

ANTI-HER2 SCFV ANTİKOR FRAGMANININ *Escherichia coli* BAKTERİSİNDE ÜRETİM BÖLGESİNİN OPTİMİZASYONU

OPTIMIZATION OF ANTI-HER2 SCFV ANTIBODY FRAGMENT PRODUCTION REGION IN *Escherichia coli*

SELEN CİLASUN

DOÇ. DR. EDA ÇELİK AKDUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

ANTI-HER2 SCFV ANTİKOR FRAGMANININ *Escherichia coli* BAKTERİSİNDE ÜRETİM BÖLGESİNİN OPTİMİZASYONU

Selen CİLASUN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Aralık 2022, 78 sayfa

Antikorlar ve antikor fragmanları, kanser ve viral enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıkların tanısında, görüntüleme ve hedefe özgü tedavilerde kullanılmaktadır. Bulaşıcı hastalıklarla mücadelede de önemli bir yere sahiptir. Esnek bir peptid parçası ile bir hafif zincirin V kısmına bağlanmış bir ağır zincirin V kısmından oluşan tek-zincir antikor fragmanları (scFv), daha küçük boyutlarda olması, bakteri sistemlerinde daha ucuz ve kolaylıkla üretilebilmesi ve hedef antijene karşı, antikora benzer düzeyde, yüksek seçicilik ve afinite göstermelerinden dolayı, son zamanlarda tam-antikorlar yerine kullanılabilir. Biyofarmasötik proteinler küresel ilaç pazarının yaklaşık yarıya yakını oluşturmaktadır. Biyofarmasötik ürünlerin çoğunluğunu monoklonal antikor ve antikor fragmanları kapsamaktadır. Rekombinant protein üretiminde yaygın olarak kullanılan *Escherichia coli*'nin, üretim maliyetlerini düşürdüğü, verimliliği arttırdığı ve diğer mikroorganizmalara kıyasla manipülasyonu daha kolay olduğu bilinmektedir. Literatürde, disülfid bağı içeren anti-

HER2 scFv'nin optimum üretim yerinin belirlenmesine yönelik *E. coli*'nin üç farklı bölmesindeki üretimlerin bir arada olduğu, bu bölgelere özgü farklı yolları kullanan birbirinden farklı sinyal peptitleri ve suş kullanılarak karşılaştırılmasına ve üç bölme arasında optimum üretim yerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan tez çalışmasında, meme kanseri hücrelerinde normalden fazla miktarda ortaya çıkan insan epidermal büyüme reseptörü 2 (HER2)'ye karşı seçici anti-HER2 scFv'nin, genetiği değiştirilmiş ticari *E. coli* bakterisinin SHuffle T7 Express suşunda sitoplazmik bölgede üretimi, BL21(DE3) suşunda DsbA, MBP sinyal peptitleri kullanarak yapılan tasarımla periplazmik ve YebF sinyal peptidi kullanarak yapılan tasarımla hücre dışında üretimleri karşılaştırılmıştır. Üretim sonrası >99% oranında saflaştırılan scFv'lerin, çözünür ve aktif formda oldukları yapılan çalışmada gösterilmiştir. Sıcaklık taraması yapılarak, üretim için uygun sıcaklık belirlenmiştir. Üretim sürecinin optimize edilmesinin ardından scFv'ler farklı yönleri ile kıyaslanmıştır. Özgüllükleri değerlendirilen periplazmik, sitoplazmik ve ekstraselüler örnekler, *in vitro* analizlerde antijene doğru şekilde bağlanmıştır. Sitoplazmik örneğin üretim verimi 6,2 mg/L iken, spMBP ile yapılan periplazmik üretimin verimi 5,1 mg/L, hücre dışı üretim verimi ise 2,5 mg/L olarak bulunmuştur. Ayrıca, özgül ısı ve erime sıcaklıklarına (T_m) bakıldığında, sitoplazmik örneğin termal olarak daha kararlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Özetle bu çalışma, tıbbi tanı ve tedavide rol oynayan, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilecek ve disülfid bağı içeren proteinlerin üretim maliyetlerini azaltım sürecine rehberlik edebilecek bir çalışma olmuştur. Özellikle anti-HER2 scFv'nin aktif ve çözünür formdaki üretimi, kompleks proteinlere özgü yöntemler ve suşlar kullanarak *E. coli*'de klonlanması ve farklı yönleriyle değerlendirilmesi literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antikor fragmanı, *E. coli*, sinyal peptit, rekombinant protein, periplazmik, ekstraselüler, sitoplazmik

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF ANTI-HER2 SCFV ANTIBODY FRAGMENT PRODUCTION REGION IN *Escherichia coli*

Selen CİLASUN

Master of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

December 2022, 78 pages

Antibodies and antibody fragments are used in the diagnosis, imaging, and target-specific treatments of various diseases such as cancer and viral infections. It also has an important place in combating infectious diseases. Single-chain antibody fragments (scFv), which consist of a flexible peptide fragment and the V portion of a heavy chain linked to the V portion of a light chain, are smaller in size, can be produced more cheaply and easily in bacterial systems, and have a high selectivity against the target antigen, similar to antibodies, and due to their affinity, they have recently become an alternative to full-antibodies. Biopharmaceutical proteins make up nearly half of the global pharmaceutical market. The majority of biopharmaceutical products include monoclonal antibody and antibody fragments. It is known that *Escherichia coli*, which is widely used in recombinant protein production, reduces production costs, increases productivity and is easier to manipulate compared to other microorganisms. There is a lack of study in literature in order to determine the optimum production site of anti-HER2 scFv containing disulfide bonds, in which the productions in three different compartments of *E. coli*

are coexisting, comparing using different signal peptides and strains, via different pathways specific to these regions. In the thesis study, productions of selective anti-HER2 scFv against human epidermal growth receptor 2 (HER2), which occur in excessive amounts in breast cancer cells, were compared for three different compartments, periplasmic, cytoplasmic and extracellular. The commercial and genetically modified *E. coli* SHuffle T7 Express strain was used for the cytoplasmic production. Designs including DsbA and MBP signal peptides were used for periplasmic region, while the design with the YebF signal peptide was used for extracellular secretion. It has been shown in the study that the scFvs purified at a ratio of >99% after production are in soluble and active form. The most suitable temperature for production was determined by screening the induction temperature. After optimizing the production process, scFvs were compared in different features. Periplasmic, cytoplasmic, and extracellular samples whose specificities were evaluated were correctly bound to antigen in the *in vitro* assays. While the production yield of the cytoplasmic sample was 6.2 mg/L, the yield of periplasmic production with spMBP was 5.1 mg/L and the extracellular production efficiency was 2.5 mg/L. In addition, when the specific heat and melting temperatures (T_m) were examined, it is concluded that the cytoplasmic sample is thermally more stable. Overall, this study has been a guide for the process of reducing the production costs of recombinant proteins that play a role in medical diagnosis and treatment. In particular, the production of anti-HER2 scFv in active and soluble form, its cloning in *E. coli* using complex protein-specific methods and strains, and evaluation of its different aspects will make an important contribution to the literature.

Keywords: Antibody fragment, *E. coli*, signal peptide, recombinant protein, periplasmic, extracellular, cytoplasmic

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yolculuğumda bana her zaman yol gösteren, değerli desteği ve rehberliği için kıymetli danışmanım Doç. Dr. Eda Çelik Akdur'a

FBA-2021-18857 numaralı proje ile tez çalışmalarımı destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne sağladığı desteklerden dolayı,

118Z798 nolu 1001 projesi ve 121M179 nolu 1002 projesi aracılığıyla sahip olduğum finansal destek için TÜBİTAK'a ve sağladığı eğitim bursu için Neslihan Aydınoglu'na,

Tez çalışmam boyunca her türlü bilgileriyle destek olarak deneylerim süresince her zaman yanımda olan Dr. İlkay Koçer KULOĞLU'na, Dilek ŞAHİNBAŞ'a, ve Emine ALTUN'a,

Deneylerim süresince zorlandığım durumlarda yardımlarını esirgemeyen Dr. Murat AKDOĞAN'a ve Batuhan DOĞAN'a

H.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü merkezi laboratuvarında Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizlerini gerçekleştiren kıymetli mühendis Belgin ASLAN'a,

İş hayatına başladığım andan itibaren yüksek lisans sürecimi tamamlamam için destekleri esirgemeyen aralarında bulunmaktan çok mutlu olduğum Re-carbon şirketi'ndeki ekip arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca yanımda olan ve beni hep destekleyen evlatları olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum başta annem Serap ATAY, anneannem Gülşen ATAY ve dedem Tekin ATAY olmak üzere canım aileme,

Zorlu yüksek lisans sürecimde her an yanımda olduklarını hissettiğim canım arkadaşlarım ve gösterdiği sabır ve desteği için Burak MENTEŞ'e

En içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | x |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xi |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. Antikorlar | 4 |
| 2.1.1. Antikor Fragmanları | 6 |
| 2.1.2. Tek Zincirli Değişken Fragmanı (ScFv)..... | 7 |
| 2.2. <i>Escherichia coli</i> | 9 |
| 2.2.1. <i>E. coli</i> 'nin Üç Bölmesi ve Sinyal Peptidleri | 12 |
| 2.3. İnsan Epidermal Büyüme Reseptörü 2 (HER2) | 17 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR | 19 |
| 3.1. Anti-HER2-scFv'nin Rekombinant Üretimine Yönelik Vektörlerin Oluşturulması | 19 |
| 3.1.1. Plasmid DNA İzolasyonu | 20 |
| 3.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi | 20 |
| 3.1.3. DNA'nın Agaroz Jelden Ekstraksiyonu | 20 |
| 3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu | 23 |
| 3.1.5. Sentetik Primer oluşturulması | 23 |
| 3.1.6. SOE PZR (Örtüşme-Uzatma Polimeraz Zincir Reaksiyonu) | 24 |
| 3.1.7. DNA'nın Restriksiyon Enzimi Kullanarak Kesimi..... | 25 |
| 3.1.8. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon)..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 3.1.9. CaCl ₂ ile Transformasyon | 26 |
| 3.1.10. DNA Dizi Analizlemesi | 26 |
| 3.2. Elde Edilen R-Vektörlerin Konakçı Hücelere Aktarılması ve Küçük Ölçekte Üretim Verimlerinin Karşılaştırılması | 27 |
| 3.3. Üretilen Anti-HER2-Scfv'lerin Saflaştırılması ve Birincil Karakterizasyonu | 27 |
| 3.3.1. Toplam Protein Derişimi..... | 28 |
| 3.3.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi..... | 28 |
| 3.3.3. Western Aktarım | 29 |
| 3.4. Üretilen Anti-HER2-Scfv'lerin İkincil Karakterizasyonu | 29 |
| 3.4.1. ELISA Testi..... | 29 |
| 3.4.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi | 29 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 31 |
| 4.1. Anti-HER2 ScFv'nin Rekombinant Üretimine Yönelik Vektörlerin Oluşturulması..... | 31 |
| 4.2. Elde Edilen r-Vektörlerin Konakçı Hücelere Aktarılması ve Küçük Ölçekte Üretim Verimlerinin Karşılaştırılması | 39 |
| 4.3. Üretilen Anti-HER2-ScFv'lerin Saflaştırılması ve Birincil Karakterizasyonu... | 46 |
| 4.4. Üretilen Anti-HER2-ScFv'lerin İkincil Karakterizasyonu..... | 50 |
| 5. SONUÇLAR | 54 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 57 |
| EKLER | 71 |
| EK 1 – Sekans sonuçları | 71 |
| EK 2 – Tezden Türetilmiş Bildiriler | 74 |
| EK 3 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu | 76 |
| ÖZGEÇMİŞ | 77 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. A: Tam antikor (IgG), B: tek zincirli değişken fragmanı (scFv) [3]. | 5 |
| Şekil 2.2. E. coli'de çözünür antikor fragmanı için ekspresyon yolu [69] | 13 |
| Şekil 2.3. Escherichia coli'de salgı üretimini arttırma stratejileri [24]. | 14 |
| Şekil 3.1. Anti-HER2 scFv proteininin sinyal peptitleriyle rekombinant olarak üretilmesine yönelik gen kaseti tasarımları | 21 |
| Şekil 3.2. Moleküler klonlama prosedürünün şematik gösterimi [101]. | 22 |
| Şekil 4.1. Tavlama sıcaklığı (Ta) optimizasyonu için spYebF eklenerek oluşturulan PZR ürünlerinin (381 bp) agaroz jel elektroforezi görüntüsü; M: 100 bp DNA standardı | 31 |
| Şekil 4.2. Kesim reaksiyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü; M1: 1 kb DNA standardı, M2: 100 bp DNA standardı | 32 |
| Şekil 4.3. DNA parçasının kesimi yapıldıktan sonra alınan agaroz jel elektroforezi; M: 1 kb DNA standardı | 32 |
| Şekil 4.4. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü; M: 100 bp DNA standardı | 34 |
| Şekil 4.5. SOE-PZR3 ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü; M: 1kb DNA standardı | 35 |
| Şekil 4.6. Restriksiyon kontrolü ile 1 numaralı ligasyon için ideal koloni seçimi için yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüleri; M:1 kb DNA standardı | 37 |
| Şekil 4.7. Restriksiyon kontrolü ile 2 numaralı ligasyon için ideal koloni seçimi için yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüleri; M: 1 kb DNA standardı | 37 |
| Şekil 4.8. Restriksiyon kontrolü ile 2 numaralı ligasyon için ideal koloni seçimi için yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüleri; M: 1 kb DNA standardı | 38 |
| Şekil 4.9. Restriksiyon kontrolü agaroz jel görüntüsü; M: 1 kb DNA standardı | 38 |
| Şekil 4.10. SpYebF-anti-HER2 scFv-6xHis için ortam ve saat taraması M: Protein standardı | 40 |
| Şekil 4.11. Hücre içi proteinleri gösteren SDS-PAGE jel görüntüleri M: Protein standardı | 41 |
| Şekil 4.12. Hücre dışı proteinleri gösteren SDS-PAGE jel görüntüleri M: Protein standardı | 41 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.13. Farklı sıcaklıklarda (16, 20, 25, 30°C) üretilen hücre içi anti-HER2 scFv-6xHis proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü | 42 |
| Şekil 4.14. Farklı sıcaklıklarda (16, 20, 25, 30°C) üretilen hücre içi anti-HER2 scFv-6xHis proteinlerinin SDS- PAGE jel görüntüsü | 43 |
| Şekil 4.15. Farklı sıcaklıklarda (16, 20, 25, 30°C) üretilen hücre dışı anti-HER2 scFv-6xHis proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü | 44 |
| Şekil 4.16. Farklı sıcaklıklarda (16, 20, 25, 30°C) üretilen hücre dışı anti-HER2 scFv-6xHis proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü | 45 |
| Şekil 4.17. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüleri E. coli BL21(DE3) pET28a-spYebF-anti-HER2 scFv-6His hücre dışı proteinleri (40 kDa) M: Protein standardı | 47 |
| Şekil 4.18. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüleri E. coli BL21(DE3) pET28a-spDsbA-anti-HER2 scFv-6His periplazmik proteinleri (27 kDa) M: Protein standardı | 48 |
| Şekil 4.19. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüleri E. coli BL21(DE3) pET28a-spMBP-anti-HER2 scFv-6His periplazmik proteinleri (27 kDa) M: Protein standardı | 48 |
| Şekil 4.20. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüleri E. coli BL21(DE3) pET28a-spMBP-anti-HER2 scFv-6His ekstraselüler proteinleri (27 kDa) M: Protein standardı | 49 |
| Şekil 4.21. Western Blot görüntüsü M: Protein standardı | 50 |
| Şekil 4.22. Saflaştırılan ve konstre edilen scFv'lerin saflık yüzdelerini içeren SDS-PAGE jel görüntüsü M: Protein standardı | 51 |
| Şekil 4.23. Saflaştırılmış anti-HER2 scFv'lerinin ticari HER2'ye karşı antijen bağlama aktivitesi (ELISA) | 52 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 3.1. Kullanılan Plazmidler ve kullanım amaçları | 19 |
| Çizelge 3.2. Kullanılan Ortamları | 20 |
| Çizelge 3.3 PZR koşulları | 23 |
| Çizelge 3.4. Kullanılan Primerler | 24 |
| Çizelge 3.5. Restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu koşulları | 25 |
| Çizelge 3.6 Ligasyon reaksiyonu verileri tablosu..... | 26 |
| Çizelge 4.1. Ekstraksiyon sonrası nano-spektrofotometre cihazı ile yapılan derişim ölçümü..... | 33 |
| Çizelge 4.2. Safılaştırma sonrası nano-spektrofotometre cihazı ile yapılan derişim ölçümü..... | 34 |
| Çizelge 4.3. Dizi analizine gönderilmek üzere katı ortamdan seçilen kolonilerin nano-spektrofotometre cihazı ile ölçülen derişimleri..... | 36 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|-----|-------------|
| bp | Baz çifti |
| Cp | Özgül ısı |
| kDa | Kilo Dalton |
| kb | Kilo baz |
| m | Kütle |
| Q | Isı |
| T | Sıcaklık |

