaroz jelde 80 V, 45 dk yürütülmüştür (Şekil 5.5.).

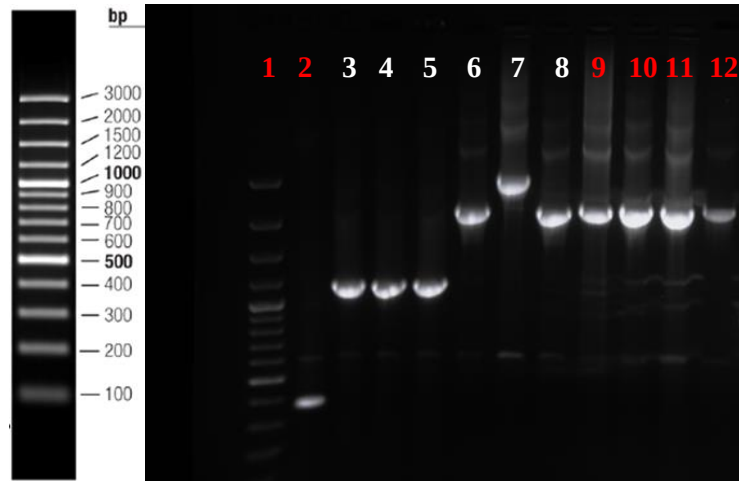


Şekil 5.5. Kolonilerden Plazmid DNA İzolasyonu. Kuyu 1, 1000 bç DNA ladder (NewEnglandBiolabs #N3232S); kuyu 2, pET30.HER3ECD/Koloni 1; kuyu 3, pET30.HER3ECD/Koloni 2; kuyu 4, pET30.HER3ECD/Koloni 3; kuyu 5, pET30.HER3ECD/Koloni 4.

5.2.5. HER3-ECD KLONLAMA KONTROLÜ

5.2.5.1. T7 Primerleri ile İnsert Kontrolü

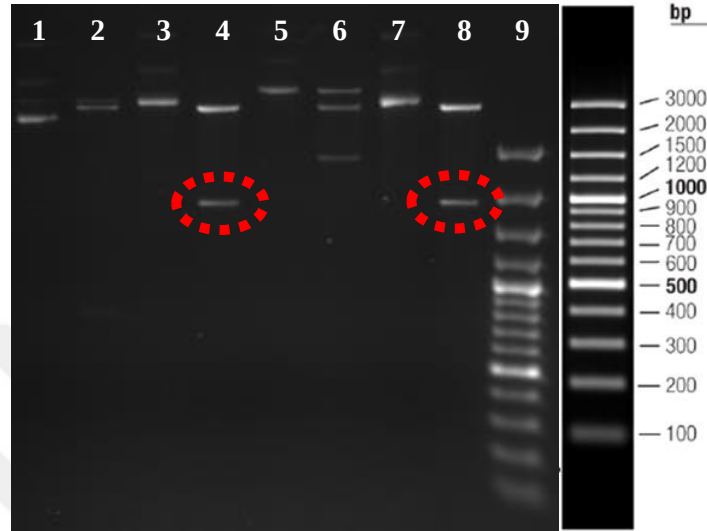
Kolonilerden izole edilen plazmid DNA'larında HER-ECD varlığının kontrolü için pET30 plazmidine özgül T7 primerleri ile PCR gerçekleştirilmiş ve koloniler 1, 2, 3 ve 4'te beklenen 2199 bç PCR ürünü gözlenmiştir. Boş pET30 için beklenen fragman ise 340 bç olarak gözlenmektedir (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. T7 Primerleri ile İnsert Kontrolü. Kuyu 1, 100 bç DNA ladder (Thermo Scientific #SM0321); kuyu 2, kesilmemiş pET30; kuyu 9, pET30.HER3ECD/Koloni 1; kuyu 10, pET30.HER3ECD/Koloni 2; kuyu 11, pET30.HER3ECD/Koloni 3; kuyu 12, pET30.HER3ECD/Koloni 4.

5.2.5.2. Restriksiyon Endonükleaz Kesim Kontrolü

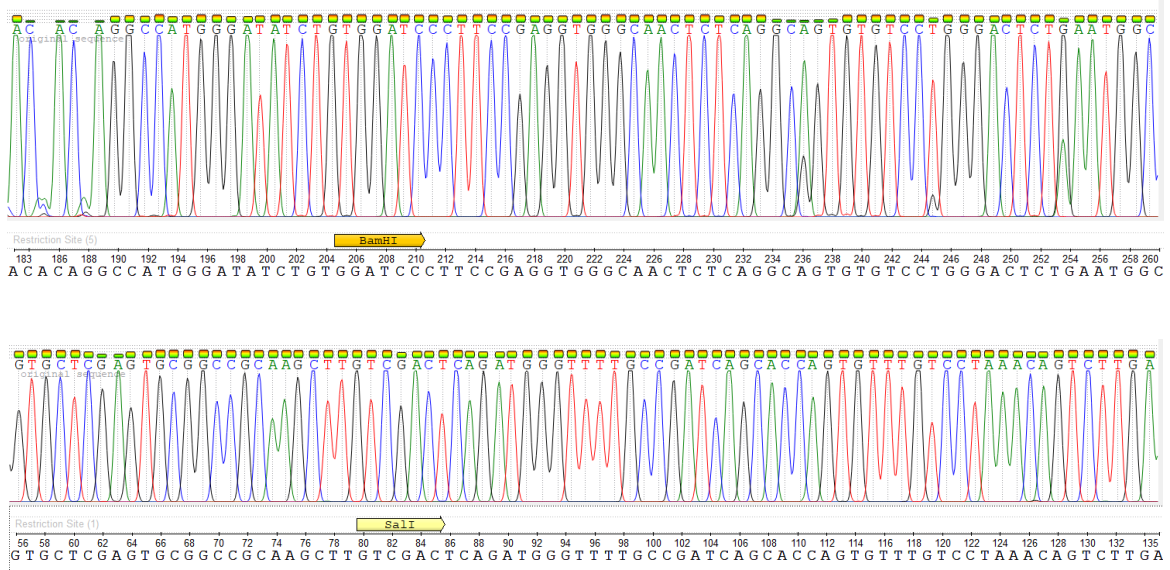
HER3 ECD inserti doğrulanan plazmid DNA'larının BamHI ve SalI restriksiyon enzimleri ile kesim kontrolü gerçekleştirilmiştir. Kesim sonrasında 2. ve 4. kolonilerde beklenen insert fragmentleri gözlenmiştir (Şekil 5.7.).



Şekil 5.7. HER3-ECD Kolonilerinin Restriksiyon Enzim Kesim Kontrolü. Kuyular 1,3,5,7, kesilmemiş HER3ECD Kolonileri 1-4; Kuyular 2,4,6,8, kesilmiş HER3ECD Kolonileri 1-4; Kuyu 9, 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific #SM0321).

5.2.5.3. DNA Dizi Analizi

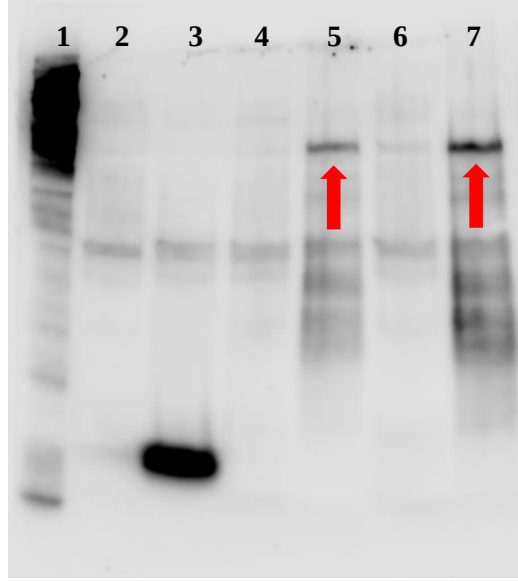
HER3 ECD 4 numaralı koloniye ait PCR ürünleri DNA dizi analizi ile incelenmiştir. Şekil 5.8.'de üst tarafta T7-F primeri ile okunan dizinin, alt tarafta ise T7-R primeri ile okunan dizinin kromatogram görüntüleri verilmiştir. HER3-ECD hedef dizisi başarıyla çoğaltılmış ve BamHI ve SalI restriksiyon enzim kesim dizileri arasında yer alan HER3-ECD dizisinin pET30(a)+ plazmidine başarıyla klonlandığı görülmüştür. Klonlanan DNA dizi verileri ile hedef DNA dizisi arasında çoklu hizalama gerçekleştirilerek HER3-ECD dizisi doğrulanmıştır. Ek 3'te ve Ek 4'te BLAST analizi sonuçları verilmiştir.