Kısaltmalar

| | |
|----------------|--|
| Ab | Antikor |
| BSA | Bovin serum albumin |
| CDR | Tamamlayıcılık Belirleme Bölgesi |
| CH | Ağır zincirin sabit kısmı |
| DSC | Diferansiyel Taramalı Kalorimetre |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | Enzim bağlı immünosorbent analizi |
| Fab | Antijen bağlanma bölgesi |
| Fc | Kristallenebilir fragman bölgesi |
| FcR | Kristallenebilir bölge reseptörü |
| FDA | Amerika Birleşik Devletleri İlaç ve Gıda dairesi |
| FR | Çerçeve bölgesi |

| | |
|----------|--|
| HC | Ağır zincir |
| HER2 | İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 |
| Ig | İmmünglobulin |
| IPTG | İzopropil β -d-1-tiyogalaktopiranosid |
| LB | Luria Bertani |
| LC | Hafif zincir |
| mAb | Monoklonal antikor |
| MBP | Maltoz bağlayıcı protein |
| OD | Işıksal yoğunluk |
| PBS | Fosfat tamponlu salin |
| PZR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| scFv | Tek zincirli değişken fragman |
| SDS-PAGE | Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforez |
| Sec | İç zardan salgı yolağı |
| spMBP | Maltoz bağlayıcı protein sinyal peptidi |
| SOB | Süper optimal besin |
| SRP | Sinyal tanıma yolağı |
| Tat | Twin-arjinin taşıma |
| TB | Terrific Besin |
| V | Değişken |
| VH | Ağır değişken zincir |
| VL | Hafif değişken zincir |

1.GİRİŞ

Antikorlar, bakteri ve virüs gibi yabancı maddelerin tanımlanıp etkisiz hale getirilmeleri için bir bağışıklık tepkisi başlatan humoral immün sistemin temel savunma molekülleridir [1]. Antikorlar ve antikor fragmanları klinik ve temel araştırmalarda birçok farklı hedefe karşı kullanılmaktadırlar. Terapötik antikorlar ve antikor fragmanları yüksek afinite özellikleri nedeniyle hastalıkların tanısında, görüntüleme ve hedefe yönelik tedavilerde kullanılmaktadır. Ayrıca iltihaplanmalarda, birçok kanser türünün tedavisinde ve bulaşıcı hastalıklarla mücadelede de önemli yere sahiptirler [2, 3].

Antikor fragmanları, antikorların yüksek afinite ve özgüllük gibi özelliklerini kullanarak, yapısal olarak bazı değişiklikler ile rekombinant tekniklerle elde edilmektedir [4]. Antikor fragmanları, antikora kıyasla daha küçük boyutlardadır. Bu özellik, daha iyi tümör ve doku penetrasyonu ve böbrekten kolay atılabilme açısından büyük fayda sağlar. En yaygın kullanılan antikor fragmanlarından olan tek zincir antikor fragmanlarının boyutu (single chain fragment variable, scFv), antikora kıyasla beş kattan daha küçüktür [5]. Bu durum, hem mikroorganizma temelli sistemlerde büyük ölçekli üretimler için, hem de afinite ve özgüllük gibi özelliklerinin geliştirilebilmesi için avantaj sağlar. Ayrıca, tek zincir antikor fragmanlarının ağır ve hafif zincirlerin arasında bir denge sorunu olmaması üretim verimini, glikozilasyon gibi modifikasyonları gerektirmemesi de üretim maliyetini olumlu yönde etkilemektedir [6-8].

Meme kanseri hastalarında normalden daha fazla bulunan epidermal büyüme reseptörü 2 (HER2), transmembran protein ailesine aittir [9]. Hastalığın tanı ve tedavisinde hedef olarak kullanılmaktadır. HER2-pozitif olan meme kanseri hücre hatlarındaki fazla çoğalmayı baskılamayı amaçlayan, FDA tarafından onaylanan, transtuzumab (Herceptin®) [10], pertuzumab (Perjeta®) [11] gibi monoklonal antikorlar bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, HER2 aşırı eksprese eden kanser hücreleri için scFv ve Fab içeren moleküller ile hedeflenmiş ilaç taşınımı yapabildiği gösterilmiştir [12]. Tam antikor kullanılarak yapılan görüntüleme çalışmaları dışında,

scFv'nin yüksek afinite özelliği kullanılarak görüntüleme çalışmalarının da olması, tam antikora alternatif olabileceklerini göstermektedir [13, 14].

Antikor fragmanları genetik mühendisliği teknikleri ile tasarlanmış rekombinant proteinler olarak, *Escherichia coli*, maya, memeli, bitki bazlı ekspresyon sistemi gibi organizmalarda üretilebilmektedir [15]. *E. coli*, literatürde birçok ekspresyon plazmidinin olması, tasarlanmış farklı suşlarının olması ve yüksek seviyeli üretim için farklı protokollerin mevcut olması bakımından en köklü rekombinant protein üretim sistemlerinden biridir. Ayrıca, hızlı çoğalabilmesi ve genetik yapısına ait geniş bir bilgi birikimi olması, rekombinant proteinlerin üretiminde üretim maliyetini de olumlu yönde etkilemektedir [16]. Ancak, scFv molekülü gibi özellikle de disülfid bağı içeren heterolog proteinlerin rekombinant olarak, çözünür formda ve yüksek verimde üretimi ile ilgili bazı sınırlamalar olabilmektedir.

Gram-negatif bakterilerden olan *E. coli*, yapısal olarak iki tane zara sahiptir. Bu zarlar hücreyi sitoplazma ve periplazma olmak üzere iki ana bölüme ayırır [17]. Rekombinant proteinlerin sitoplazmada üretimi sık tercih edilse de, sitoplazmanın indirgeyici koşulları disülfid bağları içeren moleküller için pek uygun değildir. Disülfid bağları içeren proteinlerin doğru katlanabilmesi için daha oksitleyici bir ortama sahip periplazmik ortam veya hücre dışı ortam daha uygundur. Bu yüzden disülfid bağı içeren scFv gibi antikor fragmanları genellikle periplazmaya yönlendirilir [18, 19]. Öte yandan sitoplazmik bölgenin, alan açısından periplazmik bölgeye göre çok daha geniş olması, bilim insanlarını bu bölgeye özgü çözümler bulmaya teşvik etmiştir. Günümüzde sitoplazma koşullarını iyileştirmek için, daha oksitleyici sitoplazmik ortama sahip mutant suşlar, şaperon aracılı ekspresyon gibi alternatif yollar mevcuttur. Rekombinant proteinlerin hücre dışı ekspresyonunda ise oksidatif, geniş bir ortam, saflaştırmada kolaylık, safsızlık sorununun az olması gibi avantajları vardır. Hücre dışı üretimi için, kimyasal ajan kullanımı ile hücre zarının geçirgenliğinin artırılması veya *N*-terminal sinyal peptidinin rekombinant olarak eklenmesi ile r-proteinin hücre dışına yönlendirilmesi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

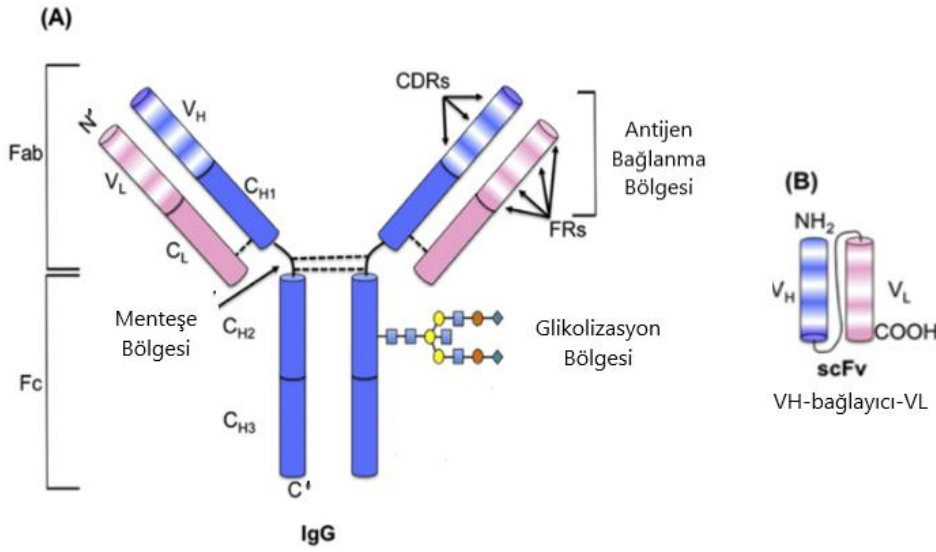
E. coli'de proteinler sitoplazmada sentezlenir; ancak, proteinlerin sitoplazma, periplazma ve hücre dışı ortama taşınması için çeşitli taşıma sistemleri ve yollar

bulunmaktadır [20-23]. Sec (iç zardan salgı) yolağını kullanan LamB, OmpA, MalE, PelB, PhoA gibi sinyal peptitleri içeren proteinler sitoplazmadan periplazmaya geçerek burada katlanırlar. TorA, Pac gibi sinyal peptitlerine sahip proteinler ise öncesinde katlanıp, daha sonra Tat (twin-arjinin taşıma) yolağı aracılığıyla periplazmaya geçerler. SRP (sinyal tanıma molekül sistemi) yolağı DsbA, TorT ve TorB benzeri proteinleri katlanmadan geçiren bir yolaktır [24]. Sinyal peptitleri, N-terminale eklenebildiği gibi C-terminaline de eklenebilmektedir. Periplazmaya özgü sinyal peptitleri ile yapılan üretimlerde, bir miktar hücre dışı ortama sekresyon da görülmektedir [25]. *E. coli* hücrelerinin üç farklı bölgesinde yapılan üretimin de avantajları ve dezavantajları olduğu açıkça görülmektedir. Ancak literatürde, bu üç ortam arasından, ortama özgü sinyal peptitleri ve suşlar kullanarak hangi ortamda üretimin en iyi seçenek olduğunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasının amacı, literatürdeki bu boşluğu doldurarak, yaygın olarak görülen meme kanserinin teşhisi ve tedavisinde önem taşımasından dolayı model molekül olarak seçilen anti-HER2-scFv antikör fragmanının, *E. coli* BL21(DE3) konakçı hücresinde, spDsbA, spTorA ve spMBP sinyal peptitleriyle periplazmik, spYebF ile hücre dışı ve *E. coli* SHuffle T7 Express konakçı hücresinde sitoplazmik üretimlerinin karşılaştırılmasıdır. İlk olarak, anti-HER2-scFv'nin farklı sinyal peptitleriyle periplazmik ve hücre dışı üretimlerine yönelik vektör tasarımları yapılmıştır. Oluşturulan yeni ifade sistemleri ile rekombinant scFv üretim ve saflaştırma verimleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca, saflaştırılan scFv'lerin termal dayanımları DSC ile karakterize edilmiş, antijen afiniteleri ELISA yöntemi ile kıyaslanmıştır. Elde edilen bulgular, büyük ölçekte rekombinant protein üretimi yapan, özellikle de farmasötik endüstrisi için referans sağlayacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Antikorlar

Antikorlar (Ab), immünoglobulin (Ig) olarak da bilinen glikoproteinlerdir [26]. Humoral bağışıklık sistemine ait B hücreleri tarafından salgılanırlar. Kan plazmasında serbest, çözümlü halde veya bir B hücresine bağlı olarak iki farklı şekilde bulunabilirler. Bir antikorun temel işlevi, bağışıklık yanıtı oluşturmak için patojenlere özgüllüğünü kullanarak bağlanmak ve patojeni yok etmek için diğer hücreleri ve molekülleri bilgilendirmektir [27]. Bir antikor, yaklaşık 150 kDa ağırlığında ve 10 nm boyutundadır [28]. Şekilleri büyük "Y" harfine benzer (Şekil 2.1-A). Y harfinin kolları genellikle özdeşdir; polipeptit yapıdaki iki tane özdeş hafif zincir (LC) ve iki tane özdeş ağır zincir (HC) içerir [27]. Y harfinin en üst kısmında uçlarda bulunan değişken bölge (V), antijenlere bağlanma için en önemli bölgedir. Her antikor proteininin ucunda hiper değişken bölge adı verilen, küçük ve birbirlerinden farklı bölgeler vardır. Bu farklı yapıları, diğer bir deyişle farklı antijen bağlama bölgeleri, antikorlardaki çeşitliliği oluşturur. Her değişken bölge farklı bir antijeni tanır. Antikor ve antijenler anahtar-kilit şeklinde etkileşir [27]. Bu etkileşimi elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimler sağlar. Antijenlerin antikora bağlanması, tamamlayıcılık belirleme bölgeleri (CDR) olarak bilinen, antikorun hiper değişken bölgelerini bir araya getiren değişken hafif (VL) ve ağır (VH) zincirler ile gerçekleşir. Y şeklinin sap kısmı veya antikorun C bölgesi sabit kısım olarak bilinir, çok daha az değişkendir; bağışıklık sisteminin diğer bileşenleri ile iletişim kurabilmesini sağlar ve çeşitli antikor sınıflarında bulunan dizideki küçük farklılıklar ile korunur. Kristallenebilir fragman (Fc) bölgesi, CH1, CH2 ve CH3 isimli üç bölümden oluşur [29] ve bağışıklık sisteminin diğer bileşenleri ile iletişim kurabilmesini sağlar. Bunu, korunmuş bir glikosilasyon bölgesi içermesi sayesinde gerçekleştirir [30]. Fc reseptörüne (FcR) ve tamamlayıcı proteinler gibi diğer bağışıklık moleküllerine bağlanarak belirli bir antijen için uygun bir bağışıklık yanıtı oluşturmasını sağlar. Glikoprotein yapıdaki antikorların FcR'lerine olan afinitesi ayarlanabilir. Bu da korunmuş amino asitlerine ek olan glikanların ekspresyonu ile gerçekleşir [26, 30].



Şekil 2.1. A: Tam antikor (IgG), B: tek zincirli değişken fragmanı (scFv) [3].

Antikorlar, ağır ve hafif polipeptit zincirlerinden oluşur ve bu tür proteinlerin tümü için genel immünoglobulin terimi kullanılır. Sahip oldukları ağır zincir türü ile ayırt edilebilen, memelilerde bulunan birincil immünoglobulin sınıfı IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE'dir [31]. Bunun yanında memelilerde bulunmayan da IgY, IgW adında iki izotipi de vardır. Ayrıca beş tip memeli Ig ağır zinciri vardır: α , δ , ϵ , γ ve μ . Farklı ağır zincirler boyut ve bileşim bakımından farklılık gösterir. Aminoasit sayısı buna örnek verilebilir. Memelilerde lambda (λ) ve kappa (κ) olarak adlandırılan iki tip immünoglobulin hafif zinciri vardır. İnsanlarda IgM antikorlarının beş Y-şekilli birimi vardır. Bu yapı, 10 hafif zincir, 10 ağır zincir ve 10 antijen bağlama bölgesi içerir. IgG ise Fc reseptörü sayesinde insan serumunda bulunan baskın Ig sınıfıdır [27].

Başlıca immünoglobulin sınıflarına ek olarak, belirli bir hayvan türünün tüm üyelerinde her Ig sınıfının ağır zincirindeki disülfid bağları, menteşe bölgesinde amino asit farklılıkları gibi küçük farklılıklara dayanan birkaç Ig alt sınıfı mevcuttur. İnsanlarda IgG'nin dört alt sınıfı vardır: IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4.[31].