Şekil 5.8. DNA Dizi Analizi Sonucu.

5.3. REKOMBİNANT HER3-ECD PROTEİN İFADESİNİN İNDÜKLENMESİ

BamHI ve SalI restriksiyon enzim kesim sonuçlarına dayanarak HER3-ECD#2 ve HER3-ECD#4 numaralı koloniler *E. coli* BL21(DE3) protein ifade suşuna transforme edildi. Transformasyon sonrası seçilen kolonilerin bakteri kültürleri 28°C’de, 0.5 mM IPTG ile rekombinant protein ifadesi için indüklendikten sonra immüblotlama analizi için kullanıldı. HER3ECD, 6xHis tag ile füzyon halinde ifade ettirildiğinden anti-histaq antikor ile immüblotlama gerçekleştirildi. IPTG ile indüklenen BL21.pET30+HER3ECD#2 ve BL21.pET30+HER3ECD#4 koloni kültürlerinde beklenen 77 kDa’luk bant gözlenmiştir. İmmüblotlama sonrası 4 numaralı kolonide daha belirgin bant görülmesi sebebiyle protein çözünürlük ve protein saflaştırma aşamalarında bu koloni kullanılmıştır.

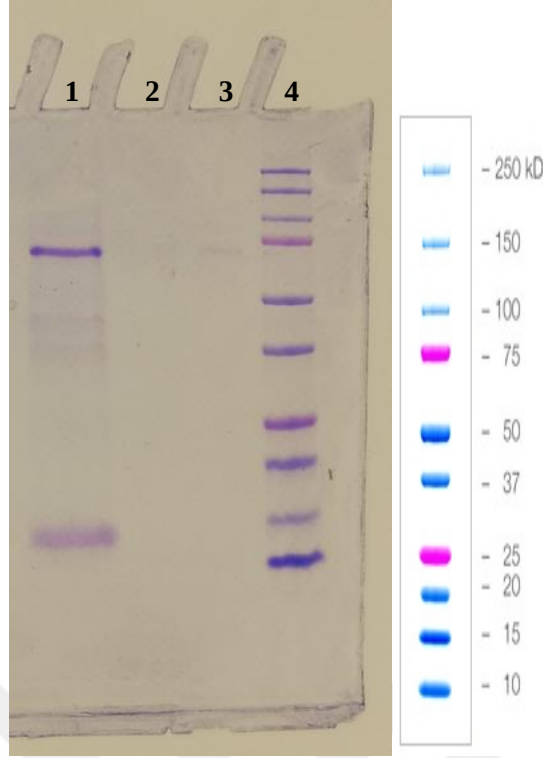


Şekil 5.9. HER3-ECD Protein İfadesinin İmmünblotlama ile Analizi. Kuyu 1, Protein ladder (Bio-Rad #1610374); kuyu 2, BL21.pET30 (-IPTG); kuyu3, BL21.pET30 (+IPTG); kuyu 4, BL21.pET30+HER3ECD#2 (-IPTG); kuyu 5, BL21.pET30+HER3ECD#2 (+IPTG); kuyu 6, BL21.pET30+HER3ECD#4 (-IPTG); kuyu 7, BL21.pET30+HER3ECD#4 (+IPTG).

5.3.1. HER3-ECD REKOMBİNANT PROTEİN ÇÖZÜNÜRLÜK TESTİ

6xHis Tag ile füzyon halinde ifade ettirilen HER3-ECD proteinin çözünürlüğü test edilmiştir. pET-30a.HER3ECD#4 plazmidi BL21(DE3) ifade suşunda IPTG ile indüklenerek ifade ettirilmiştir. SDS-PAGE ile çözünürlük testi ile elde edilen çözünür fraksiyon, ürede çözünen fraksiyon ve çözünür olmayan fraksiyon ayrıştırılmıştır. Ayrıştırma işlemi sonrasında jel Coomassie Blue ile boyanmıştır.

Şekil 5.10.'daki çözünürlük testi sonucuna göre ifade ettirilen HER3-ECD rekombinant proteinin çözünür fraksiyonda yer aldığı gözlenmiştir (kuyu7).

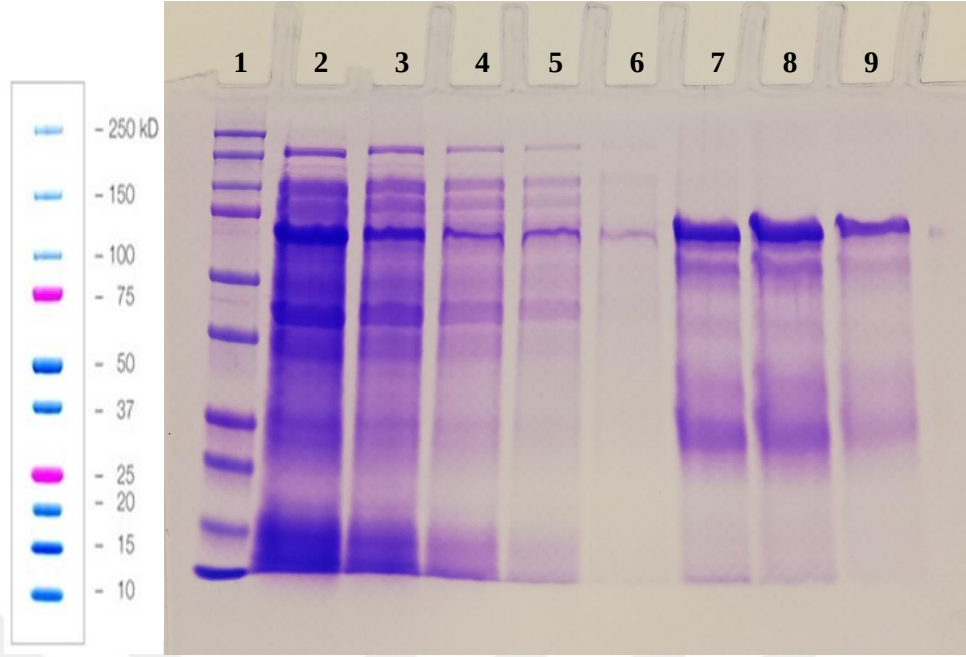


Şekil 5.10. HER3-ECD Rekombinant Proteininin Protein Çözünürlük Testi (Coomassie Blue Boyaması). Kuyu 1, BL21.pET30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Çözünür fraksiyon); kuyu 2, BL21.pET30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Üre çözünür fraksiyon); kuyu 3, BL21.pET30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Çözünmeyen fraksiyon); kuyu 4, Protein ladder (Bio-Rad #1610374).

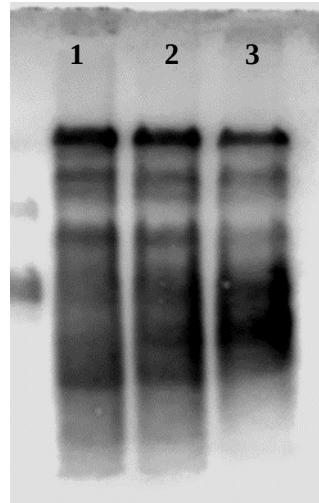
5.4. REKOMBİNANT HER3-ECD SAFLAŞTIRILMASI

Orta ölçekte üretilip IPTG ile indüklenen HER3-ECD/Koloni 4 bakteri kültüründen rekombinant proteinin saflaştırılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma işlemi boyunca farklı aşamalarda SDS-PAGE ile analiz edilmek üzere protein örnekleri ayrılarak etiketlenmiştir. Sonrasında bu örnekler SDS-PAGE ile jelde ayrıştırılmış ve Coomassie Blue ile boyanarak analiz edilmiştir.

Şekil 5.11.'deki saflaştırma sonucuna göre 7, 8 ve 9 numaralı kuyularda 77 kDa civarında gözlenen bantlar rekombinant olarak üretilen HER3-ECD proteindir. Aynı örnekler - elusyon 1,2,3- immunblotlamada anti-histaq antikoru ile analiz edilmiş ve 77 kDa'da belirgin bant gözlenmiştir (Şekil 5.12.).



Şekil 5.11. Rekombinant HER3-ECD Saflaştırılması (Coomasie Blue Boyaması). Kuyu 1, Protein ladder (Bio-Rad #1610374); kuyu 2, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Total hücre lizatı); kuyu 3, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Total hücre lizatı, rezin sonrası); kuyu 4, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Hücre lizatı 1.yıkama sonrası); kuyu 5, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Hücre lizatı 2.yıkama sonrası); kuyu 6, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Hücre lizatı 3.yıkama sonrası); kuyu 7, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Elusyon 1); kuyu 8, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Elusyon 2); kuyu 9, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Elusyon 3).



Şekil 5.12. Rekombinant HER3-ECD Saflaştırılması Sonrası İmmünblotlama Analizi. Kuyu 1, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Elusyon 1); kuyu 2, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Elusyon 2); kuyu 3, BL21.pet30+HER3ECD#4 (+IPTG) - (Elusyon 3).

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

EGFR reseptör ailesi hücre büyümesi ve hücre farklılaşması süreçlerinin ana düzenleyicisidir ve bu ailedeki herhangi bir bozukluk çeşitli kanserlere yol açabilmektedir. Yaygın olarak incelenen HER1 ve HER2'nin aksine HER 3, inaktif kinaz alanına sahip olması nedeniyle uzun bir süre ihmal edilmiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar HER3'ün sinyalizasyondaki rolünü göstermiş ve çeşitli klinik çalışmalarla önemini gözler önüne sermiştir (62). HER3'ün farklı ECD alt alanlarında yer alan epitopların, ligand bağlanması ve reseptör dimerizasyonu üzerindeki etkileri nedeniyle biyolojik olarak önemli olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu epitopların hedeflenmesi, hedefe yönelik tedavi için çok önemlidir. HER3'e karşı geliştirilen mAb'lar belirli bir alt alan içindeki belirli bir epitopu tanır ve bu epitopa rastgele bağlanır ve böylece HER3'ün aşağı akış sinyal fonksiyonunu etkiler. Ancak üretilen bu mAb'lardan şimdiye kadar hiçbirisi terapötik onay almamıştır (63).

HER 3, HER2 için tercih edilen bir dimerizasyon ortağıdır ve bu da onu EGFR ailesindeki en aktif heterodimer yapmaktadır. Bu nedenle HER3 hedefli terapötiklerin geliştirilmesi, HER3 aşırı ifade eden birçok kanser tedavisi için umut vericidir. HER2'ye yönelik trastuzumab ve pertuzumab gibi terapötik antikorların başarılı bir şekilde geliştirilmesi, ECD'i hedeflemenin güçlü ilaçları tanımlamak için uygun bir strateji olduğunu ortaya koymaktadır (64).

Genel olarak kinaz inhibitörleri tarafından onkojenik sinyalleme hedeftenmesiyle alternatif bir yolağın aktivasyonu gibi birincil ve kazanılmış dirençler nedeniyle optimal klinik tepkiler elde edilememektedir. Bu nedenle HER-3 pozitif tümör, HER-3 reaktif T hücreleri tarafından öldürülürken c-Met, EGFR veya HER-2 gibi diğer sinyal yollarını aktive eden HER-3 negatif tümörün hala hayatta kalabileceği ve ana popülasyon haline gelebileceği varsayılabilmektedir (65). Her ne kadar EGFR ve HER2 hedefli tedavi, sırasıyla EGFR ve HER2 aşırı eksprese eden malignitelerde önemli bir aktiviteye sahip olsa da terapinin devamında tedaviye yanıt verenlerde terapötik direnç ve ilerleme en nihayetinde gelişmektedir. Elde edilen veriler HER3'ü ve daha spesifik olarak EGFR/HER3 ve HER2/HER3 heterodimerlerini bu direncin aracıları olarak göstermektedir

(66). Epidermal büyüme faktörü reseptörü ailesi içindeki kapsamlı çapraz konuşma HER3'ün hedeflenmesinin PI3K/Akt yolunun etkin bir şekilde inhibisyonu için gerekli olabileceğini ve HER3 hedefleme ajanlarının diğer reseptörleri hedef alan kombinasyon terapileri için oldukça uygun olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle HER3 hedefleyen mAb'ların birçoğu örneğin trastuzumab, pertuzumab, setuksimab ve erlotinib ile kombinasyon halinde klinik deneylerde halen değerlendirilmektedir (43). Monoklonal antikorlar EGFR ailesi arasındaki heterodimerizasyonları inhibe edici bir mekanizmaya sahip olsa da trastuzumab HER2/HER3 heterodimerine karşı etkisizdir, trastuzumab/pertuzumab kombinasyonlarına direnç gelişmekte ve HER1 için pertuzumaba muadil bir mAb bulunmazken anti-HER3 mAb'lar ise ticari olarak mevcut değildir. Bu bağlamda HER3 aşağı yönlü sinyal yolunun inhibe edilmesiyle HER3 heterodimerleri aracılığıyla gerçekleşen sinyallemenin engellenmesi büyük önem arz etmektedir (67). Son yıllarda yapılan çalışmalar, anti-HER3 mAb'ların küçük molekül inhibitörlerine veya diğer EGFR ailesi üyelerine yönelik monoklonal antikorlara dirençli tümörlere saldırmak için kombinasyon halinde kullanılabileceği argümanını desteklemektedir. Geliştirilmekte olan anti-HER3 antikorlarının sayısı bu hedefin geçtiğimiz yıllar içinde ulaştığı önemi ve bunların terapötik etkilerine ilişkin yüksek beklentiyi açık bir şekilde göstermektedir (68).

HER3'e karşı geliştirilen monoklonal antikorların çoğu uygun toksisite profilleri göstermiş olsa da bu antikorların tek ajan olarak aktivitesi kısıtlıdır. Klinik deneylerde bu antikorların güvenlik profilleri kabul edilebilir bulunmuş, tolere edilebilir oldukları gösterilmiş olsa da klinik etkinlikleri beklentileri karşılamayarak hayal kırıklığı yaratmıştır. Klinik kullanım için Patritumab ve Seribantumab gibi HER3 antikorlarının ise tek ajan olarak gelişimi durdurulmuştur.

HER3 monoklonal antikor tedavilerinin başarısız olması yanlış antikor epitoplarının kullanımı, farmakokinetik problemler veya biyobelirteç eksikliği gibi önemli parametrelerden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca klinik olarak değerlendirilen anti-HER3 antikorlarının çoğu ligand bağlanmasını inhibe etmekte ve sadece nörogulin kaynaklı tümör büyümesini önleyebilmektedir. Bundan dolayı anti-HER3 monoklonal antikorları HER3'ün liganddan bağımsız bir şekilde aktive edildiği tümörlere karşı etkisiz olabilir. Bunlara ek olarak HER3'ü tek başına hedeflemek kanser hücresi sinyalini tamamen inhibe etmek için yeterli olmayabilir. HER3 ve diğer epidermal büyüme faktörü reseptörlerini

hedefleyen veya hormonal terapi, kemoterapi, immünoterapi ve radyoterapi ile kombinasyon tedavisi de terapötik etkiyi artırabilir.

Kanser hastalarının yaşam kalitesi ve sağ kalım süresinin arttırılabilmesi için mevcut anti-HER3 monoklonal antikorlarının oluşturduğu klinik yanıtlar ve diğer EGFR aile üyeleri hedefli tedavilerde HER3 kaynaklı terapötik direncin aşılabilmesi hususu da dikkate alındığında daha etkili anti-HER3 monoklonal antikorların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

HER3 ekstraselüler alanı, ligand bağlanmasının özgüllüğünü belirleyen iki sistein açısından zengin bölge (II ve IV) ve iki yan bölge (I ve III) içeren dört alt alandan (I-IV) oluşmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda HER3 ekstraselüler alanda epitop bölgesi olarak I ve III arasına lokalize ISU104, II ve III arasına lokalize KTN3379, ve II ve IV arasına lokalize Elgemtumab gibi anti-HER3 mAb'ları klinik olarak test edilmiş ancak istenen seviyedeki terapötik etkinliği gösterememiştir.