Antikorların terapötik amaçla yaygın olarak kullanımı, daha iyi karakterize edilmeleri ihtiyacını yaratmıştır. Hayvana ait serumdan elde edilen poliklonal antikorun

terapötik amaçla kullanıldığında istenen özgül antikor yüzdesinin düşük olması ve istenmeyen bağlanmalar oluşturması, kontaminasyon riski gibi sorunlar ile karşılaşmıştır. Bu sebeple 1975'te César Milstein, Georges Köhler ve Niels Jerne'in geliştirdikleri yöntem ile tek epitopa özgü monoklonal antikorlar üretilmiştir [32]. Monoklonal antikor pazar payı 2018'de yaklaşık 115,2 milyar dolar iken, bir yıl sonra 150 milyar doları bulmuştur. 2025 yılı sonunda ise 300 milyar doları bulması beklenmektedir [33].

2.1.1. Antikor Fragmanları

Antikorum yapısını bozmadan boyutu küçültülerek bazı yapısal, fonksiyonel ve farmakokinetik modifikasyonlar yapılarak oluşturulan parçalara antikor fragmanları denilmektedir. Araştırmacılar, bu fragmanların tedavide kullanımında antijene bağlanmasını geliştirmek, yarı ömrünü uzatmak, etiketleme ile tıbbi teşhis ve takipte kullanmak gibi amaçları hedeflemektedirler [2]. Boyutları 6 kDa'dan başlayarak 150 kDa'a kadar çıkmaktadır. Antijene karşı gösterdikleri afiniteleri, difüzyon hızları, tümör penetrasyonları, böbrekten kolay atılabilirlik gibi özelliklerle birbirlerinden ayrılırlar [4].

Genetik mühendisliği teknikleri, farklı özgüllük oranları olan antikor fragmanlarının üretilmesine zemin hazırlamıştır [15]. İlk olarak Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikorların üretilmesi ile antikor fragmanlarının tarihsel süreci 1975 yılında başlamıştır [34]. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylan ilk antikor olan OKT-3 (Orthoclone) hibridoma teknolojisi ile üretilmiş ve onayını 1986 yılında almıştır [2]. Fare veya tavşan gibi bir konak türünden bir antikorum değişken alanını, insan gibi farklı bir türden bir antikorum sabit alanı ile birleştirilmesini içeren "kimerik antikor teknolojisi" ile devam etmiştir [35]. 1985 yılında Smith [36] tarafından ilan edilen "faj görüntüleme teknolojisi" farklı özelliklere sahip rekombinant antikor ve antikor fragmalarının geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Mutasyon ile antikor veya antikor fragmanlarını özelleştirerek hedeflenen antijen molekülüne yönlendirilebilir hale getirilmiştir. Bakteriyofajın (genellikle M13 bakteriyofajı kullanılır) bağlanması dikkate alınarak, buna özgün gen dizilimi olan proteinin genetik mühendisliği ile üretilmesi sağlanmıştır [32, 34].

Hibridoma, faj görüntüleme teknolojisi, ribozomal görüntüleme, mikrobiyal hücre yüzeyi görüntüleme [18] gibi birçok genetik mühendisliği tekniği ile oluşturulmuş antikor fragmanları en genel haliyle üç ana başlıkta incelenebilir. İlki, antikorun değişken parçasına (Fv) odaklanan versiyon yani Fv-bazlı versiyonlardır. Bu başlığa tek zincirli değişken fragmanları (scFv), iki farklı scFv'nin bağlanması ile oluşturulan dimer scFv (diabody) ve farklı şekilde bağlanma içeren tandem-scFv, yeniden hedeflemeye yönelik iki tane afinite kısmı içeren DART proteini, birbirine bağlanmış birden fazla Diabody ile oluşturulmuş TandAb dahil edilmektedir. Bir diğer ana başlık ise Fab bazlı versiyonlardır. Bunlar antijen bağlanma bölgesi içeren tek bir Fab veya iki tane Fab formatı içeren F(ab')₂ fragmanıdır. İki fragman antikorun menteşe bölgesinden bağlanır. Üçüncü ana başlık olarak alan (domain)-antikorları (dAb'ler) ve nano gövdeler (nanobodies) alt başlıklarına ayırabileceğimiz tek alanlı antikor fragmanları (single-domain antibodies, sdAb) kullanılmaktadır. VH ve VL özellikleri aynı kalırken dimerizasyon oluşumunu engellemek amacıyla dAb'ler oluşturulmuştur. Nano gövdeler ise VHH alanı içeren antikor fragmanlarıdır [17].

2.1.2. Tek Zincirli Değişken Fragmanı (ScFv)

Bir tam Ig molekülünün Fab bölgesinde bulunan değişken alanlar tüm antikora ait özgüllük görevini üstlenmesi, Fv bölümünü Ig molekülünün özgüllüğüne sahip en küçük birimi yapar (Şekil 2.1-B). İlk olarak 1988'de rapor edilen tek zincirli değişken fragmanları (scFv'ler), sentetik esnek peptid parçası ile bir hafif zincirin bir V alanına bağlanmış, bir ağır zincirin yalnızca V alanını içeren antikor parçalarıdır [37]. Bu peptid parçasının büyüklüğü, içerisinde bulunan amino asitler, proteinin doğru katlanmasını etkilemektedir [38]. Polipeptit yapılı bağlayıcının amino asit miktarı 10-25 adet arasında değişiklik göstermektedir [1, 39]. Bağlayıcı esnekliği, VH-VL bağlantı noktası ve çözünürlüğü yapısal olarak önemlidir. Genellikle glisin (Gly) aminoasiti esneklik ile ilişkilendirilir. Çözünürlük ise serin (Ser) aminoasit miktarı ile birlikte artış göstermektedir. VH'nin C terminaline VL'in N terminali bağlanabildiği gibi, VH'in N terminaline VL'in C terminali de bağlanabilir [40]. scFv'nin değişken alanları antikor-antijen bağlanmasındaki anahtar kilit rolünü üstlenen, tamamlayıcı-belirleyici alanlar (Complementarity-Determining Regions, CDR) içermektedir. CDR'lere hiper-değişken bölgeler de denilmektedir. Bu alanları çerçeve bölgeleri

(FR'ler) bir arada tutmaktadır. CDR'lerin antijen ile bağlanmaya etkileri de kendi içlerinde değişiklik göstermektedir [18, 37].

Terapötik kullanım için scFv molekülünün birçok avantajı mevcuttur. Glikozilasyon gibi zorlayıcı post-translasyonel modifikasyonlar gerektirmemesi ve boyutlarının yaklaşık olarak 27 kDa olması, bakteri gibi prokaryot ve maya gibi tek hücreli ökaryot olan, kolay ve ulaşılabilir sistemler içerisinde büyük ölçekte üretilmelerine olanak sağlar.

ScFv molekülü zayıf ve ağır zincir arasında denge sorunu oluşturmaz. Bu sebeple hızlı ve yüksek verimli üretim gerçekleştirilebilir. Büyüklüğü 150 kDa'nu bulan tam antikorun, scFv molekülüne kıyasla üretilmesi pahalı ve zaman alıcıdır [27, 36]. Biyolojik üretimi için memeli hücreleri veya hayvanların kullanılması, bu zorlukları arttırmaktadır. Ayrıca scFv'nin boyutunun küçük olması, radyoterapi gibi alanlarda kullanılan kan klirensi hızını artırır. Bu özellik, hastalık için tanı uygulamalarında da avantaj sağlamaktadır [41]. Yüksek özgüllüğe sahip olması sayesinde erişimi zor olan epitoplara kolay erişebilmesi, scFv'nin kanser tedavilerinde yaygın olarak seçilmesine neden olur [42]. Floresan etiketli scFv dimerlerinin spesifik hücre tiplerini saptamak için etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır [41].

İmmünoterapilerde ise bağışıklık sistemini harekete geçirmeden hedefe bağlanabilmesi büyük avantaj oluşturur. Aksi halde, bağışıklık hücresi aktive olursa sitotoksik etki yaratabildiği gibi hücreyi fagositoza da sürükleyebilmektedir. ScFv bu darboğazı Fc bölgesi içermeyerek aşar [17]. Ancak bu eksikliğin bazı dezavantajları mevcuttur. Tam IgG'ye kıyasla düşük termostabiliteye sahip olması ve agregasyona meyilli olması istenmeyen bir immün reaksiyonunu tetikleyebilmektedir. Agregasyon sorunu için ise aktif protein üretilebilen özel suş kullanımı veya agregat olmuş proteinin yeniden katlanmasını sağlamak gibi çözümler mevcuttur [18]. Ayrıca Fc reseptörünün eksikliği de yarı ömrünü kısaltması nedeniyle tedavide doz miktarının ve/veya sıklığının artışı ile sonuçlanır [17]. Fc glikosilasyonu FcγR ile antikor etkileşimini de etkilemektedir [18]. ScFv'lerin bağlanmaları gereken antijene monovalent bağlanması (yani düşük K_d), kendi afinitileri fazla olsa bile bazı durumlarda kısıtlamaya neden olur. Bağlandıkları yerden ayrılmaları daha çabuk olabilir, bu da hedef üstündeki tutunma sürelerini kısıtlayabilir [43].

Genetik mühendisliği teknikleri ile scFv molekülünün kolay işlenebilir olması sayesinde bu dezavantajların çoğu giderilmektedir. Örneğin, scFv'nin polietilen glikol (PEG) molekülü ile birleştirilmesi, boyutunu büyütürken yarılanma ömrünü uzatmaktadır [17]. Multimerizasyon amacıyla oluşturulan, çeşitli özgül VL ve VH peptidi içeren multimerik scFv'ler daha fazla afinite yeteneğine sahiptir ve aynı anda birden fazla proteini tanıyabilmektedir.

ScFv fragmanları, dimerik (diabody, 50-60 kDa), trimerik (triabody, ~85 kDa) ve tetramerik (tetrabody, ~120 kDa), olmak üzere multimerize edilmiştir [41]. Dimerik yapıda scFv'ler, iki farklı scFv molekülü kendi içlerindeki bağlar bozulmadan bağlanırsa "tandem scFv", iki scFv'nin VL ve VH alanları birbirine bağlanırsa "diabody" olarak adlandırılmaktadır. Bu bispesifik moleküller iki adet antijeni tanıyabildikleri için efektör terapötiklerdir [44]. İki yönlü olmaları, hem kanserli dokuyu hem de anti-kanser ilacı hedefleyebildiği için gen terapilerinde taşıyıcı olarak da kullanılmaktadırlar [41].

Sonuç olarak, bu çeşitlilik sayesinde scFv'nin biyoyararlanımı oldukça geliştirilmiştir [41]. ScFv molekülünün bu çok yönlü özellikleri, onu rekombinant antikor parçaları arasında en yaygın olarak kullanılan molekül haline getirmiştir [18]. Ancak, rekombinant üretim için uygun konakçı hücrenin geliştirilmesinin yanı sıra, çözünür formda ve disülfid bağlarına sahip scFv'nin yüksek üretim verimleri ile üretilmesi ihtiyaçları halen devam etmektedir. Yüksek üretim verimleri ile scFv'nin teranostik kullanımına yönelik maliyetlerinin düşürülmesi mümkün olacaktır.

2.2. *Escherichia coli*

Rekombinant protein ekspresyonunda öncelik, tüm sürecin ilk basamağını oluşturan ekspresyon yapılacak konakçı hücrenin doğru seçilmesidir. Birçok konak kullanılarak ekspresyon yapılabileceği gibi, verim, üretim, zaman gibi parametreler açısından en iyi seçenek belirlenmelidir. Bilinen konakçı organizmalar arasında *Escherichia coli*, rekombinant protein üretiminde popüler bir organizmadır [45]. Çeşitli avantajlarının içinde en büyük avantajı ise yadsınamaz bir literatür bilgisine sahip olunmasıdır.

E. coli suşlarının genel olarak sayıca kendini ikiye katlaması 20 dakika sürmektedir. LB ortamı, TB ortamı veya minimal besi ortamı gibi yetiştiği ortama göre değişiklik

gösterse bile, bu süre mikroorganizmalar arasında hızlı çoğalabildiğini gösterir [46, 47].

E. coli farklı özellikler kazandırılmış birçok suşa sahiptir. Örneğin Shuffle™ suşu sitoplazmik ortamda proteinlerde disülfid bağı oluşumuna olanak sağlar. AT ve GC'den zengin olan genler için Rosetta™ suşu önerilirken, toksik proteinlerin aşırı ekspresyonunda C41(DE3) suşunun kullanımı önerilmektedir. En yaygın kullanımlardan biri olan BL21(DE3) suşu ise T7 promotörü ile çalışmaktadır. BL21-Star suşu ile mRNA'nın stabilitesi arttırılabilir. BL21 suşu ise rekombinant proteinlerde proteaz degradasyonu az olan bir versiyonudur [48].

Ayrıca, ekspresyonda kullanılan plazmit vektörlerin çeşitliliği açısından da oldukça zengindir. Bu zenginlik, *E. coli*'nin genetik olarak kolay manipüle edilebilmesi ile oluşmuştur. Plazmid çeşitliliği promotör bölgesine, seleksiyon yöntemine, etiket veya füzyon partneri içerip içermemesine, proteaz ayrılma bölgelerine bağlıdır. Farklı replikasyon başlangıç (ori) bölgeleri de içerebilmektedir. Replikasyon başlangıç bölgesi seçimi plazmit kopya sayısına, konakçı türüne, birden fazla plazmit kullanılacak bir ekspresyon ise, plazmidlerin uyumuna etki eder. Aynı bölgeyi içeren plazmitler yarışır ve istenmeyen durumlar ortaya çıkabilir [49]. Promotör bölgesi transkripsiyon başlangıcını düzenler. İstenen protein dışında toksik etkiye sahip olan proteine de yönelebileceği için doğru kullanımı önemlidir. Güçlü bir promotör, hücrenin kendi proteinlerinin yarısı kadar istenen proteini oluşturabilmelidir. Örneğin lac, tac, ve trc, *E. coli* için güçlü sayılan promotör bölgeleri arasındadır. pBAD promotör sistemleri zararlı etkiye sahip proteinlerin ekspresyonu için kullanılabilir gibi, *E. coli*'de çözünür olan proteinin geri kazanılması için de kullanılabilir. T7 promotörü ise pET vektörleri ile yaygın olarak kullanılan promotör bölgeleri içinde yer alır [45].

Promotör ve replikasyon bölgesi dışında etiket kullanımı da, vektör çeşitliliği sağlayan bir diğer faktördür. GFP (yeşil floresan proteini) gibi etiketler ekspresyon sürecini takip etmek ve 6xHis gibi etiketler proteini saflaştırmak için kullanılabilir. SUMO (küçük ubiquitin benzeri değiştirici) veya MBP (maltoz bağlayıcı protein) gibi etiketler çözünürlüğü arttırabildikleri gibi, FLAG gibi etiketler ekspresyon ürününü *E. coli* hücrelerinden uzaklaştırılmasını basitleştirirler [50]. Örneğin bir çalışmada, *E. coli*

BL21 (DE3) için rekombinant proteinlerin hücre dışı ortamına salgılanması için selülazın (Cel-CD) katalitik bir alanı taşıyıcı protein olarak ve N-terminali sinyal dizisi olarak kullanılmış ve daha yüksek saflıkta protein elde edildiği görülmüştür [51]. *E. coli*'de biyoaktif protein üretimini sağlamak için sekiz füzyon proteini; Origami, Shuffle ve BL21(DE3) suşları denenerek yapılan bir çalışmada MBP etiketi aracılığıyla yapılan üretimin çözünürlüğü önemli ölçüde yükselttiği gösterilmiştir. SHuffle T7 Express suşu kullanılarak biyolojik olarak aktif rekombinant protein üretiminin gerçekleştiği farklı çalışmalar da mevcuttur [21, 52, 53]. Agregasyon sorununu çözmek için 6xHis, GST ve MBP gibi farklı füzyon etiketlerine sahip scFv ve herhangi bir etiket içermeyen scFv antikor parçaları, *E. coli*'de eksprese edilerek kıyaslanmıştır. MBP füzyonlu scFv, yeniden katlanma ve çözünürlük açısından daha verimli olduğu görülmüştür [54].

Rekombinant proteinlerin üretiminde kullanılan etiketler, proteinin yapısını ve aktivitesini etkileyebileceği için çıkarılıp atılmaları gerekebilmektedir. Plasmid vektöründeki çeşitliliğin son basamağı seleksiyon işareti seçimidir. Bunlar genel olarak, farklı olan genin tanınması için kullanılan antibiyotik direnç genleridir. Antibiyotikli ortam ile çoğalma yeteneğine sahip koloniler yeni oluşturulmuş gen dizisine sahiptir ve doğru bir şekilde ifade edebilmektedir. *E. coli* için popüler seleksiyon işaretleri kanamisin, tetrasiklin veya ampisilin antibiyotiklerine direnç gösterenlerdir [49].

E. coli erlenden reaktöre giderek büyüyen üretim sürecine kolay adapte olabilen bir organizmadır. Erlen ile çalkalamalı inkübatörde litrede miligram veya mikrogram gibi miktarlarda protein üretse de, reaktörde daha fazla miktarda (g/L düzeyinde) üretebilmektedir. *E. coli*'nin bu özelliğini geliştirmeye ve farklı çoğalma modellerine dair yayınlanmış birçok protokol vardır [46, 55-59].

Tüm bunların yanı sıra, yaşanan bazı zorluklar da mevcuttur. Doğru post-translasyonel modifikasyonların oluşturulamaması, rekombinant proteinlerin üretiminde engel teşkil etmektedir. Ancak, *Escherichia coli*'ye transfer edilen N-bağlı glikoprotein üretme yeteneği sayesinde, glikosilasyon etiketleri (GlycTags) kullanılarak glikosillenmiş proteinler de artık üretilebilmektedir [60].

E. coli sitoplazmasında yüksek seviyeli ekspresyon sonucu rekombinant protein yanlış veya eksik katlanarak agregere olabilir. Bu durumda biyolojik olarak aktif yapıda olmayan inklüzyon cisimciği oluşması ile sonuçlanır. Inklüzyon cisimcikleri çözdürülüp yeniden katlanabilirler, ancak bu süreçte ikincil yapılarını kaybedebilirler. Ayrıca bu süreç zaman alıcı ve maliyetlidir. Bu durumun oluşmaması için kültüre ederken kullanılan koşullar optimize edilebilir veya şaperon gibi yardımcı proteinler kullanılabilir. Düşük yoğunlukta veya erken logaritmik fazda indüklemek de çözüm olabilir [45].

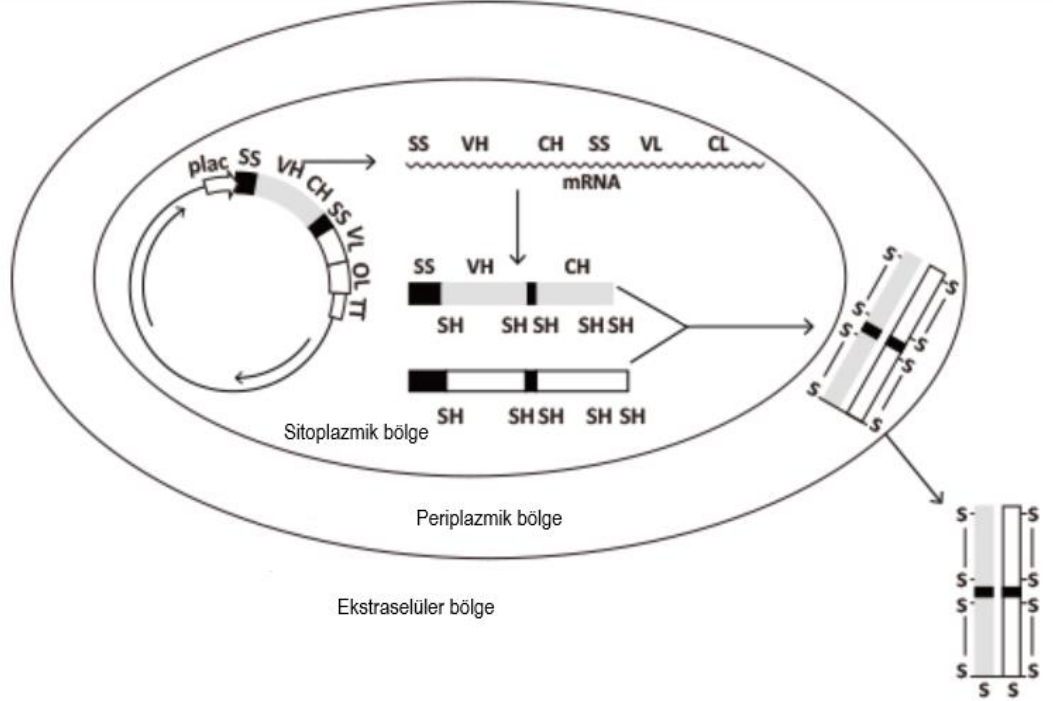
Inklüzyon cisimciği oluşumu her zaman istenmeyen bir durum değildir. Konakçı hücreler için zararlı etkiye sahip proteinlerin ekspresyonunda kullanılabilir. Yüksek düzeyde ifadeye uygun olması ve sitoplazmadan basit bir şekilde ayrışabilmesi açısından avantaja çevrilebilen bir durumdur [50].

Kodon eğilimi de kontrol altında tutulması gereken bir özelliktir. Aksi takdirde translasyon gecikebilir veya erken durabilir, proteini oluşturan yapı taşlarının yanlış bağlanması gerçekleşebilir. Genetik düzeyde çerçeve kayması durumu yaşanabilir. Ayrıca asetat gibi metabolizma artışı birikimi de ekspresyon sonucu elde edilen ürünün yapısını bozabilmektedir [45]. Doğru genetik mühendisliği teknikleri ile istenen rekombinant proteini üretmek artık olanaksız değildir. Fakat her klonlamada olabileceği gibi ekspresyon gerçekleşmeyebilir veya protein hareket edemeyip bir noktada birikebilir. Konak hücre yeterince çoğalmamış olabilir. Bu yüzden klonlama öncesi seçim için yeterli araştırmayı yapmak, doğru kombinasyonları bir araya getiren bir tasarımı her proteine özgü yapmak oldukça önemlidir [46].

2.2.1. *E. coli*'nin Üç Bölmesi ve Sinyal Peptidleri

E. coli gram negatif bir bakteri olduğu için iki tane zarı vardır. Birinci zar hücrenin sitoplazmasını periplazmik bölgeden ayırır. İkinci zar ise periplazma çevresini kaplar ve hücrenin sınırlarını belirler [61]. Peptidoglikan yapıdaki zarla ayrılan periplazmik bölgenin viskozitesi yüksektir [62]. Ürettiği kendine ait veya yabancı proteinleri, Şekil 2.2'de belirtilen bölgelerden hangi bölüme yönlendirdiği proteinin katlanmasını, modifikasyonlarını, yapısını ve saflaştırılma şeklini etkilemektedir. Bu yönlendirmede kontrolü elde tutmak için sinyal peptidi seçiminin doğru yapılması rekombinant protein üretiminde kritik öneme sahiptir. BLAST, GenBank, SinalP,

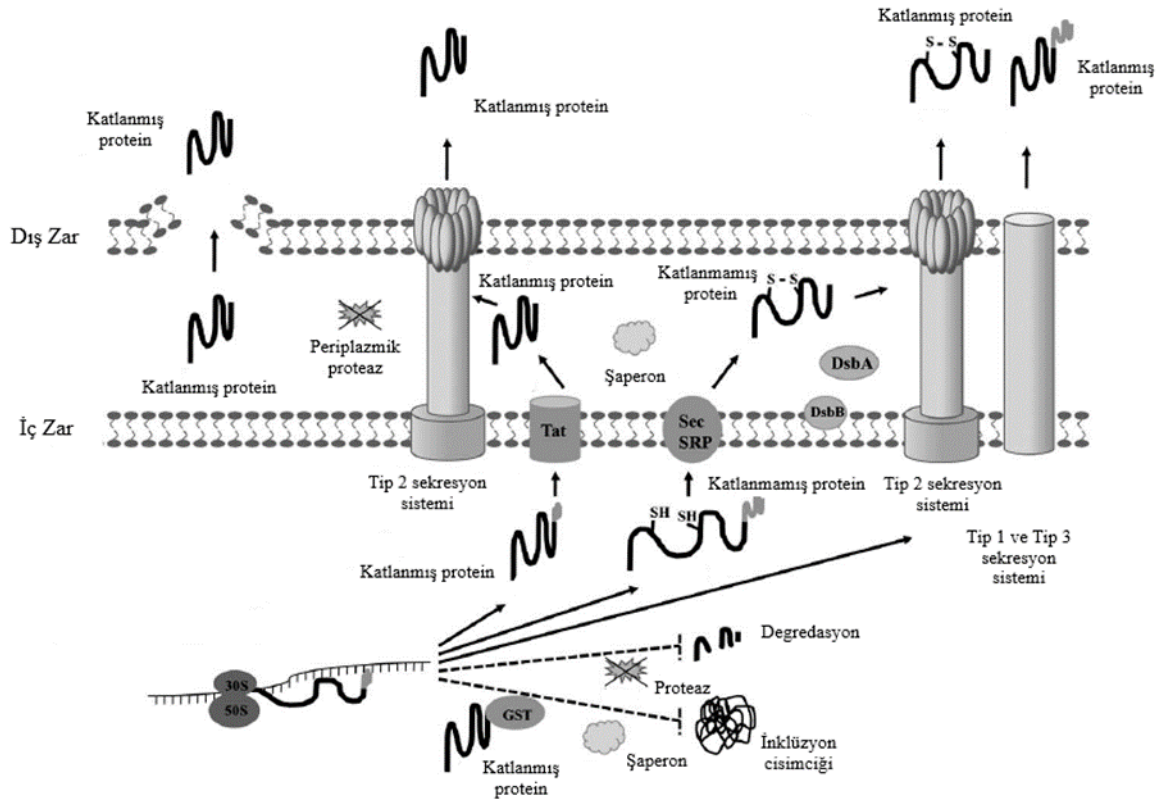
Soluprot, Protein-sol vb. programlar ile proteinin ve sinyal peptidinin yapısı, katlanması, hidrofobisitesi, çözünürlüğü gibi özelliklerinin incelenmesi etkili ve doğru ekspresyon için gereklidir [63-68].



Şekil 2.2. *E. coli*'de çözünür antikor fragmanı için ekspresyon yolu [69].

Sitoplazma, hücre hacminin yarıdan fazlasını oluşturmaktadır. Üretilen proteini saklama açısından periplazmik bölgeye kıyasla daha fazla alana sahiptir [70]. Periplazmanın ise oksidatif bir bölüm olması, scFv molekülünün içerdiği disülfid bağının oluşumu için gerekli imkanları sunar. Böylelikle proteinin doğru katlanmasına ek olarak kararlı bir molekül olmasını da destekler. Ancak periplazmik alanın oldukça küçük ve dar oluşu sayıca fazla olan proteini saklama açısından sorun teşkil etmektedir [71, 72]. Tüm hücre hacminin yaklaşık olarak onda biri hacime sahiptir [62]. *E. coli*'de rekombinant proteinler, farklı yollar izleyebilirler. N uçlarına takılan bir sinyal peptidi ile periplazmik bölgeye yönlendirilerek Sec, Tat veya SRP translokonunu kullanabilirler [67, 73]. Sinyal peptitleri çoğunlukla yükü pozitif olan bir kısım içerirler (n-bölgesi). Bunun yanında apolar hidrofobik kısım (h-bölgesi) ve polar olan bir nötr kısım (c-bölgesi) ve negatif yüklü pro-bölge de içermektedirler. Sinyal peptitlerine ait n-, h-, c- ve pro-bölgeleri birlikte etki göstermektedir. *E. coli*'de en genel haliyle bilinen üç tip salgı sistemi vardır. Bunlar Şekil 2.3.'de gösterildiği

gibi sinyal peptidi aracılığıyla katlanmış olarak hücre dışına çıkan Tip 1 ve Tip 3 sekresyon sistemleri, farklı yollar içeren Tip 2 sekresyon sistemidir.



Şekil 2.3. *Escherichia coli*'de salgı üretimini artırma stratejileri [24].

Sinyal peptitleri sentetik, doğal (*E. coli*'ye ait) veya farklı organizmadan olabilir. Ancak *E. coli*'nin kendine ait olanlar daha efektif kabul edilmektedir. Katlanmamış bir proteini, katlanmış olarak periplazmaya yönlendirebilen LivK (lösin bağlayıcı protein alt birimi), LamB (maltoporin), PeIB (pektat liyaz alt birimi), iç zardan salgı yolağı olarak da bilinen Sec yolağına kullanmaya yönlendiren sinyal peptitleridir. MalE (maltoz bağlayıcı protein alt birimi), PhoA (alkalin fosfataz alt birimi), OmpA (dış zar proteini) sinyal peptitleri de bu yolağı kullanmaktadırlar. Sinyal tanıma molekül sistemi yani SRP yolağına DsbA (disülfid oksidoredüktaz), TorT (periplazmik duysal protein), TolB (hücre zarf kompleksinin alt birimi) gibi sinyal peptitleri kullanmaktadır. Sec ve SRP yolağına kullanan proteinler Tip 2 sekresyon sistemi sayesinde hücre dışında da bir miktar gözlenebilirler. Pac (penisilin asilaz) ve TorA (trimetilamin N-oksit redüktaz I alt birimi) sinyal peptitleri, Twin-arjinin taşıma (Tat) yolağına kullanmaktadırlar. Tat yolağı, Sec yolağına kıyasla verimi daha düşük ve

protein taşınımı daha uzun süren bir yoldur. Ancak tam olarak katlanmış proteini taşıyabilme özelliğine sahiptir. Cheng vd.'nin 2014 yılında yaptığı çalışmada OsmY ve PelB sinyal peptidi ile bir araya getirilen scFv, hem N-terminalinden hem de C-terminalinden bağlanarak farklı kombinasyonları denenmiştir. Çözünürlük ve salgılama verimleri incelenmiş, OsmY ile yapılan iki kombinasyonda da, spPelB ile olandan daha iyi sonuç vermiştir [25]. 2020 yılında Mirzadeh vd., yeni bir translasyon başlatma bölgesi olan değişik sinyal peptitleri ile *E. coli*'nin periplazmasına gönderilen proteinlerinde verim artışı yaşanacağını ileri sürmüşlerdir. Kullandıkları sinyal peptitlerinin gen dizileri aynı kalmıştır. Translasyon başlatma bölgesinin etkinliği ile sinyal peptidi verimi arasında bir ilişki olduğunu bulmuşlardır [74]. Diğer bir çalışmada, PelB sinyal peptidi aracılığıyla üretilen anti-HER2 scFv'nin *E. coli*'nin üç bölmesi için incelenmiştir. Farklı üretim saatleri karşılaştırılmış, sonuç olarak sinyal peptidi ile periplazmaya yönlendirilen bir üretimin gerçekleştiği gözlenmiş, 17. saatten sonra ekstrasellüler bölgede parçalanmış hücre birikimi olduğu görülmüştür [75]. Bunların yanında pelB sinyal peptidi ile yönlendirilmiş anti-EGFRvIII scFv'ye ait bir çalışma da bulunmaktadır [76]. Periplazmik scFv üretimi için sakkaroz ve sorbitol derişimlerine dayalı olarak osmotik koşul oluşturulan bir yöntem denenmiş ve dört buçuk kattan fazla verim artışı gözlenmiştir [57].

Literatürde hücre dışı bölgeye yönlendirilmiş olarak mevcut olan bir çalışmada, Aflatoksin B1'e karşı scFv üretilmiştir [77]. Rekombinant proteinlerin doğru katlanması ve kolay saflaştırılması göz önüne alındığında hücre dışı ortama salgılanması daha kullanışlı bir yöntemdir [78]. Triton X-100 gibi maddeler kullanarak veya nokta mutasyonlar yapılarak dış zarının geçirgenliğini arttırabildiği, böylelikle proteinlerin ekstrasellüler bölgeye yönlendirilebildiği çalışmalar vardır [77, 79]. OsmY [80] ve HlyA sinyal peptidi [59] gibi YebF [78, 81] sinyal peptidi kullanarak farklı hücre dışı ortama salgılama yöntemleri içeren çalışmalar olsa dahi, diğer yöntemlere kıyasla ekstrasellüler ortama salgılanmasıyla scfv üretimine dair çalışmalar yetersizdir [82]. 2011 yılında şaperonlarla scFv üretimi üstüne yapılan bir çalışmada sitoplazmik, periplazmik ve ikisinin farklı eşleşmeleri ile yapılan üretimler kıyaslanmıştır. Hücre dışı üretimde Skp ve FkpA adlı periplazmik şaperonların birlikte kullanımının önemli bir etkisi olduğu, ancak sitoplazmik şaperonlar ve bu şaperonlarla yapılan eşleşmelerin bir ilişkisi olmadığı görülmüştür [69].