Bu tez çalışmasında tam uzunluktaki HER3 hücre dışı alanına (I-II-III-IV) karşı rekombinant protein üretilmiştir. HER3 hücre dışı alanını tamamen kodlayan, 20-643 amino asit aralığına karşılık gelen 1869 nükleotidlik klonlanan dizinin bütünlüğü ve klonlamanın doğruluğu DNA dizi analizi yöntemiyle, enzim kesim reaksiyonlarıyla ve T7 polimeraz zincir reaksiyonu ile kontrol edilmiştir. Üretilen rekombinant protein bir sonraki çalışmada yeni ve özgün anti-HER3 monoklonal antikor geliştirilmesi için antijen olarak kullanılacaktır.

6.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında 1869 nükleotid uzunluğundaki HER3 hücre dışı alanı (ECD) pET-30a(+) ifade plazmidine transforme edilerek *Escherichia coli* bakteri suşlarında klonlanmış ve ifade edilmiştir.

pET-30a(+) çoklu klonlama bölgesinin 5'ucunda 6xHistaq kodlamaktadır. Böylece HER3-ECD proteini 6xHis taq ile N-terminal füzyon proteini olarak saflaştırılabilmektedir. *Escherichia coli*'de 6xHis taq füzyonlu rekombinant antijeni ifade edebilmek için HER3-ECD pET-30a(+) plazmitine klonlanmıştır. Klonlama için *E.coli* DH5 α -TR1 bakteri suşu kullanılmıştır.

Rekombinant 6xHistaq-HER3ECD protein *E. coli* BL21(DE3)'de ifade edilmiş ve IPTG indüksiyonunun ardından 6xHis antikoruna karşı immünoelotlamada beklenen 77 kDa bant gözlenmiştir. Küçük ölçekli indüklemeye gözlenen degradasyonun direkt olarak bakteri kültürünün jele yüklenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Rekombinant protein ifade ettirilmesi sonrası 6xHistaq-HER3ECD proteininin çözünürlük testi yapılmıştır. Çözünürlük testi sonucunda çözünür fraksiyon, ürede çözünen fraksiyon ve çözünür olmayan fraksiyon SDS-PAGE ile jelde ayrıştırılmıştır. 77 kDa büyüklüğündeki HER3 ECD çözünür fraksiyonda gözlenmiştir.

Rekombinant HER3ECD'nin çözünebilir olduğunun görülmesinin ardından saflaştırma için orta ölçekte üretim gerçekleştirilmiştir. Rekombinant His-etiketli proteinlerin saflaştırması için Ni-NTA rezin ile lizozim ve proteaz inhibitörleri kullanılarak orta ölçekli saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma sonrası protein örnekleri SDS-PAGE ile jelde yürütülmüş ve önce coomassie blue boyama ile çeşitli fraksiyonlar analiz edilerek HER3ECD saflaştırıldığı gözlenmiştir. Ardından elusyon örnekleri immünoelotlama ile de analiz edilmiş ve beklenen 77 kDa olarak belirgin bant gözlenmiştir. Altta degrede fragmentler gözlenmekle birlikte, protein indüklemeye ve saflaştırma sırasında gerçekleştirilecek pek çok optimizasyon ile bu fragmentlerin oluşmayacağına inanılmaktadır. Büyük ölçekte saflaştırma öncesi optimize edilmesi gereken parametrelerden başlıcaları daha düşük ısılarda indüksiyon, daha az bakteri peleti ile saflaştırma, farklı ekspresyon suşu kullanımı ve IPTG konsantrasyonu optimizasyonu

olarak sayılabilir. Bu optimizasyonları takiben büyük ölçekli indükleme gerçekleştirilmeli ve mümkünse immünizasyon öncesi saflaştırma yapılmalıdır.



KAYNAKLAR

1. Zaczek A, Brandt B, Bielawski KP. The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. *Histol Histopathol*. 2005;20(3):1005–15.
2. Birtwistle MR, Hatakeyama M, Yumoto N, Ogunnaike BA, Hoek JB, Kholodenko BN. Ligand-dependent responses of the ErbB signaling network: Experimental and modeling analyses. *Mol Syst Biol*. 2007;3(144).
3. Steinkamp MP, Low-Nam ST, Yang S, Lidke KA, Lidke DS, Wilson BS. erbB3 Is an Active Tyrosine Kinase Capable of Homo- and Heterointeractions. *Mol Cell Biol*. 2014;34(6):965–77.
4. Lyu H, Han A, Polsdofer E, Liu S, Liu B. Understanding the biology of HER3 receptor as a therapeutic target in human cancer. *Acta Pharm Sin B* [Internet]. 2018;8(4):503–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2018.05.010>
5. Kol A, Terwisscha Van Scheltinga AGT, Timmer-Bosscha H, Lamberts LE, Bensch F, De Vries EGE, et al. HER3, serious partner in crime: Therapeutic approaches and potential biomarkers for effect of HER3-targeting. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;143(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.01.005>
6. Garner AP, Bialucha CU, Sprague ER, Garrett JT, Sheng Q, Li S, et al. An antibody that locks HER3 in the inactive conformation inhibits tumor growth driven by HER2 or neuregulin. *Cancer Res*. 2013;73(19):6024–35.
7. Eliseev IE, Ukrainskaya VM, Yudenko AN, Mikushina AD, Shmakov S V., Afremova AI, et al. Targeting erbb3 receptor in cancer with inhibitory antibodies from llama. *Biomedicines*. 2021;9(9):1–18.
8. Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2008 May [cited 2021 Jul 12];65(10):1566–84. Available from: [/pmc/articles/PMC3060045/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18300445/)

9. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):127–37.
10. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 1990;61(2):203–12.
11. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103(2):211–25.
12. Roskoski R. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacol Res [Internet].* 2019;139(November 2018):395–411. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.11.014>
13. Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescut NC, Aaronson SA. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors (receptor-like kinase/sequence/chromosomal mapping/expression). Vol. 86, *Biochemistry.* 1989.
14. Mishra R, Patel H, Alanazi S, Yuan L, Garrett JT. HER3 signaling and targeted therapy in cancer. *Oncol Rev.* 2018;12(1):45–62.
15. Hafeez U, Parslow AC, Gan HK, Scott AM. New insights into ErbB3 function and therapeutic targeting in cancer. *Expert Rev Anticancer Ther [Internet].* 2020;20(12):1057–74. Available from: <https://doi.org/10.1080/14737140.2020.1829485>
16. Zhang N, Chang Y, Rios A, An Z. HER3/ErbB3, an emerging cancer therapeutic target. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015;48(1):39–48.
17. Jiang N, Saba NF, Chen ZG. Advances in Targeting HER3 as an Anticancer Therapy. *Chemother Res Pract.* 2012;2012:1–9.
18. Li N, Xu Y, Zhang Y, Li G, Yu T, Yao R, et al. Biallelic ERBB3 loss-of-function variants are associated with a novel multisystem syndrome without congenital contracture. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):1–10.

19. Olayioye MA. NEW EMBO MEMBERS' REVIEW: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000;19(13):3159–67.
20. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TPJ, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003;12(3):541–52.
21. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: The biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*. 2003;284(1):54–65.
22. Li Q, Yuan Z, Cao B. The function of human epidermal growth factor receptor-3 and its role in tumors (Review). *Oncol Rep*. 2013;30(6):2563–70.
23. Black LE, Longo JF, Carroll SL. Mechanisms of Receptor Tyrosine-Protein Kinase ErbB-3 (ERBB3) Action in Human Neoplasia. *Am J Pathol*. 2019;189(10):1898–912.
24. Kiavue N, Cabel L, Melaabi S, Bataillon G, Callens C, Lerebours F, et al. ERBB3 mutations in cancer: biological aspects, prevalence and therapeutics. *Oncogene* [Internet]. 2020;39(3):487–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-019-1001-5>
25. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: Revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2009;9(7):463–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2656>
26. Campbell MR, Amin D, Moasser MM. HER3 comes of age: New insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1373–83.
27. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in humancancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489–501.
28. Miller TW, Pérez-Torres M, Narasanna A, Guix M, Stål O, Pérez-Tenorio G, et al. Loss of Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 engages

- ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer. *Cancer Res.* 2009;69(10):4192–201.
29. Liebmann C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: Paradigms of multiplicity. *Cell Signal.* 2001;13(11):777–85.
 30. Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153–83.
 31. Sithanandam G, Anderson LM. The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2008;15(7):413–48.
 32. Liu X, Liu S, Lyu H, Riker AI, Zhang Y, Liu B. Development of Effective Therapeutics Targeting HER3 for Cancer Treatment. *Biol Proced Online.* 2019;21(1):1–10.
 33. Ocana A, Vera-Badillo F, Seruga B, Templeton A, Pandiella A, Amir E. HER3 overexpression and survival in solid tumors: A meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(4):266–73.
 34. Wang Z. Chapter 1 ErbB Receptors and Cancer. Vol. 1652. 2017.
 35. Smirnova T, Zhou ZN, Flinn RJ, Wyckoff J, Boimel PJ, Pozzuto M, et al. Phosphoinositide 3-kinase signaling is critical for ErbB3-driven breast cancer cell motility and metastasis. *Oncogene.* 2012;31(6):706–15.
 36. Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, Chan E, Parikh C, Durinck S, et al. Oncogenic ERBB3 Mutations in Human Cancers. *Cancer Cell* [Internet]. 2013;23(5):603–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.04.012>
 37. Ma J, Lyu H, Huang J, Liu B. Targeting of erbB3 receptor to overcome resistance in cancer treatment. *Mol Cancer.* 2014;13(1):1–9.
 38. Bezler M, Hengstler JG, Ullrich A. Inhibition of doxorubicin-induced HER3-PI3K-AKT signalling enhances apoptosis of ovarian cancer cells. *Mol Oncol.*

- 2012;6(5):516–29.
39. Garrett JT, Olivares MG, Rinehart C, Granja-Ingram ND, Sánchez V, Chakrabarty A, et al. Transcriptional and posttranslational up-regulation of HER3 (ErbB3) compensates for inhibition of the HER2 tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):5021–6.
 40. Beji A, Horst D, Engel J, Kirchner T, Ullrich A. Toward the prognostic significance and therapeutic potential of HER3 receptor tyrosine kinase in human colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(4):956–68.
 41. Mujoo K, Choi BK, Huang Z, Zhang N, An Z. Regulation of ERBB3/HER3 signaling in cancer. *Oncotarget*. 2014;5(21):10222–36.
 42. Haikala HM, Jänne PA. Thirty years of HER3: From basic biology to therapeutic interventions. *Clin Cancer Res*. 2021;27(13):3528–39.
 43. Malm M, Frejd FY, Ståhl S, Löfblom J. Targeting HER3 using mono- and bispecific antibodies or alternative scaffolds. *MAbs*. 2016;8(7):1195–209.
 44. Colomba A, Fitzek M, George R, Weitsman G, Roberts S, Zanetti-Domingues L, et al. A small molecule inhibitor of HER3: A proof-of-concept study. *Biochem J*. 2020;477(17):3329–47.
 45. Xie T, Lim SM i., Westover KD, Dodge ME, Ercan D, Ficarro SB, et al. Pharmacological targeting of the pseudokinase Her3. *Nat Chem Biol*. 2014;10(12):1006–12.
 46. Meulendijks D, Jacob W, Martinez-Garcia M, Taus A, Lolkema MP, Voest EE, et al. First-in-human phase i study of lumretuzumab, a glycoengineered humanized anti-HER3 monoclonal antibody, in patients with metastatic or advanced HER3-positive solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2016;22(4):877–85.
 47. Schneeweiss A, Park-Simon TW, Albanell J, Lassen U, Cortés J, Dieras V, et al. Phase Ib study evaluating safety and clinical activity of the anti-HER3 antibody lumretuzumab combined with the anti-HER2 antibody pertuzumab and paclitaxel in

- HER3-positive, HER2-low metastatic breast cancer. *Invest New Drugs*. 2018;36(5):848–59.
48. Takahashi S, Kobayashi T, Tomomatsu J, Ito Y, Oda H, Kajitani T, et al. LJM716 in Japanese patients with head and neck squamous cell carcinoma or HER2-overexpressing breast or gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;79(1):131–8.
49. Reynolds KL, Bedard PL, Lee SH, Lin CC, Tabernero J, Alsina M, et al. A phase I open-label dose-escalation study of the anti-HER3 monoclonal antibody LJM716 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the esophagus or head and neck and HER2-overexpressing breast or gastric cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–11.
50. Sarantopoulos J, Gordon MS, Harvey RD, Sankhala KK, Malik L, Mahalingam D, et al. First-in-human phase 1 dose-escalation study of AV-203, a monoclonal antibody against ERBB3, in patients with metastatic or advanced solid tumors. https://doi.org/101200/jco20143215_suppl11113. 2014 May 20;32(15_suppl):11113–11113.
51. Papadopoulos KP, Adjei AA, Rasco DW, Liu L, Kao RJ, Brownstein CM, et al. Phase 1 study of REGN1400 (anti-ErbB3) combined with erlotinib or cetuximab in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), colorectal cancer (CRC), or head and neck cancer (SCCHN). https://doi.org/101200/jco20143215_suppl2516. 2014 May 20;32(15_suppl):2516–2516.
52. Duvvuri U, George J, Kim S, Alvarado D, Neumeister VM, Chenna A, et al. Molecular and clinical activity of CDX-3379, an anti-ErbB3 monoclonal antibody, in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2019;25(19):5752–8.
53. Kim M, Hur Y, Seo S, Lim H, Kim K, Sohn Y, et al. Abstract 830: ISU104, a fully human antibody targeting a specific epitope on the ErbB3, displays potent inhibition of tumor growth in multiple xenograft tumor models. 2018;830–830.

54. Juric D, Dienstmann R, Cervantes A, Hidalgo M, Jr GRB, Tabernero J, et al. Safety and Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of the First-in-Class Dual Action HER3/EGFR Antibody MEHD7945A in Locally Advanced or Metastatic Epithelial Tumors. 2017;21(11):2462–70.
55. Hill AG, Findlay MP, Burge ME, Jackson C, Alfonso PG, Samuel L, et al. Phase II study of the dual EGFR/her3 inhibitor duligotuzumab (mehd7945a) versus cetuximab in combination with folfiri in second-line ras wild-type metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2018;24(10):2276–84.
56. McDonagh CF, Huhlov A, Harms BD, Adams S, Paragas V, Oyama S, et al. Antitumor activity of a novel bispecific antibody that targets the ErbB2/ErbB3 oncogenic unit and inhibits heregulin-induced activation of ErbB3. Mol Cancer Ther. 2012;11(3):582–93.
57. Gaborit N, Lindzen M, Yarden Y. Emerging anti-cancer antibodies and combination therapies targeting HER3/ERBB3. Hum Vaccines Immunother. 2016;12(3):576–92.
58. Fitzgerald JB, Johnson BW, Baum J, Adams S, Iadevaia S, Tang J, et al. MM-141, an IGF-IR- and ErbB3-directed bispecific antibody overcomes network adaptations that limit Activity of IGF-IR Inhibitors. Mol Cancer Ther. 2014;13(2):410–25.
59. Kundranda M, Gracian AC, Zafar SF, Meiri E, Bendell J, Algül H, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of istiratumab (MM-141) plus nab-paclitaxel and gemcitabine versus nab-paclitaxel and gemcitabine in front-line metastatic pancreatic cancer (CARRIE). Ann Oncol. 2020;31(1):79–87.
60. Alsina M, Varga A, Amatu A, Schellens JHM, Witteveen PO, Boni V, et al. Phase I/II study of single agent MCLA-128, a full length IgG1 bispecific antibody targeting the HER3 pathway: Overall safety at the recommended phase II dose (R2PD) and preliminary activity in HER2+ metastatic gastric/gastroesophageal junction cancer (GC). Ann Oncol [Internet]. 2018;29(October):viii223–4. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy282.048>