Sitoplazmik bölge, daha fazla protein miktarını muhafaza edebilse de, dezavantajı indirgeyici bir ortam olmasıdır. Bu yüzden aktif formda protein (özellikle antikor parçaları) üretmek için gerekli ortam sitoplazmada yoktur [83]. Sitoplazmada üretilen scfv gibi antikor parçaları katlanamaz veya yanlış katlanırlar. Sonuçta topaklaşır ve kararsız bir duruş sergilerler. Bu sorun yeniden katlanma gibi bir çözümlerle giderilse de, bu süreç oldukça zaman alıcı ve pahalıdır [84].

Tüm bu nedenlerden ötürü, *E. coli*'de doğru katlanmış olarak ve daha verimli bir şekilde rekombinant protein üretimi için değişik yollar deneme ve yeni yollar keşfetme ihtiyacı bulunmaktadır [85].

Sitoplazmik üretimde aktif scFv molekülü için sinyal peptidi ilavesiyle yapılan çalışmalar vardır. Molekülün hem N- ucu hem de C- ucu kullanılmıştır.[86, 87] Öte yandan bu sinyal peptitlerinin asıl proteine zarar vermeden, yani çözünürlüğünü ve aktivitesini etkilemeden çıkarılıp atılması kolay bir işlem değildir [88].

Genetik mühendisliği teknikleri ile oluşturulan yeni *E. coli* suşları sayesinde hücre sitoplazmasında, yapısında disülfid bağları olan antikor parçalarının üretimi sağlanmıştır. Yeni *E. coli* suşlarında redüksiyon ve oksidasyon reaksiyonlarına müdahalede bulunulmuştur [22, 89, 90]. Glutasyon redüktaz ve tioredoksin redüktaz genlerindeki mutasyon ile oluşturulmuş Origami suşu disülfid bağı oluşumuna uygun bir *E. coli* suşudur [49]. Ticarileştirilmiş bir örnek olan *E. coli* SHuffle T7 Express (New England Biolabs, ABD) suşunda oksitleyici gücü olan bir alan oluşturulmuştur. Böylelikle rekombinant protein aktif formda kalabilmesi sağlanmıştır. Ek olarak bu suşta, proteinlerin doğru katlanabilmesi için disülfür izomeraz (DsbC) molekülü de kullanılmaktadır [22, 23].

E. coli'de sitoplazma periplazma ve ekstraselüler bölge arasında gerçekleşen protein trafiği için farklı mekanizmalar mevcuttur [24]. Literatürde şu ana kadar, *E. coli* bakterisinin hücre dışı, sitoplazma ve periplazma olarak üç bölmesini bir arada içeren, üretime özgü sinyal peptitleri ve suş kullanılan, di-sülfid bağı içeren scfv üretimine ait optimal üretim yerinin hangi bölüm olduğunu kıyaslayan sistematik bir çalışma bulunmamaktadır.

2.3. İnsan Epidermal Büyüme Reseptörü 2 (HER2)

Yayımlanan en güncel verilere göre dünya çapında diğer kanser türleri arasında yüzde onun üstünde bir oranla en çok teşhis edilen kanser türü meme kanseri olmuştur. İki milyonu aşkın kadın hasta sayısı ile en sık görünen kanser türü olmakla birlikte, kadınlarda mortalite oranı ile de ilk sıradadır. Ülkemizde ise kadınlarda en sık görünen kanser türüdür [91].

HER2 (İnsan Epidermal büyüme faktörü Reseptörü 2), EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) ailesine ait bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür [9]. HER yolağındaki sinyal iletimi kompleks ve detaylı bir süreçtir. Herhangi bir adım eksik gerçekleşebilir, tersine çevrilebilir, başka bir süreç ile bastırılabilir. Sonucunda mutasyonlar gibi fiziksel veya yapısal değişiklikler meydana gelmektedir [92]. HER2 aşırı ekspresyonu, meme kanseri ile doğrudan ilişkilidir ve olumsuz prognostik etkiye sahiptir. Aşırı eksprese olmuş HER2 ile hem birincil ve hem de metastatik tümörlerde karşılaşılabilir [93]. HER ailesi reseptörleri yapısal olarak dört sınıfa ayrılır HER1: (EGFR) veya Erb-b1, HER2: Erb-b2, HER3: Erb-b3, HER4: Erb-b4. HER2, diğer tüm aile üyelerinin aksine bir liganda bağlanmak yerine heterodimerizasyon ile aktive olmaktadır. HER2 diğer aile üyelerinin ligandları ile uyarılarak diğer reseptörlerle heterodimer olabilir [93].

EGFR ve HER2 gibi hedeflere yönelik, antikor bazlı meme kanseri tedavileri kullanılsa da, tek başlarına tümöre karşı etkileri düşüktür. Bu yüzden anti-tümör etkisi olan moleküllerle konjuge edilerek de kullanılmışlardır. Literatürde, Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi tarafından onaylanan ilk anti-HER2 mAb olan trastuzumab kullanılarak yapılan anti-HER2 BiTE gibi trastuzumab temelli güncel çalışmalar da mevcuttur. İlk onayı alan hümanize trastuzumabın ardından, 2012 yılında hümanize pertuzumab ve takiben 2013 yılında ise ilaç konjugeli trastuzumab da FDA'dan onay almıştır [94]. En son onaylanan Margetuximab, Fc-temelli kimerik yapıda, anti-HER2 özellikli bir monoklonal antikor çeşididir [92]. Antikorların yanı sıra, scFv gibi özgüllüğü yüksek olan bir antikor parçası kullanılarak yapılan çalışmalar da mevcuttur. Bir anti-HER2 scFv molekülü ile oluşturulan ultra küçük silika nanopartikül ile, hem tümörü hedeflemede yüksek verimlilik kullanılarak zarar görmüş dokuyu görüntüleyebilmek, hem de efektif bir şekilde ilaç dağıtımını yapabilmek mümkün olabilmektedir [13]. Buna ek olarak, kanserli hücrelerde mAb

ile gerçekleşen endositoz reaksiyonu aracılığıyla, anti-HER2 scFv ve Fab molekülü ile oluşturulmuş immüno-lipozomları kullanılarak ilaç dağıtımı yapılabildiği ve antitümör etkiye de sahip olabildikleri gösterilmiştir [12]. HER2'ye karşı 2018 yılında yapılan bir çalışma da bu durumu destekler niteliktedir [95]. Başka bir çalışmada ise HER2'yi hedefleyen galyum-68 (Ga-68) etiketli scFv kullanılarak yapılan prob HER2-pozitif ksenograflarda yüksek birikim gözlemlenmiştir ve radyoaktivitenin intratümöral dağılımını incelemek için etkili olmuştur [96]. Normalden fazla eksprese olan HER2 genini ve protein ekspresyonunu hedeflenen şekilde yeniden düzenleyen üç anti-HER2 scFv içeren kokteylin HER2+ meme kanseri hücrelerinin yönelik yeni bir alternatif olarak kabul edilebileceği gösterilmiştir [97]. Anti tümör etkisine başka bir diğer örnek çalışma ise 2014 yılında yapılmıştır. ScFv HER2 ile tasarlanan PEG-PLA içerikli nanoparçacığın HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyebildiği gösterilmiştir. Ayrıca dozajın da önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir [98]. Anti-HER2 scFv ekspresyonu optimizasyonu için yapılan bir çalışmada Origami ve BL21 suşu kıyaslanmıştır. Toplam anti-HER2 scFv ekspresyon seviyesinin BL21 suşunda daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir [99].

Laboratuvar ekibimiz tarafından yakın zamanda oluşturulan, di-sülfid bağı içeren anti-HER2 scFv antikor parçası, BL21(DE3) ve Shuffle T7 Express suşları ile *E. coli* sitoplazmasında eksprese edilmiştir. Shuffle T7 Express ile yapılan üretimde bağlanma aktivitesi ve çözünürlük bakımından daha iyi olduğu gözlemlenmiştir [21]. Bu çalışmada ise, sitoplazmik üretime ek olarak, anti-HER2 scFv'nin ekstraselüler bölgeye özgü YebF sinyal peptidi ve periplazmik bölgeye özgü DsbA ve MBP sinyal peptitleri ile ekspresyon yapılarak anti-HER2 scFv'nin *E. coli*'de rekombinant üretim veriminin artırılması ve üretim yerine yönelik optimizasyon yapılması hedeflenmiştir. Böylece, rekombinant protein üretiminde endüstride en çok tercih edilen mikroorganizmaların başında gelen *E. coli*'de rekombinant bir protein için üç bölmesinde üretime özgü sinyal peptitleri ve suş kullanarak kıyaslanmasına yönelik literatürdeki boşluk hedef alınmıştır. Ayrıca, 2025 yılına kadar global pazarı 300 milyar USD seviyelerine ulaşması beklenen monoklonal antikorlar düşünüldüğünde, antikor fragmanlarından anti-HER2 scFv'nin gen dizininin bir bakteriye klonlanması üretim maliyetlerini kayda değer bir oranda azaltacağı için üretim verimini arttırmaya yönelik bu çalışmanın biyoteknoloji sektörüne katkı sağlayacağı düşünülmektedir [33].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Anti-HER2-scFv'nin Rekombinant Üretimine Yönelik Vektörlerin Oluşturulması

Anti-HER2 scFv'nin periplazmik, hücre dışı ve sitoplazmik üretimine yönelik Şekil 3.1.'de gen kasetlerinin tasarımları verilen vektörler oluşturulmuştur. Bu amaçla, anti-HER2 scFv geni önceki çalışmalarımızda elde edilen pET28a-anti-HER2-scFv-6xHis plazmidinden [21] polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak pET28a-spYebF-anti-HER2-scFv-6xHis plazmidi oluşturulmuştur. Bu süreçte pTrc-spYebF-Cel5A [78] plazmidi YebF sinyal peptidi için şablon olarak kullanılmıştır. Periplazmik bölgede üretimi sağlayan pET28a-spDsbA, pET28a-spTorA ve pET28a-spMBP plazmidlerinde sinyal peptidini oluşturmak için sentetik primerler tasarlanmıştır. pET28a-spTorA için SOE PZR yöntemi de denenmiştir. Bu çalışmada kullanılan plazmitler kullanım amaçlarıyla birlikte Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan Plazmidler ve kullanım amaçları

| Plazmidler | Kullanım amacı |
|------------------------------------|---|
| pTrc-spYebF-Cel5A | spYebF elde etmek için kullanılmıştır [100]. |
| pET28a-anti-HER2-scFv-6xHis | Sitoplazmik üretimde ve diğer plazmitlere anti-HER2 scFv sağlamak için kullanılmıştır [21]. |
| pET28a(+) | Klonlamalarda kullanılmıştır. |
| pET28a-spYebF-anti-HER2 scFv-6xHis | Bu çalışma için oluşturulmuştur. |
| pET28a-spDsbA-anti-HER2 scFv-6xHis | Bu çalışma için oluşturulmuştur. |
| pET28a-spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis | Bu çalışma için oluşturulmuştur. |
| pET28a-spTorA-anti-HER2 scFv-6xHis | Bu çalışma için oluşturulmuştur. |

Çalışma süresince kullanılan besi ortamları ve kimyasal içerikleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan Ortamları

| Ortamlar | İçerikler |
|----------------------------|--|
| LB (Luria Bertani) ortamı | 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L maya ekstraktı |
| TB (Terrific broth) ortamı | 12 g/L tripton, 24 g/L maya özütü, 9.4 g/L K ₂ HPO ₄ , 2.2 g/L KH ₂ PO ₄ , 4 ml/L gliserol |

3.1.1. Plasmid DNA İzolasyonu

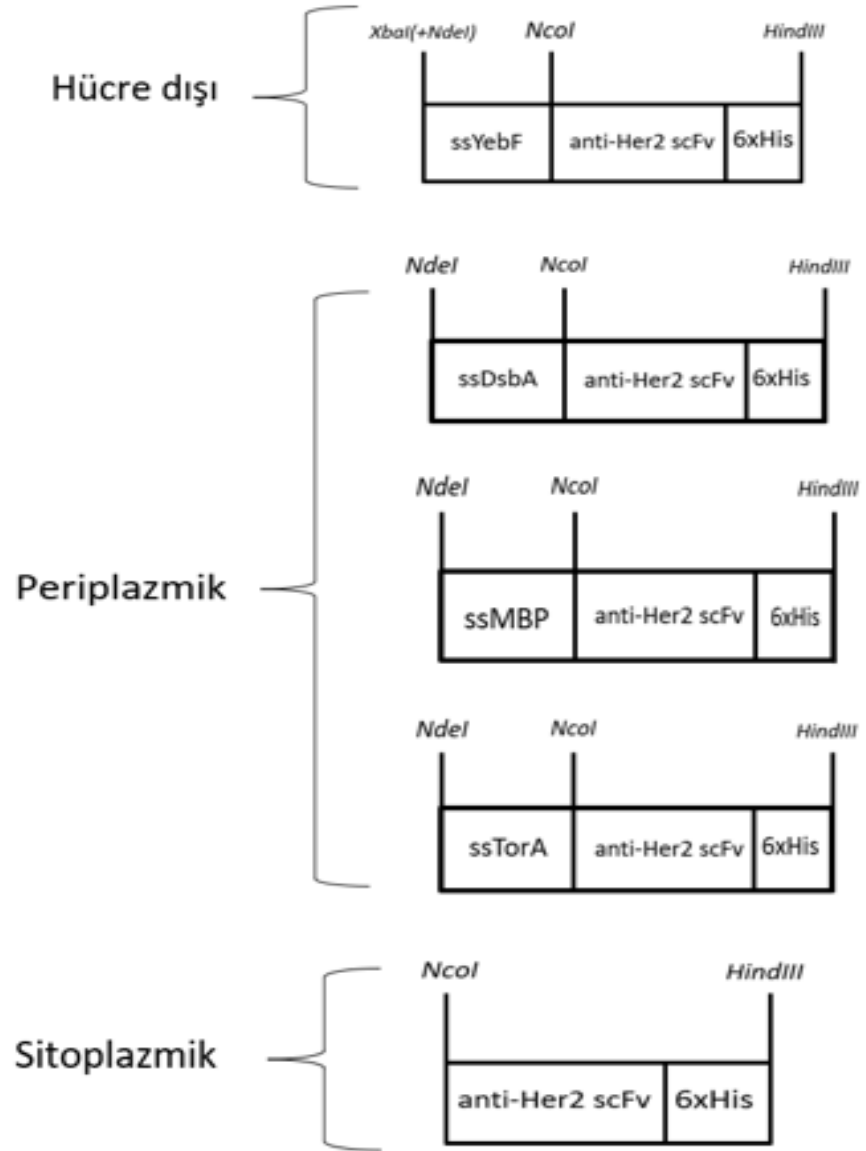
Plasmid DNA, bir gün öncesinde 37°C ve 200 rpm'de 16 st çoğaltılmıştır. Daha sonra *E. coli* hücrelerinden ticari kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Klonlama süreci tamamlanana kadar *E. coli* DH5α suşu kullanılmıştır. Ekstraksiyon basamakları sonunda plasmid 50 µl'lik elüsyon tamponu (EB: pH 8.5, 10 mM Tris-Cl) kullanılarak, santrifüj kolonu ile ayrılmış ve saflaştırılan plasmid -20°C'da saklanmıştır.