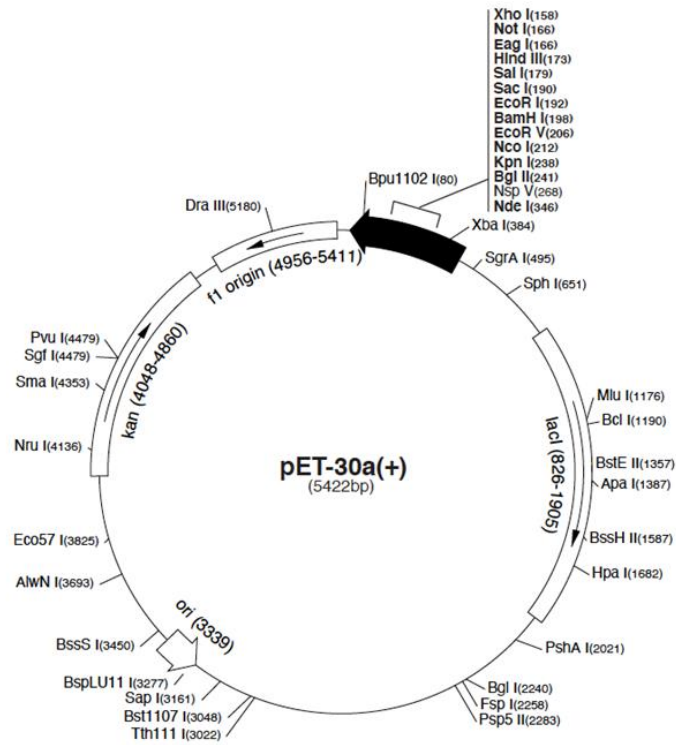
61. Bender O. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü Dimerizasyon Bölgesine Nötralizan Monoklonal Anti-EGFR Antikoru Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Doktora Tezi.
62. Mansouri-Fard S, Ghaedi M, Shokri MR, Bahadori T, Khoshnoodi J, Golsaz-Shirazi F, et al. Inhibitory Effect of Polyclonal Antibodies Against HER3 Extracellular Subdomains on Breast Cancer Cell Lines. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2020;21(2):439–47.
63. D’Souza JW, Reddy S, Goldsmith LE, Shchhaveleva I, Marks JD, Litwin S, et al. Combining anti-ERBB3 antibodies specific for domain I and domain III enhances the anti-tumor activity over the individual monoclonal antibodies. *PLoS One.* 2014;9(11):1–13.
64. Radom F, Vornrhein C, Mittl PRE, Pluckthun A. Crystal structures of HER3 extracellular domain 4 in complex with the designed ankyrin-repeat protein D5. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun.* 2021;77:192–201.
65. Kumai T, Ohkuri T, Nagato T, Matsuda Y, Oikawa K, Aoki N, et al. Targeting HER-3 to elicit antitumor helper T cells against head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep [Internet].* 2015;5:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep16280>
66. Claus J, Patel G, Ng T, Parker PJ. A role for the pseudokinase HER3 in the acquired resistance against EGFR- and HER2-directed targeted therapy. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(4):831–6.
67. Osada T, Hartman ZC, Wei J, Lei G, Hobeika AC, Gwin WR, et al. Polyfunctional anti-human epidermal growth factor receptor 3 (anti-HER3) antibodies induced by HER3 vaccines have multiple mechanisms of antitumor activity against therapy resistant and triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2018;20(1):1–14.
68. Aurisicchio L, Marra E, Roscilli G, Mancini R, Ciliberto G. The promise of anti-ErbB3 monoclonals as new cancer therapeutics. *Oncotarget.* 2012;3(8):744–58.

EKLER

Ek 1: pET-30a(+) Plazmid Haritası

pET-30a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	419-435
T7 transcription start	418
His•Tag coding sequence	327-344
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites (Nco I - Xho I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
lacI coding sequence	826-1905
pBR322 origin	3339
Kan coding sequence	4048-4860
f1 origin	4956-5411

The maps for pET-30b(+) and pET-30c(+) are the same as pET-30a(+) (shown) with the following exceptions: pET-30b(+) is a 5421bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-30c(+) is a 5423bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198.



Ek 2: HER3-ECD Nükleotid ve Amino Asit Dizileri

HER3 1869 bc Hücre Dışı Alan (Extracellular Domain):

TCCGAGGTGGGCAACTCTCAGGCAGTGTGTCTCTGGGACTCTGAATGGCCTGAGTGTGACCGGCGATGCTGAGA
ACCAATACCAGACACTGTACAAGCTCTACGAGAGGTGTGAGGTGGTGATGGGGAACCTTGAGATTGTGCTCAC
GGGACACAATGCCGACCTCTCCTTCCTGTCAGTGGATTTCGAGAAGTGACAGGCTATGTCTCTCGTGGCCATGAAT
GAATTCTCTACTCTACCATTGCCCCAACCTCCGCGTGGTGCGAGGGACCCAGGTCTACGATGGGAAGTTTGCCA
TCTTCGTCATGTTGAACTATAACACCAACTCCAGCCACGCTCTGCGCCAGCTCCGCTTGACTCAGCTCACCGG
ATTCTGTCAGGGGTGTTTATATTGAGAAGAACGATAAGCTTTGTTCACATGGACACAATTGACTGGAGGGACA
TCGTGAGGGACCGAGATGCTGAGATAGTGGTGAAGGACAATGGCAGAAGCTGTCCCCCTGTCATGAGGTTTG
CAAGGGGCGATGCTGGGGTCTGGATCAGAAGACTGCCAGACATGACCAAGACCATCTGTGCTCCTCAGTGT
AATGGTCACTGCTTTGGGCCCCAACCCCAACCAGTGCTGCCATGATGAGTGTGCCGGGGGCTGCTCAGGCCCTC
AGGACACAGACTGCTTTGCCTGCCGGCACTTCAATGACAGTGGAGCCTGTGTACCTCGCTGTCCACAGCCTCT
TGCTACAACAAGCTAACTTTCCAGCTGGAACCCCAATCCCCACACCAAGTATCAGTATGGAGGAGTTTGTGTA
GCCAGCTGTCCCCATAACTTTGTGGTGGATCAAACATCCTGTGTGTCAGGGCCTGTCTCCTGACAAGATGGAAG
TAGATAAAAAATGGGCTCAAGATGTGTGAGCCTGTGGGGGACTATGTCCCAAAGCCTGTGAGGGAACAGGCTC
TGGGAGCCGCTTCCAGACTGTGGACTCGAGCAACATTGATGGATTTGTGAATGCACCAAGATCCTGGGCAAC
CTGGACTTTCTGATCACCGGCCTCAATGGAGACCCCTGGCACAAGATCCCTGCCCTGGACCCAGAGAAGCTCA
ATGTCTTCCGGACAGTACGGGAGATCACAGGTTACCTGAACATCCAGTCCTGGCCGCCCCACATGCACAACCTT
CAGTGTTTTTTCCAATTTGACAACCATTTGGAGGCAGAAGCCTCTACAAACGGGGCTTCTCATTGTTGATCATG
AAGAACTTGAATGTTCACATCTCTGGGCTTCCGATCCCTGAAGGAAATTAGTGTGGGCGTATCTATATAAGTG
CCAATAGGCAGCTCTGCTACCACCACTCTTTGAACTGGACCAAGGTGCTTCGGGGGCCTACGGAAGAGCGACT
AGACATCAAGCATAATCGGCCGCGCAGAGACTGCGTGGCAGAGGGCAAAGTGTGTGACCCACTGTGCTCCTCT
GGGGGATGCTGGGGCCCAGGCCCTGGTCAGTGCTTGTCTGTGCGAAATTATAGCCGAGGAGGTGTCTGTGTGA
CCCCTGCAACTTTCTGAATGGGAGGCTCGAGAATTTGCCCATGAGGCCGAATGCTTCTCCTGCCACCCGGA
ATGCCAACCCATGGAGGGCACTGCCACATGCAATGGCTCGGGCTCTGATACTTGTGCTCAATGTGCCATTTT
CGAGATGGGCCCCACTGTGTGAGCAGCTGCCCCCATGGAGTCCTAGGTGCCAAGGGCCCCAATCTACAAGTACC
CAGATGTTTCAGAATGAATGTGCGCCCTGCCATGAGAACTGCACCCAGGGGTGTAAAGGACCAGAGCTTCAAGA
CTGTTTAGGACAAACACTGGTGCTGATCGGCAAAACC

HER3 20-643 Amino Asitler:

SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGAENQYQTLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMN
EFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRD
IVRDRDAEIVVKDNGRS CPPCHEVCKGRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCHDECAGGCSGP
QDTCDFACRHFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSVRACPPDKME
VDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKL
NVFRTVREITGYLNIQSWPPMHNFVSFNSLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYIS
ANRQLCYHHSLNWTQVLRGPTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCV
THCNFLNGEPREFAEAECSFCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVLGAKGPIYKY
PDVQNECRPCHENCTQGCKGPQLQDCLGQTLVLI GKT