3.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi

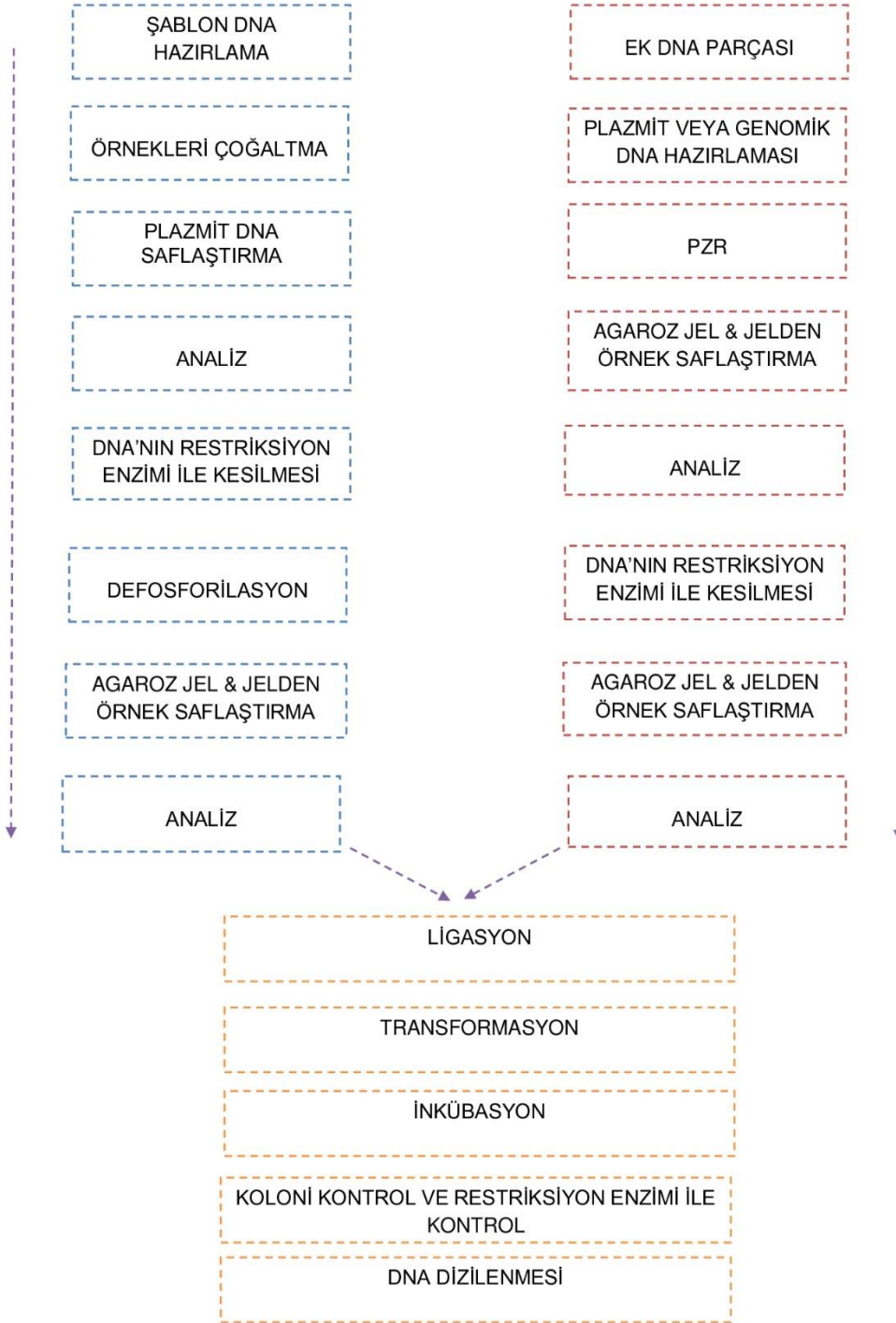
DNA moleküllerinin tanımlanması ve ayrılması için jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için, 0.4 g agaroz 40 ml 1xTBE'de (Tris Borat EDTA: 2 mM EDTA, 89 mM Tris-Borat, pH 8.3) çözülmüş ve etidyum bromür eklenerek jel tepsilerine dökülerek donması sağlanmıştır. Yükleme tamponuyla DNA örnekleri ve DNA standardı karıştırılmış, jele yüklenmiştir. TBE tamponu ile dolu olan tankta 100 V'da 90 dk koşturulan DNA'nın bantları, transillüminatör cihazının üzerinde incelenmiştir.

3.1.3. DNA'nın Agaroz Jelden Ekstraksiyonu

Bu aşamada ilk önce klonlamada kullanılacak gen parçalarının bulunduğu bantlar tespit edilmiş ve jelden kesilmiştir. Kesilen parçaların jelden ve tuzlardan uzaklaştırılması, ticari jel ekstraksiyon kiti ile üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Protokolun sonunda DNA, 40 µl elüsyon tamponu ile kolondan saflaştırılmıştır. Böylelikle, öncesinde kesim işlemi yapılarak ligasyon reaksiyonunda şablon DNA olarak kullanılacak gen kaseti hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. Anti-HER2 scFv proteininin sinyal peptitleriyle rekombinant olarak üretilmesine yönelik gen kaseti tasarımları



Şekil 3.2. Moleküler klonlama prosedürünün şematik gösterimi [101].

3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR ile pTrc-spYebF-Cel5A [78] plazmidinden YebF sinyal peptidine ait DNA dizisi çoğaltılmıştır. Bunun için, 5 µl 10x PZR reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP, 1 µl ileri primer, 1 µl geri primer, 100 ng (1-3 µl) kalıp DNA, 1 µl DNA polimeraz bulunan reaksiyon karışımının hacmi steril dH₂O ile 50 µl'e kadar tamamlanmıştır. Tüm reaksiyon hazırlığı buz üzerinde yapılmıştır. SpYebF eklemek için yapılan PZR'de primer yapışma sıcaklığı için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla üç farklı sıcaklık (55, 56.9 ve 60°C) denenmiştir. PZR sonrasında primerlerin, nükleotidlerin, polimerazın ve tuzların uzaklaştırılması, ticari PZR saflaştırma kiti kullanılarak, üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış DNA'nın elüsyonu, santrifüj kolonlarından 50 µl'lik EB tampon geçirilmesi ile yapılmıştır. Hücre dışı üretim için, Çizelge 3.4'de verilen P1 ve P2 primerleri aracılığı ile pTrc-spYebF-Cel5A plazmidi [78] şablon olarak kullanılarak, YebF sinyal peptidini (spYebF) içeren pET28a-spYebF-anti-HER2-scFv-6xHis plazmidi (Çizelge 3.3, PZR1) oluşturulmuştur.

Çizelge 3.3 PZR koşulları

| PZR | Şablon | İleri Primer | Geri Primer | Ürün boyutu |
|------|---|--------------|-------------|-------------|
| PZR1 | <i>E. coli</i> DH5α pET28a-YebF-Cel5A-his | P1 | P2 | 381 bp |
| PZR2 | <i>E. coli</i> BL21(DE3) | P3 | P4 | 136 bp |

3.1.5. Sentetik Primer oluşturulması

PZR1 sonrasında ileri basamaklarda verildiği şekilde oluşturulmuş pET28a-spYebF-anti-HER2-scFv-6xHis vektöründen spYebF geni çıkarılmış ve tasarlanan sentetik primerler kullanılarak periplazmik bölgede üretim sağlayan spDsbA, spMBP ve spTorA sinyal peptitleri eklenmiştir. Genlerin oluşturulması için, DsbA sinyal peptidini içeren ve Çizelge 3.4.'de verilen PD1 ve PD2 primerleri ile MBP sinyal peptidini içeren PD3 ve PD4 primerleri ve TorA sinyal peptidi sekansını içeren PD5, PD6, PD7 ve PD8 primerleri önce dimer haline getirilmiş, daha sonra birleştirilmiştir.

3.1.6. SOE PZR (Örtüşme-Uzatma Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Sinyal peptidlerinden spTorA, Çizelge 3.3.'de PZR2 adı ile verilen koşullarda *E. coli* genomundan PZR kullanılarak, P3 ve P4 primerleri (Çizelge 3.4.) ile çoğaltılmıştır. Yeniden iki adet primer tasarlanarak ve laboratuvarında mevcut olan iki primer kullanılarak yapılan yöntemde ilk PZR için *E. coli* genomundan çoğaltılan spTorA sekansı kullanılmıştır. İkinci PZR için ise *E. coli* BL21(DE3) pET28a-anti-HER2-scFv-6xHis kullanılmıştır.

Çizelge 3. 4. Kullanılan Primerler

| Primer | Sekans (5' – 3') |
|--------|---|
| P1 | aagtctagaaaggagatatacatatgaaaaaagaggggcttttagggctgttg |
| P2 | cggccatggtacgccgctgatattccgccattc |
| PD1 | tatgaaaagatttgctggcgctggctggttagtttagcgttagcgcacgcggcggc |
| PD2 | catggccgccgatgcgctaaacgctaaaactaaaccagccagcgcagccaaatctttt ca |
| PD3 | Tatgaaaataaaaacaggtgcacgcacatcctcgcattatccgcattaacgacgatgatgtttt ccgcctcggctctcgcggc |
| PD4 | Catggcggcgagagccgagggcgaaacatcatcgtcgttaatgcggataatgcgagg atgcgtgcacctgttttatttca |
| PD5 | Tatgaacaataacgatctcttcaggcatcacgtcggcgtttctggcacaactcggcggctt aacgctcggcgggatgc |
| PD6 | Gcatcccggcgacgggtaagccgccgagttgtgccagaaaacgccgacgtgatgcctg aaagagatcgttattgttca |
| PD7 | tggggccgtcattgtaacgccgcgacgtgcgactcggcggcaagcgac |
| PD8 | catggtcgcttgcgccgagtcgcacgtcgcggcgtaacaatgacggcccca |
| P3 | aggcatatgaacaataacgatctcttcaggcatcacgtcg |
| P4 | ttccatggtcgcttgcgccgagtcgcac |
| SOE-P2 | atgtgaatatccatggtcgcttgcgccgagtc |
| SOE-P3 | tgcggcgaagcgacatggatattcaaatgacccaaagcccgtcttc |
| İ-P4 | gcgatgaagcttttagtgatgatgatgatgatgagagctgaccgtgaccag |

Yeni tasarlanan SOE-P3 primeri ileri primer ve daha önceki çalışmalarımızda kullanılmış laboratuvarımızda hazır olan İ-P4 primeri [21] ise geri primer olarak kullanılarak anti-HER2-scFv-6xHis geni çoğaltılmıştır (Çizelge 3.4.). SpTorA reaksiyonu için Çizelge 3.4'te verilen P3 primeri ileri primer olarak ve yeni tasarlanan SOE-P2 primeri geri primer olarak kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonları sonucunda, DNA moleküllerinin tanımlanması ve ayrılması için jel elektroforezi yapılmıştır

3.1.7. DNA'nın Restriksiyon Enzimi Kullanarak Kesimi

Restriksiyon enzimleri ile kesme reaksiyonu mikrosantrifüj tüpünde 1,5 µg DNA, reaksiyon tamponu ve steril dH₂O karışımı hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler 37°C'de 2 saat su banyosunda tepkimeye bırakılmıştır. Şablon DNA için 1 saatin sonunda alkalın fosfataz enzimi (CIAP) eklenerek devam edilmiştir. Restriksiyon enzimleriyle kesimden sonra, enzimlerin, tuzların ve nükleotidlerin ayrıştırılması için ticari saflaştırma kiti kullanılmıştır. Protokolun sonunda saflaştırılmış DNA, 50 µl EB tamponu ile santrifüj kolonundan ayrılmıştır. Kesim reaksiyonunun Çizelge 3.5.'te verilen ürün büyüklükleri ile uygunluğunu kontrol etmek amacıyla örnekler agaroz jele yüklenmiştir.

Çizelge 3.5. Restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu koşulları

| Kesim | Şablon | İleri RE | Geri RE | Ürün Büyüklüğü |
|-------|-----------------------------|-------------|-------------|----------------|
| D1 | PZR1 | <i>XbaI</i> | <i>NcoI</i> | 375 bp |
| D2 | pET28A-anti-HER2-scFv-6xHis | <i>XbaI</i> | <i>NcoI</i> | 5965 bp |
| D3 | L1 | <i>NdeI</i> | <i>NcoI</i> | 5983 bp |
| D4 | PZR2 | <i>NdeI</i> | <i>NcoI</i> | 129 bp |

3.1.8. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon)

Ligasyon reaksiyonu 20 µl olarak; 2 µl 10X ligasyon tampon, 0.9 µl gen kaseti, 16.1 µl iki kez kesilmiş vektör, 1 µl T4 DNA ligaz ile hazırlanmıştır. Vektör:gen kaseti molar oranı 1:3 olacak şekilde genin miktarı belirlenmiştir. Kontrol reaksiyonu ise içinde gen kaseti dışında yukarıda verilen diğer tüm maddeleri içerecek şekilde

oluşturulmuştur. Reaksiyon 16 sa, 16°C'de gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.6'de verilen ligasyon ürünü tuzdan arındırıldıktan sonra -20°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.6 Ligasyon reaksiyonu verileri tablosu

| Ligasyon | Ürün | Ürün Büyüklüğü (bp) | Birleştirilenler |
|----------|-----------------------------|---------------------|------------------|
| L1 | spYebF-anti-HER2 scFv-6xHis | 6340 | D1-D2 |
| L2 | spDsbA-anti-HER2 scFv-6xHis | 6043 | PD1-PD2-D3 |
| L3 | spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis | 6064 | PD2-PD3-D3 |
| L4 | spTorA-anti-HER2 scFv-6xHis | 6112 | D3-D4 |

3.1.9. CaCl₂ ile Transformasyon

E. coli transformasyonu amacıyla 5 µl ligasyon ürünü kullanılmıştır. Plazmidin çoğaltılması için kimyasal-kompetan *E. coli* hücreleri (DH5α) kullanılmıştır. Hacmi 50 µl olan kompetan hücre buz üstünde eritilmiş, içine ligasyon ürünü eklenmiştir. Isıl şoklama için 90 s süre ile 42°C'de tutulmuştur. Bu sayede, hücrelerin plazmidi içine alımı sağlanmıştır. Hücrelerin üzerine 750 µl SOB ortamı (%2 tripton, %0.5 maya özütü, 8.56 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄) eklenmiş, 37°C'de 200 rpm'de 45 dk çalkalandıktan sonra seçici antibiyotik (kanamisin) içeren katı ortama yayılmış ve 37°C'de 16 sa inkübe edilmiştir. Katı ortamdan 3 adet koloni seçilmiş, 3 ayrı sıvı ortama ekim yapılmıştır. 37°C'de 16 sa inkübe edildikten sonra derişimleri ölçülmüştür.

3.1.10. DNA Dizi Analizlemesi

Hazırlanan yeni plazmidlerin gen dizilerinin DNA dizi analizlemesi işlemi için hizmet alımı (Ankara) yapılmıştır. Üçer adet seçilen plazmidler ileri ve geri primerleri ile analize gönderilmiştir. Analizden gelen gen dizilerinin doğruluğu ApE, SnapGene, BLAST ve plasmid editor v2.0.53 gibi yazılımların ücretsiz versiyonları ile kontrol

eldilmiştir. Stoklar oluşturulmadan önce mutasyon olmamasına ve tasarımla tamamen uyumlu olmasına dikkat edilmiştir (EK1).

3.2. Elde Edilen R-Vektörlerin Konakçı Hücrelere Aktarılması ve Küçük Ölçekte Üretim Verimlerinin Karşılaştırılması

Elde edilen rekombinant vektörler, sitoplazmik üretim için *E. coli* SHuffle T7 Express [21] ve periplazmik ve ekstrasellüler üretim için *E. coli* BL21(DE3) [102] konak hücrelerine CaCl₂ metodu [103] ile aktarılmıştır. Transformasyonun ardından hücreler, içerisindeki plazmidlerine göre seçici antibiyotikleri içeren LB agar besi ortamına (10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L maya ekstraktı) yayma yöntemiyle ekilmiştir. *E. coli* SHuffle T7 Express için 30°C ve diğerleri için 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık olarak 16 saat sonucunda çoğalan hücrelerden ertesi gün birer veya ikişer koloni seçilmiştir. İçerisinde antibiyotik olarak kanamisin bulunan 5 ml'lik LB besi ortamına inoküle edilerek bir gece 30°C ve 37°C'de 200 rpm çalkalama hızında çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler önce içinde 25 ml antibiyotikli LB bulunan, 250 ml'lik steril erlenlere aktarılmış ve çalkalamalı inkübatörde 30°C ya da 37°C'de, 200 rpm hızında çoğaltılmıştır. İçerisinde spYebF geni içeren hücreler LB ortamında üretildikten sonra gözlemlenemediğinden bu hücreler için TB ortamına geçiş yapılmıştır. Hücre derişimi, belirli saatlerde alınan örneklerin 1xPBS çözeltisi ile seyreltilmesiyle 600 nm dalga boyundaki UV-görünür spektrofotometrede optik yoğunluğunun (OD) ölçülmesiyle hesaplanmıştır. 600 nm'deki absorbansları 0.6-0.8 olduğunda, 1mM İzopropil β-D-1-tiogalaktopiranosid (IPTG) ilave edilerek indüklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörün sıcaklığı 30°C ya da 16°C'ye (SHuffle T7 Express için) düşürülerek, 200 rpm'de 16 saat üretime devam edilmiştir.