Ek 3: T7F_HER3ECD_Koloni4 ile HER3-ECD Referans Dizisi BLAST Analizi

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment

```

3_T7F      TGTGGAACGGAACAATTCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCACCAT 70
HER3-ECD_Referans_Dizi ----- 70

3_T7F      CATCATCATCATCTTCTGGTCTGGTGCCACGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCG 140
HER3-ECD_Referans_Dizi ----- 140

3_T7F      AACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGACGACACAGGCCATGGGATATCTGTGGATCC 210
HER3-ECD_Referans_Dizi ----- 210

3_T7F      CTTCCGAGGTGGGCAACTCTCAGGCAGTGTCTCTGGGACTCTGAATGGCCTGAGTGTGACCGCGCATGC 280
HER3-ECD_Referans_Dizi -- TCCGAGGTGGGCAACTCTCAGGCAGTGTCTCTGGGACTCTGAATGGCCTGAGTGTGACCGCGCATGC 280
*****

3_T7F      TGAGAACCAATACCAGACACTGTACAAGCTCTACGAGAGGTGTGAGGTGGTGATGGGGAACCTTGAGATT 350
HER3-ECD_Referans_Dizi TGAGAACCAATACCAGACACTGTACAAGCTCTACGAGAGGTGTGAGGTGGTGATGGGGAACCTTGAGATT 350
*****

3_T7F      GTGCTCACGGGACACAATGCCGACCTCTCTTCTCGAGTGGATTGAGAAGTGACAGGCTATGTCCTCG 420
HER3-ECD_Referans_Dizi GTGCTCACGGGACACAATGCCGACCTCTCTTCTCGAGTGGATTGAGAAGTGACAGGCTATGTCCTCG 420
*****

3_T7F      TGGCCATGAATGAATCTCTACTCTACCATTGCCAACCTCCGCGTGGTGCGAGGGACCCAGGCTACGA 490
HER3-ECD_Referans_Dizi TGGCCATGAATGAATCTCTACTCTACCATTGCCAACCTCCGCGTGGTGCGAGGGACCCAGGCTACGA 490
*****

3_T7F      TGGGAAGTTTGCCATCTTCGTATGTTGAACATAACCAACTCCAGCCACGCTGCGCCAGCTCCGC 560
HER3-ECD_Referans_Dizi TGGGAAGTTTGCCATCTTCGTATGTTGAACATAACCAACTCCAGCCACGCTGCGCCAGCTCCGC 560
*****

3_T7F      TTGACTCAGCTCACCAGATTCTGTGAGGGGTGTTTATATTGAGAAGAACGATAAGCTTTGTGCATGG 630
HER3-ECD_Referans_Dizi TTGACTCAGCTCACCAG-GATTCTGTGAGGGGTGTTTATATTGAGAAGAACGATAAGCTTTGTGCATGG 630
*****

3_T7F      ACACAATTGACTGGAGGGACATCGTGAGGGACCGAGATGCTGAGATAGTGGTGAAGGACAATGGCAGAAG 700
HER3-ECD_Referans_Dizi ACACAATTGACTGGAGGGACATCGTGAGGGACCGAGATGCTGAGATAGTGGTGAAGGACAATGGCAGAAG 700
*****

3_T7F      CTGTCCCCCTGTGATGAGGTTTGCAAGGGGCGATGCTGGGGTCTGGATCAGAAGACTGCCAGACATTG 770
HER3-ECD_Referans_Dizi CTGTCCCCCTGTGATGAGGTTTGCAAGGGGCGATGCTGGGGTCTGGATCAGAAGACTGCCAGACATTG 770
*****

3_T7F      ACCAAGACCATCTGTGCTCCTCAGTGAATGGTCACTGCTTTGGGCCCAACCCCAACAGTGTGCCATG 840
HER3-ECD_Referans_Dizi ACCAAGACCATCTGTGCTCCTCAGTGAATGGTCACTGCTTTGGGCCCAACCCCAACAGTGTGCCATG 840
*****

3_T7F      ATCATTGTGCGGGGGCTGCTCAGGCCCTCAGGACACAGACTGCTTTGCTGCGGGCACTTCAATGACAT 910
HER3-ECD_Referans_Dizi ATGAGTGTGCGGGGGCTGCTCAGGCCCTCAGGACACAGACTGCTTTGCTGCGGGCACTTCAATGACAG 910
* * *****

3_T7F      TGAAGCCTGTGTACCTCGCTGTCCACAGCCTCTTGTCTACAACAAGCTAACTTTCCA-CTGGAACCCAAT 980
HER3-ECD_Referans_Dizi TGGAGCCTGTGTACCTCGCTGTCCACAGCCTCTTGTCTACAACAAGCTAACTTTCCAGCTGGAACCCAAT 980
** *****

3_T7F      CGCCACACCAAGTATCATTATGGAGGAGTTTGGGTAACCCGCTGCCTCCATAACTTGTGGGTGAATCAA- 1050
HER3-ECD_Referans_Dizi CCCACACCAAGTATCAGTATGGAGGAGTTTGTGTAGCCAGCTGTCCCATAACTTTGTGGTGGATCAAA 1050
* *****

3_T7F      CATCC-GTGTGAGG-CCTGTCTCTGACATAATCGAATTAATAAAAAAGGGG-TCAAGAAGCGGGAGCC 1120
HER3-ECD_Referans_Dizi CATCCTGTGTGAGGGCTGTCTCTGACAAGATGGAAGTAGATAAAAAATGGGCTCAAGATGTGTGAGCC 1120
*****

3_T7F      TTGTGGGGGACGATCTCACAACAC-TGTTAGC-AACGGGCACGTAGACCCCTTACCA---TGTGTGACGC 1190
HER3-ECD_Referans_Dizi TTGTGGGGGACTATGTCCAAAGCCTGTGAGGGAACAGGCTCTGGGAGCCGCTTCCAGACTGTGGACTCG 1190
*****

3_T7F      AGCGAGGTGGGGGAATTGTC-AACCGCACGAGAATC-TAGACA-CTTAAATTT----- 1260
HER3-ECD_Referans_Dizi AGCAACATTGATGGATTGTGAACTGCACCAAGATCCTGGGCAACCTGGACTTTCTGATCACCGCCCTCA 1260
*** * * * *

3_T7F      ----- 1330
HER3-ECD_Referans_Dizi ATGGAGACCCCTGGCACAAGATCCCTGCCCTGGACCCAGAGAAGCTCAATGTCTTCCGGACGTACGGGA 1330

```

Ek 4: T7R_HER3ECD_Koloni4 ile HER3-ECD Reverse Complement Referans Dizisi BLAST Analizi