3.3. Üretilen Anti-HER2-Scfv'lerin Saflaştırılması ve Birincil Karakterizasyonu

Üretilen rekombinant scFv'ler, C-uçlarındaki 6xHis peptidi kullanılarak immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) ile yakın zamanda araştırma grubumuz tarafından yayınlanan prosedüre göre saflaştırılmıştır [104]. Sitoplazmik ve periplazmik örnekler için hücre peletleri, sodyum fosfat tamponu (20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7.4) ile süspansiyon haline getirilmiş ve buz üzerindeki hücreler prob sonikatörde (Bandelin Sonopuls) parçalanmıştır. Bu

işlemden sonra 4°C'de, 13000xg'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Ekstraselüler örnekler 4000xg'de 20 dakika santrifüj yapılarak ayrılmıştır. Hücre lizatları reçine ile etkileştirilmiştir. Elde edilen His-tag scFv takılı reçineler santrifüj yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılmıştır ve 2 kez adsorpsiyon tamponuyla (20 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol, pH 7.4) yıkanmıştır. İzole edilen proteinin reçineler üzerinden desorpsiyonu için imidazol (100-500 mM) içeren desorpsiyon ortamı kullanılmıştır. Ortamdaki imidazolun uzaklaştırılması için 10 KDa MWCO membran kullanılmıştır. Saflaştırılan proteinlerin tampon ortamı değiştirilmiş ve konsantre edilmiştir. Daha sonraki analizlerde kullanılması ve üretim veriminin hesaplanması için karakterizasyonu yapılmıştır.

3.3.1. Toplam Protein Derişimi

Bradford yöntemi [105] ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. 10 µl örnek, 200 µl Bradford reaktifi (ticari) ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Okuma 595 nm absorbans ile yapılmıştır. Kalibrasyon eğrisi, 0-1 mg/ml derişim aralığında, BSA proteini (ticari) kullanılarak oluşturulmuştur.

3.3.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Anti-HER2 scFv proteinleri örnekler saflaştırılmadan ve saflaştırıldıktan sonra %12'lik SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile standart metodlara göre analizlenmiştir [106-108]. Saflaştırılmış scFv örnekleri tamponla karıştırılmıştır. Isıtıcı cihaz ile 95 °C'de 5 dk kaynatılmış örnekler ve protein standartı 100 V'da koşturulmuştur. Jelde yer alan protein bantlarının görünürlüğü için ticari 'Coomassie mavisi' çözeltisi (ticari) kullanılmıştır. Jel görüntüleme cihazı ile fotoğraflanmıştır.

Yapılan üretimlerin verimlerini karşılaştırılması için scFv'lerin safsızlıkları SDS-jel görüntüleri ile teyit edilmiştir. Daha sonra verimleri hesaplanmıştır. Öncelikle her elüsyon için protein miktarı (µg) belirlemek için Bradford ile okunan protein derişimi (µg/µl) ve saflaştırmada kullanılan elüsyon hacmi (µl) çarpılmıştır. Elüsyonlardaki belirlenen protein miktarları, her örnek için o örneğe ait tüm elüsyonlar toplanarak toplam protein miktarları hesaplanmıştır. Bulunan toplam protein miktarı (mg), üretim hacmine (L) bölünerek gerekli birim çevirmeler yapılmış ve üretim verimi (mg/L) hesaplanmıştır.

3.3.3. Western Aktarım

Anti-HER2 scFv, Western aktarım yöntemi [78, 109] kullanılarak, anti-His antikoru ile ayırt edilmiştir. Örnekler önce SDS-PAGE jelinde koşturulmuştur. Membran (PVDF) önceden metanol ile ıslatılmıştır. Transfer tamponunda dengeye gelene kadar bekletilmiştir. Sonra membran ve jel, aktarım kağıdı ve süngerler arasına sıkıştırılmıştır. Aktarım 50 V'da, 3 saat boyunca elektroforetik olarak gerçekleştirilmiştir. Aktarılmış membran PBS-T ile 2-3 kez yıkandıktan sonra, bloklama tamponu ile yarım saat inkübe edilmiştir. Membran PBS-T ile 3 kez yıkandıktan sonra, 1 saat PBS-T-%1 BSA ile seyreltilmiş birincil antikor çözeltisi ile inkübe edilmiştir. ScFv varlığı, üç yıkamadan sonra, kolorimetrik peroksidaz substratı (ticari kit) kullanılarak belirlenmiş, jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

3.4. Üretilen Anti-HER2-Scfv'lerin İkincil Karakterizasyonu

3.4.1. ELISA Testi

Enzim bağlantılı immünosorbent deneyi (ELISA) için 1XPBS içinde %0,05 Tween-20 ve %0,3 BSA ile yıkama tamponu hazırlanmıştır. Bloklama tamponu için %5 süt tozu eklenmiştir. HER2 antijeni ile kaplanan 96'lı plaka 4°C'de gece boyunca bekletilmiştir. Her kuyu için 50 ul antijen kullanılmıştır. Tüm örneklerden üç tekrarlı yapılmıştır. Ertesi gün yıkama tamponu ile 3 yıkama yapılmıştır. Daha sonra, bloklama tamponu içinde 3 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Yıkama tamponu ile üç defa yıkanan plakaya 100 ul saflaştırılmış örnekler eklenmiş, 1 sa inkübe edilmiştir. Örnekler plakaya eşit miktarda uygulanmıştır. Üç defa yıkandıktan sonra her kuyuya 1-Step Ultra TMB-ELISA substratı 100 µl olarak uygulanmıştır. Reaksiyon sonlandırma işlemi 2 M sülfirik asit ile yapılmıştır. Örneklerin absorbansı, H₂SO₄ ilavesinden sonra 450 nm'de ölçülmüştür.

3.4.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Saflaştırılmış anti-HER2-scFv'ler için PBS tamponunda 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml ve 1 mg/ml derişimde olacak şekilde hazırlanmıştır. 20°C'den 90°C sıcaklığa kadar 60°C/sa tarama hızında analiz gerçekleştirilmiştir. Basınç 14 psi olarak ayarlanmıştır. DSC analizi sonucunda elde edilen veriler ile erime sıcaklığı (T_m) eğrileri oluşturulmuştur. DSC sonuçlarında özgül ısı kapasitesi, sıcaklığın bir

fonksiyonu olarak görülmektedir. Eğri altındaki alan tarafından ölçülen entalpi değişimi proteinin açılması (bağlarının ayrılması) hakkında bilgi vermektedir. Elde edilen veriler ile özgül ısı kapasiteleri aşağıda verilen formüller ile hesaplanmıştır.

$$Q (\text{ısı}) = m(\text{kütle}) \times C_p(\text{özgül ısı}) \times \Delta T(\text{sıcaklık değişimi}) \quad (3.1)$$

Özgül ısıyı (C_p) bulmak için eşitlik (3.1) aşağıdaki gibi revize edilmiştir.

$$\frac{Q (J)}{m (g) \times \Delta T (^\circ C)} = C_p \left(\frac{J}{g \times ^\circ C} \right) \quad (3.2)$$

DSC cihazı ΔH (entalpi değişimi) ve T (sıcaklık) değerleri ile sonuç vermektedir. Bu sebeple formül (3.2), aşağıdaki versiyona (3.3) getirilmiştir.

$$C_p (J/(g \times ^\circ C)) = (\Delta H (J/g))/(\Delta T (^\circ C)) \quad (3.3)$$

Gerekli birim çevirmeler yapılarak eşitlik (3.4) ve (3.5) elde edilmiştir. Bu işlem sırasında scFv molekülünün 1 molü yaklaşık olarak 27 000 gram olduğu bilgisi de kullanılmıştır.

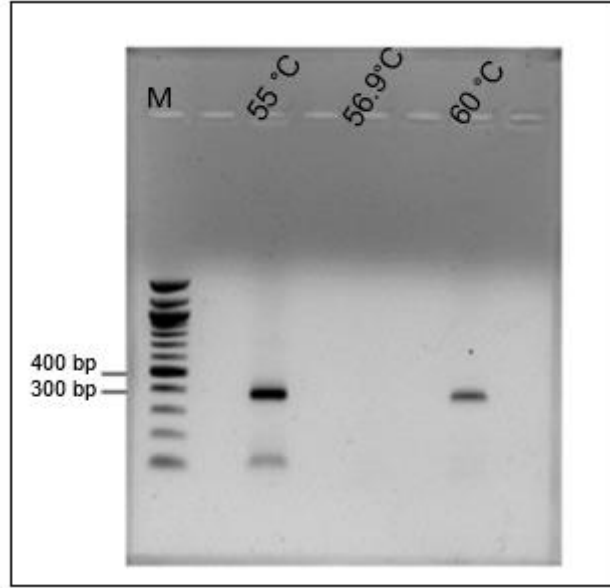
$$\Delta H \left(\frac{J}{g} \right) \times \frac{27000 g}{1 mol} \times \frac{1 cal}{4.18 J} \times \frac{1 kcal}{1000 cal} = \Delta H \left(\frac{kcal}{mol} \right) \quad (3.4)$$

$$C_p \left(\frac{kcal}{mol \times ^\circ C} \right) = \frac{\Delta H \left(\frac{kcal}{mol} \right)}{\Delta T (^\circ C)} \quad (3.5)$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Anti-HER2 ScFv'nin Rekombinant Üretimine Yönelik Vektörlerin Oluşturulması

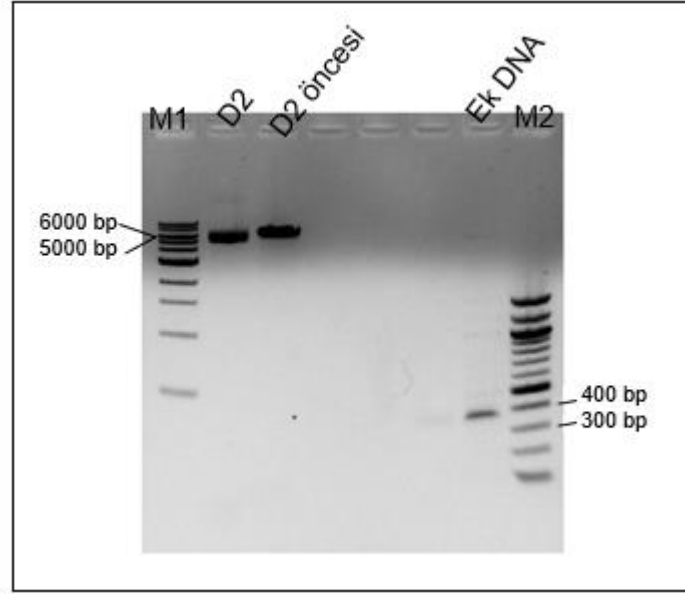
Ekstraselüler spYebF-anti-HER2 scFv-6xHis üretimi ve YebF sinyal peptidi için pTrc-spYebF-Cel5A [78] plazmidi şablon olarak kullanılmıştır. pET28a-anti-HER2-scFv-6xHis plazmidinden [21] anti-HER2-scFv-6xHis gen kaseti polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılarak, pET28a-spYebF-anti-HER2-scFv-6xHis plazmidi oluşturulmuştur. SpYebF eklemek için yapılan PZR'de primer bağlanma sıcaklığı için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla üç farklı sıcaklık (55°C, 57°C ve 60°C) denenmiş, tek bant gözlenen 60°C, optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).



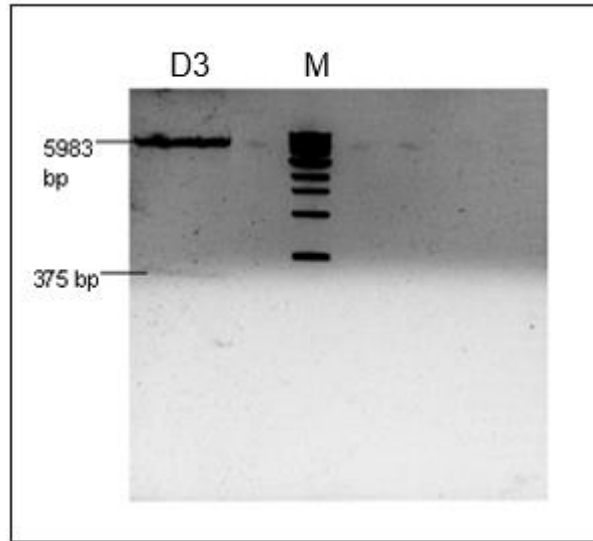
Şekil 4.1. Tavlama sıcaklığı (Ta) optimizasyonu için spYebF eklenerek oluşturulan PZR ürünlerinin (381 bp) agaroz jel elektroforezi görüntüsü; M: 100 bp DNA standardı

Restriksiyon enzimleri ile şablon DNA kesimi yapıldıktan sonra yürütülen agaroz jelin görüntüleri Şekil 4.2 (D2) ve Şekil 4.3'te (D3) verilmiştir. D1 için yapılan kesim restriksiyon bölgesi oluşturmak için yapılmıştır, ligasyonun gerçekleşmesi kesimde hata olmadığını doğrulamıştır. D2 ve D3 örneklerinin kesim yapıldıktan sonraki

agaroz jel görüntüsünün Çizelge 3.5'de verilen ürün büyüklüğü ile eşleşmesi, çalışmayı doğrulamıştır.



Şekil 4.2. Kesim reaksiyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü; M1: 1 kb DNA standardı, M2: 100 bp DNA standardı



Şekil 4.3. Şablon DNA'nın kesimi yapıldıktan sonra alınan agaroz jel elektroforez görüntüsü; M: 1 kb DNA standardı

Görüntüleme sonrası jelden ekstraksiyon yoluyla alınan örneklerin derişimi Çizelge 4.1'de verilmiştir. Elde edilen DNA kalitesini gösteren parametreler olan A260/A280

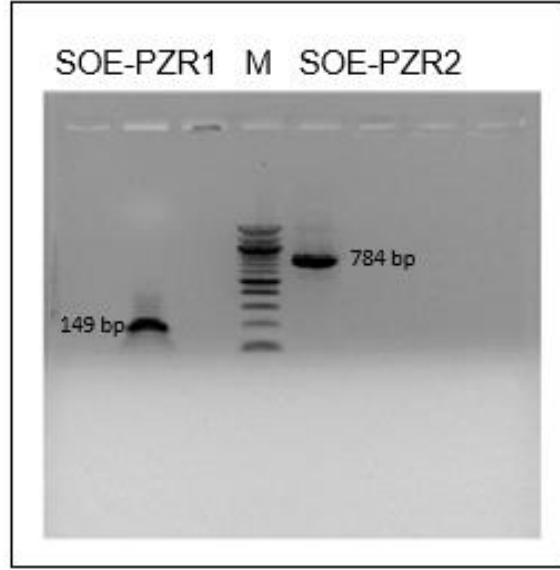
oranları yaklaşık olarak kabul edilen sınırlar içerisinde. 1.8 ve 2.0 arasındaki değerler saf olarak kabul edilmektedir. A260/A230 için ise bu aralık 2.0 ve 2.2 arasındadır. D2 için oldukça saf bir DNA olduğu söylenebilirken, D3'te 230 nm'de görülebilen kontaminantlar söz konusu olabilir. D1 ise yaklaşık olarak kabul edilebilecek bir değere sahiptir. D3 ile yapılan jelde safsızlık görülmediğinden 230 nm'de nano-spektrofotometre değerinin deneyi devamını etkilemeyeceği kabul edilmiştir.

Çizelge 4.1. Ekstraksiyon sonrası nano-spektrofotometre cihazı ile yapılan derişim ölçümü

| Örnek | Derişim (ng/µl) | A260/A280 | A260/A230 |
|----------------------------|-----------------|-----------|-----------|
| Eklenecek DNA parçası (D1) | 13.0 | 2.167 | 1.857 |
| Şablon DNA (D2) | 4.0 | 2.000 | 2.000 |
| D3 | 13.0 | 2.600 | 0.011 |

SpTorA, SpMBP ve spDsbA için farklı bir yöntem izlenmiş, ilgili sekansları içeren primerler ligasyon öncesi dimer haline getirilmiştir. Primer çiftleri, direkt ligasyona uygun olacak şekilde tasarlanmıştır. Elde edilen plazmidlerin konakçı hücreye transformasyonları sonrası spMBP ve spDsbA içeren örneklerde koloni çoğalması gözlemlenirken, spTorA içeren örnekte koloni çoğalmamıştır.

Daha sonra, spTorA sinyal peptidini içeren plazmidi oluşturmak adına *E. coli* genomundan TorA sinyal dizisini elde etmek amacıyla klonlama çalışmalarına devam edilmiştir, ancak saflaştırma protokolü sonucunda klonlamaya devam edilecek miktarda DNA elde edilememiştir. Bu sebeple, plazmid tasarımına örtüşme-uzatma polimeraz zincir reaksiyonu (SOE-PZR) yöntemi ile devam edilmesine karar verilmiştir. Bu amaçla *E. coli* genomundan elde edilen spTorA sinyal peptidini içeren PZR ürünü ve anti-HER2 scFv genini içeren plazmid [21] şablon olarak kullanılmıştır. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi, yapılan iki PZR sonucunda spTorA sinyal peptidini içeren PZR ürünü ile anti-HER2 scFv için istenilen büyüklüklerde DNA bandları gözlenmiştir.