CLUSTAL W 2.0 multiple sequence alignment

```

3_T7R                                     CGACGTAGCTCTTTGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTGC G 70
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi ----- 70

3_T7R                                     CGCAAGCTGTGCTAGCTCAGATGGGTTTTGCCGATCAGCACCAAGTGTTTGCTCTAAACAGTCTTGAAGCTC 140
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----GGTTTGGCGGATCAGCACCAAGTGTGTGCTCTAAACAGTCTTGAAGCTC 140
*****

3_T7R                                     TGGTCTTTTACACCCCTGGGTGCAGTCTCATGGCAGGGCCGACATTCATTCTGAACATCTGGGTACTTG 210
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----TGGTCTTTTACACCCCTGGGTGCAGTCTCATGGCAGGGCCGACATTCATTCTGAACATCTGGGTACTTG 210
*****

3_T7R                                     TAGATTGGGCCCTTGGCACCTTAGGACTCCATGGGGCAGCTGCTCACACAGTGGGGCCATCTCGAAAT 280
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----TAGATTGGGCCCTTGGCACCTTAGGACTCCATGGGGCAGCTGCTCACACAGTGGGGCCATCTCGAAAT 280
*****

3_T7R                                     GGGCACATTGAGCACAGATATCAGAGCCGAGCCATTGCAAGTGGCAGTGCCTCCATGGGTGGCATTG 350
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----GGGCACATTGAGCACAGATATCAGAGCCGAGCCATTGCAATGTGGCAGTGCCTCCATGGGTGGCATTG 350
*****

3_T7R                                     CGGGTGGCAGGAGAAGCATTGGCCTCATGGGCAAAATCTCAGAGCTCCCATTCAGAAAGTTCGACATG 420
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----CGGGTGGCAGGAGAAGCATTGGCCTCATGGGCAAAATCTCAGAGCTCCCATTCAGAAAGTTCGACATG 420
*****

3_T7R                                     GTCACACAGACCTCTCGGCTATAATTTGACAGGACAAGCATTGACAGGGCTGGGCCCAGCATC 490
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----GTCACACAGACCTCTCTCGGCTATAATTTGACAGGACAAGCATTGACAGGGCTGGGCCCAGCATC 490
*****

3_T7R                                     CCCAGAGGAGCAGTGGGTACACACTTTGCCCTTGCCACGCGAGTCTCTGCGCGGCGATTATGCTT 560
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----CCCAGAGGAGCAGTGGGTACACACTTTGCCCTTGCCACGCGAGTCTCTGCGCGGCGATTATGCTT 560
*****

3_T7R                                     TGCTCTAGTCGCTTCTCCGTAGGCCCCGAAGCACCTTTGGTCCAGTTCAAGAGTGGTGGTAGCAGAG 630
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----GATGTCTAGTCGCTTCTCCGTAGGCCCCGAAGCACCTTTGGTCCAGTTCAAGAGTGGTGGTAGCAGAG 630
*****

3_T7R                                     TGCTATTGGCACTTATATAGATACGCCAGCATAATTTCTTCAGGGATCGGAAGCCAGAGATGTGA 700
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----TGCTATTGGCACTTATATAGATACGCCAGCATAATTTCTTCAGGGATCGGAAGCCAGAGATGTGA 700
*****

3_T7R                                     CATTCAAGTCTTCTATGATCAACAATGAGAAGCCCGTTGTAGAGGCTTCTGCCTCCAATGGTGTCAA 770
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----CATTCAAGTCTTCTATGATCAACAATGAGAAGCCCGGTTGTAGAGGCTTCTGCCTCCAATGGTGTCAA 770
*****

3_T7R                                     ATTGAAAAAACTGAAGTTGTGCATGTGGGCGGCCAGGACTGGATGTTCAAGTAACCTGTGATCTCC 840
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----ATTGAAAAAACTGAAGTTGTGCATGTGGGCGGCCAGGACTGGATGTTCAAGTAACCTGTGATCTCC 840
*****

3_T7R                                     CGTACTGTCCGGAAGACATTGAGCTTCTCTGGGTCCAGGCGAGGATCTTGTGCCAGGGGTCTCCATTGA 910
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----CGTACTGTCCGGAAGACATTGAGCTTCTCTGGGTCCAGGCGAGGATCTTGTGCCAGGGGTCTCCATTGA 910
*****

3_T7R                                     GGCCGGTGATCAGAAAGTCCAGGTGGCCAGGATCTTGGTGACGTTCACAAATCCATCAATGTTGTCGA 980
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----GGCCGGTGATCAGAAAGTCCAGGTGGCCAGGATCTTGGTGACGTTCACAAATCCATCAATGTTGTCGA 980
*****

3_T7R                                     GTCCACAGTCTGGAAGCGGCTCCAGAGCCTGTTCCCTCAGAGCCTTGGAAACATAGTCCCCACAAGGC 1050
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----GTCCACAGTCTGGAAGCGGCTCCAGAGCCTGTTCCCTCAGAGCCTTGGAAACATAGTCCCCACAAGGC 1050
*****

3_T7R                                     TCAACATCTTGAGCCATTTTATCTACTTCCATCTTGTGAGGAGGACAGGCCCTGACA-AGGA-GTTT 1120
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----TCAACATCTTGAGCCATTTTATCTACTTCCATCTTGTGAGGAGGACAGGCCCTGACAAGGATGTTT 1120
*****

3_T7R                                     GATC-GCCAAAAGTTATGGGGATAGCTGGCTACACAA-CTCCTCATACGGATCTGGTTGTGGGGATT 1190
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----GATCCACACAAAGTTATGGGGACAGCTGGCTACACAACTCCTCATACGATCTGGTTGTGGGGATT 1190
*****

3_T7R                                     GG-TTTCGGCGGGAAAGT-ACCTTGTTTTA-ACAAAAG-CCGTTGA-AACGAGTGA-ACAGGCTCCA-TG 1260
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----GGGTTCCAGCTGGAAAGTTAGCTTGTGTGAGACAAAGGCTGTGGCAGCAGGAGTACACAGGCTCCACTG 1260
*****

3_T7R                                     CA----- 1330
HER3-ECD_Reverse_Complement_Referans_Dizi -----TCATTGAAGTGGCGGAGGCAAGCAGTCTGTGTCTGAGGGCTGAGCAGGCCCGGACACTCATCAT 1330

```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ahmet Kaan Dikici

Eğitim Durumu

Lise: Hacı Sani Konukoğlu Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi [2009 – 2013]

Lisans: İnönü Üniversitesi Fen ve Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (%100 İngilizce) [2013 – 2018]

Bildiriler

- IMASCON 2022 Uluslararası Marmara Fen Bilimleri Kongresi, Rekombinant HER3 Antijeninin Üretimi
[Kocaeli, Türkiye (Sözlü Sunum), 13/05/2022 – 14/05/2022]
Arzu Atalay, Ahmet Kaan Dikici, Merve Samur, Rümeysa Doğan



REKOMBİNANT HER3 ANTİJENİNİN ÜRETİLMESİ

Arzu Atalay

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji
aatalay@ankara.edu.tr, ORCID: 0000-0003-1309-5291

Ahmet Kaan Dikici

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji
a.kaandikici@gmail.com, ORCID: 0000-0003-3795-3684

Merve Samur

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji
mervesamur0@gmail.com, ORCID: 0000-0002-7495-6852

Rümeysa Doğan

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji
rmysdogan@ankara.edu.tr, ORCID: 0000-0002-6107-9870

Özet

HER3, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör ailesinin dört üyesinden biridir. HER1, HER2, HER3 ve HER4'ü içeren bu reseptör tirozin kinaz ailesi, birçok kanser türü için terapötik bir hedeftir. HER3'ün meme, akciğer, kolon ve pankreas gibi çeşitli insan kanserlerinde aşırı ifadesi metastatik potansiyelin artmasına ve tümör gelişiminin desteklenmesine yol açarak tedavide başarısızlığın ana nedenini oluşturur. Son yıllarda yapılan birçok çalışma HER3'ün önemini göstermiş ve HER3'ü hedef alan tedavilerin geliştirilmesine yönelik çok sayıda preklinik ve klinik çalışmanın başlamasını sağlamıştır. Artan HER3 ifadesi, kanser tedavisi sırasında anti-EGFR/HER1 ve anti-HER2 terapötiklerine karşı direnç neden olur. Bu direncin üstesinden gelmek ve terapötik etkinliği artırmak için HER3 sinyal yolağı temel aşağı akış mediyatörlerinin etkili inhibisyonu gereklidir. Bu nedenle, daha fazla HER3 inhibitörü terapötik ajan geliştirme çalışmasına ihtiyaç vardır. Bu reseptörlere bağlanan monoklonal antikolar geliştirilmiş olmasına ve bunları geliştirmeye yönelik çalışmalar halen devam etmesine rağmen, HER3'ü hedef alan bir monoklonal antikor henüz onaylanmamıştır. Anti-HER3 monoklonal antikor geliştirmeyi hedeflediğimizden, bu çalışmada ilk adım olarak rekombinant HER3 antijen olarak klonlanmış ve ifade edilmiştir. HER3 hücre dışı alanı, ligand bağlanmasının özgüllüğünü belirleyen iki sistein açısından zengin bölge (II ve IV) ve iki yan bölge (I ve III) içeren dört alt alandan (I-IV) oluşur. *Escherichia coli*'de 6xHis tag füzyonlu rekombinant antijeni ifade edebilmek için 1869 nükleotidlik uzunluktaki HER3 hücre dışı alanı pET-30a(+) plazmitine klonlanmıştır. Klonlama için *E.coli* DH5α-TR1 bakteri suşu kullanılmıştır. Rekombinant 6xHis-tag-HER3ECD protein *E. coli* BL21(DE3)'de ifade edilmiş ve IPTG indüksiyonunun ardından 6xHis antikoruna karşı immünoelotlamada beklenen 77 kDa bant gözlemlenmiştir. 6xHis-tag-HER3ECD proteininin çözünürlük ve ifade optimizasyon çalışmaları devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 3 (HER3), HER3-ECD, Antijen, pET-30 ifade sistemi



International Marmara Sciences Congress (Imascon Spring 2022)

13 – 14 May 2022 KOCAELI

PROCEEDINGS E-BOOK

Organizer



Sponsors