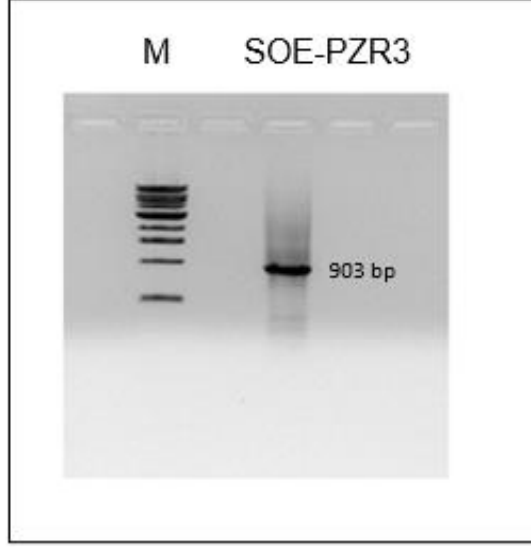


Şekil 4.4. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü; M: 100 bp DNA standardı

SpTorA sinyal peptidini içeren PZR ürünü ile anti-HER2 scFv'ye ait DNA bandlarına jelden saflaştırma protokolüne uygun olarak ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. İşlem sonrasında, nano spektrofotometre cihazı ile derişimleri ölçülmüştür (Çizelge 4.2, SOE-PZR1 ve SOE-PZR2). SOE-PZR3'ün büyüklüğü (903 bp) yapılan agaroz jel görüntüsü ile doğrulanmıştır (Şekil 4.5). PZR saflaştırma kiti ile saflaştırılan ürünün derişimi 119 ng/µl olarak ölçülmüştür (Şekil 4.5, SOE-PZR3). Çizelge 4.3'te verilen değerler A260/280 için beklenen aralık olan 1.8-2.0 arasındadır.

Çizelge 4.2. Saflaştırma sonrası nano-spektrofotometre cihazı ile yapılan derişim ölçümü

| Örnekler | ng/µl | A260/A280 | A260/A230 |
|----------|-------|-----------|-----------|
| SOE-PZR1 | 17.0 | 1.889 | 0.270 |
| SOE-PZR2 | 78.0 | 1.950 | 0.230 |
| SOE-PZR3 | 119.0 | 1.889 | 2.333 |



Şekil 4.5. SOE-PZR3 ürünün agaroz jel elektroforezi görüntüsü; M: 1kb DNA standardı

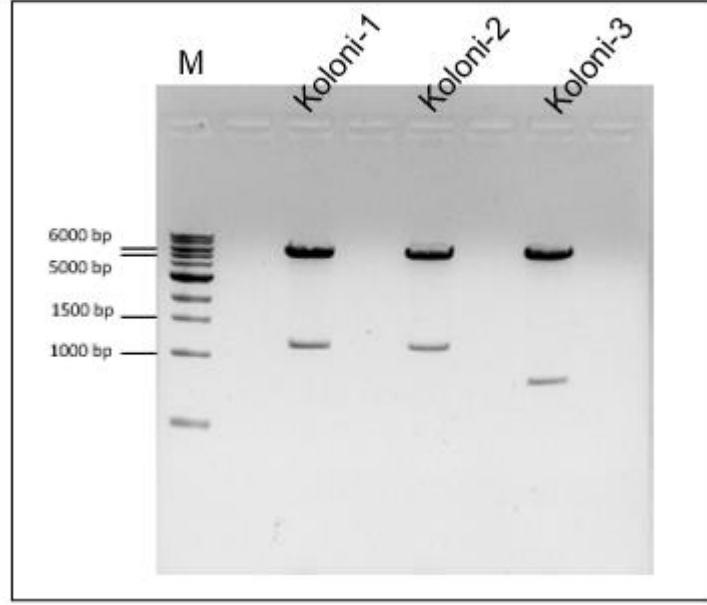
Ligasyon sonrası yapılan ekimlerde spTorA içeren örnekte sadece 3 koloni çoğalmıştır. Tüm ligasyon ürünlerinden üçer ideal koloni seçilip sıvı ortama geçilmiştir. Bir gün çoğalması beklenen örneklerin derişimi ölçülmüştür (Çizelge 4.3, L4-1, L4-2, L4-3). Sonuçlar A260/280 için tamamen beklenen aralıkta olup, A260/230 için ise, tamamen saf olamasa da, kabul edilebilir değerlerdir.

Restriksiyon enzimi kesim kontrolü ile L1 için 1 ve 2 numaralı kolonilerden çoğaltılan plazmidler, L2 için 1 ve 2 numaralı kolonilerden çoğaltılan plazmidler, L3 (spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis) için 1 ve 3 numaralı kolonilerden çoğaltılan plazmidler, ileri ve geri primerler ile dizi analizine gönderilmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8).

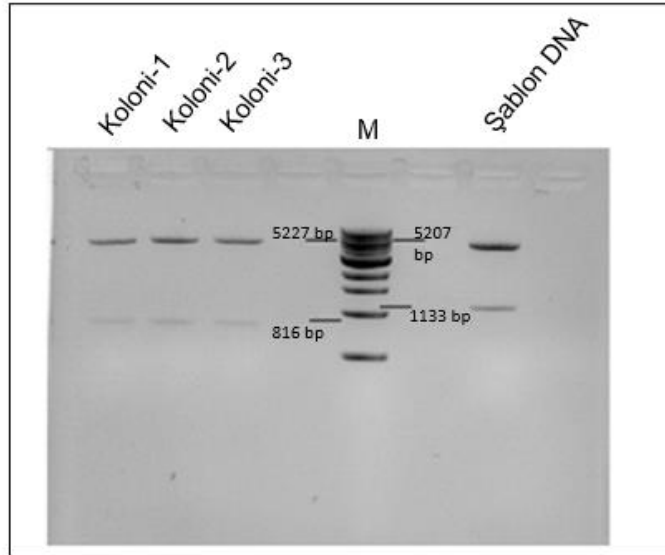
Çizelge 4.3. Dizi analizine gönderilmek üzere katı ortamdan seçilen kolonilerin nano-spektrofotometre cihazı ile ölçülen derişimleri

| Plazmid | Koloni No | ng/ µl | A260/A280 | A260/A230 |
|--|-----------|--------|-----------|-----------|
| pET28a-spYebF-anti-HER2 scFv-6xHis (L1) | L1-1 | 145 | 2.042 | 1.768 |
| | L1-2 | 126 | 2.032 | 1.726 |
| | L1-3 | 150 | 2.027 | 1.744 |
| pET28a-spDsbA-anti-HER2scFv-6xHis (L2) | L2-1 | 127 | 1.984 | 1.716 |
| | L2-2 | 135 | 1.957 | 1.627 |
| | L2-3 | 133 | 1.985 | 1.663 |
| pET28a-spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis (L3) | L3-1 | 102 | 1.962 | 1.594 |
| | L3-2 | 114 | 1.966 | 1.583 |
| | L3-3 | 129 | 1.985 | 1.675 |
| pET28a-spTorA-anti-HER2 scFv-6xHis (L4) | L4-1 | 148 | 1.947 | 1.663 |
| | L4-2 | 214 | 1.981 | 2.058 |
| | L4-3 | 145 | 1.933 | 1.576 |

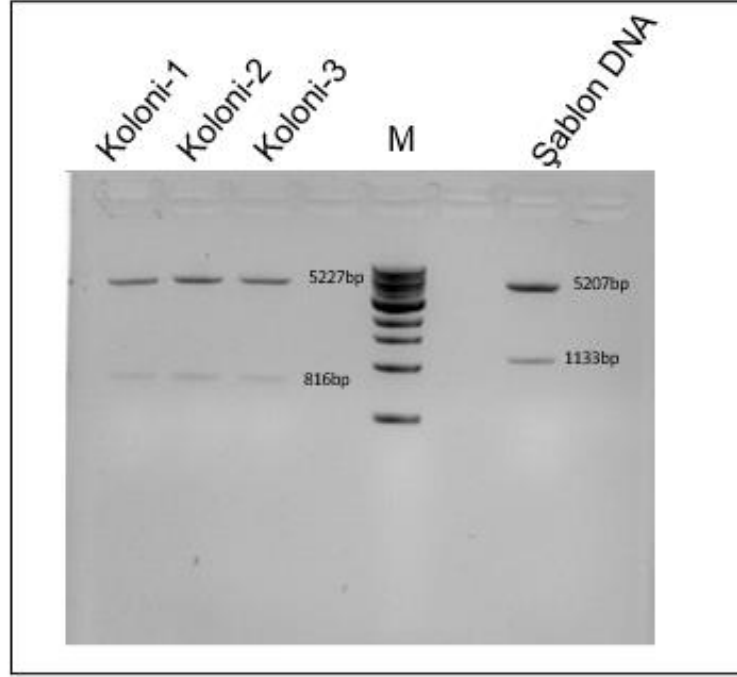
spTorA içeren örnekte kontrol aşamaları uygulanmış, ancak istenilen büyüklüklerde band elde edilememiştir (Şekil 4.9). Bu sebeple, anti-HER2 scFv proteinini periplazmik bölgeye yönlendiren plazmidlerden, spTorA-anti-HER2-scFv-6xHis plazmidi elimine edilerek üretim ve optimizasyon deneylerine periplazmik bölge için iki tane vektör (spDsbA ve spMBP sinyal peptidlerini içeren); hücre dışı bölge için bir tane vektör (spYebF içeren) ve sitoplazma üretimi için ise sinyal peptidi içermeyen anti-HER2 scFv genine sahip vektör ile devam edilmesine karar verilmiştir.



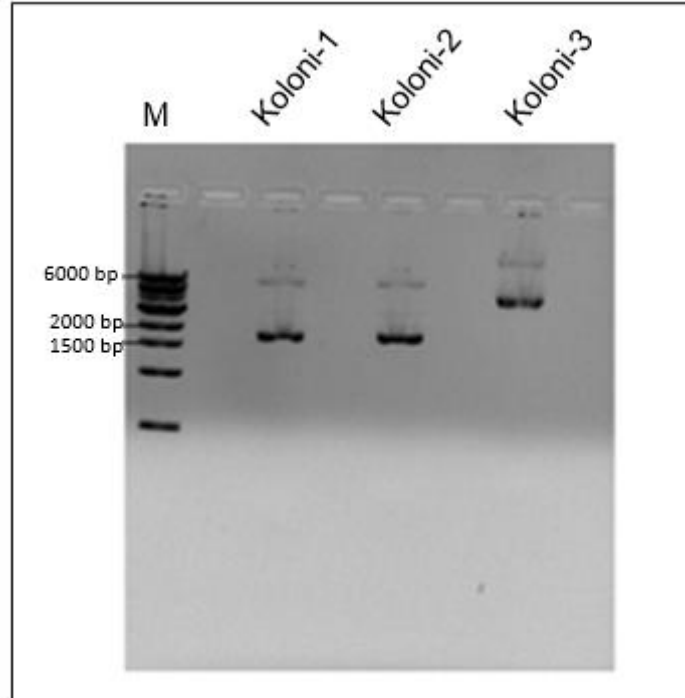
Şekil 4.6. Restriksiyon kontrolü ile 1 numaralı ligasyon için ideal koloni seçimi için yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüleri; M:1 kb DNA standardı



Şekil 4.7. Restriksiyon kontrolü ile 2 numaralı ligasyon için ideal koloni seçimi için yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüleri; M: 1 kb DNA standardı



Şekil 4.8. Restriksiyon kontrolü ile 2 numaralı ligasyon için ideal koloni seçimi için yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüleri; M: 1 kb DNA standardı

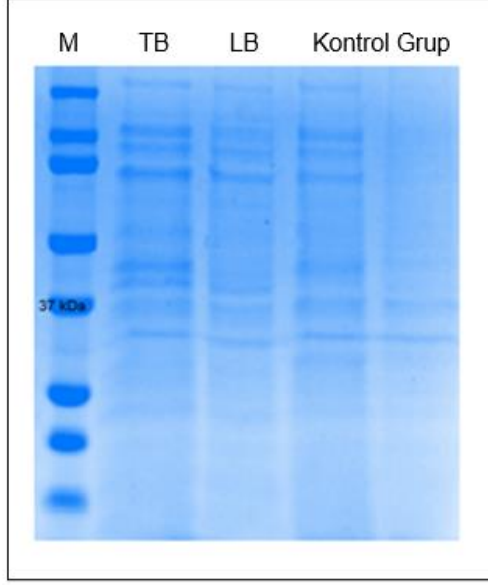


Şekil 4.9. Restriksiyon kontrolü agaroz jel görüntüsü; M: 1 kb DNA standardı

Analiz sonuçları, ücretsiz ApE plasmid Editor v2.0.53 ve BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) yazılımı kullanılarak incelenmiştir. Analiz sonucunda L1'den seçilen 1 numaralı koloniden çoğaltılan plazmidde (L1-1), L2'den seçilen 1 numaralı koloniden çoğaltılan plazmidde (L2-1), L3'den seçilen 3 numaralı koloniden çoğaltılan plazmidde (L3-3) mutasyon bulunmadığı ve tasarımla 100% uyumlu DNA dizisine sahip olduğu bulunmuştur. Çalışmanın devamında kullanılmak için uygun olduğu görülmüş ve -86°C stokları oluşturulmuştur. L4 için yapılan dizi analizlemesi sonucu yanlış olduğu gözlemlenmiştir. Optimizasyon için uygun bulunmamıştır. Periplazmik bölge için spMBP ve spDsbA ile çalışmalara devam edilmiştir.

4.2. Elde Edilen r-Vektörlerin Konakçı Hücrelere Aktarılması ve Küçük Ölçekte Üretim Verimlerinin Karşılaştırılması

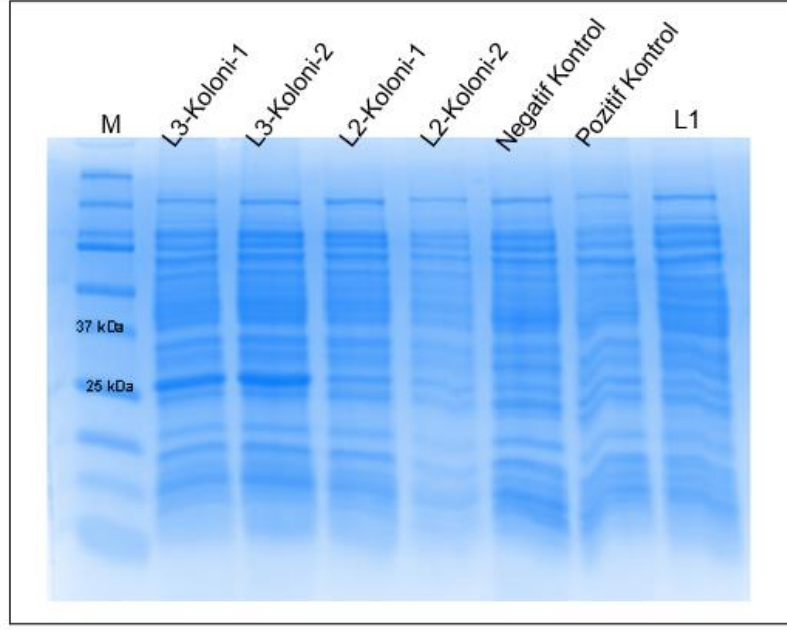
Periplazmik ve ekstraselüler üretim suşu olarak kullanılan *E. coli* BL21(DE3) konak hücrelerine ve sitoplazmik üretim için *E. coli* SHuffle T7 Express suşuna aktarılmıştır. SpYebF-anti-HER2 scFv-6xHis için yapılan ilk üretimde LB ortamı kullanılmış ve üretim sonrası yapılan SDS-PAGE analizinde bant gözlemlenmemiştir. Şekil 4.10'de görüldüğü gibi TB ortamı kullanılan örnekte ise ince bir bant görülmüştür. spYebF içeren scFv için ekstraselüler üretimde TB ortamının kullanılması uygun bulunmuştur. Periplazmik ve sitoplazmik üretimler LB ortamı ile yapılmıştır. Üretim sonrası örnekler ultrasantrifüjle ayrıldıktan sonra pelletler ve ekstraselüler örnekler için süpernatant ayrılmıştır.



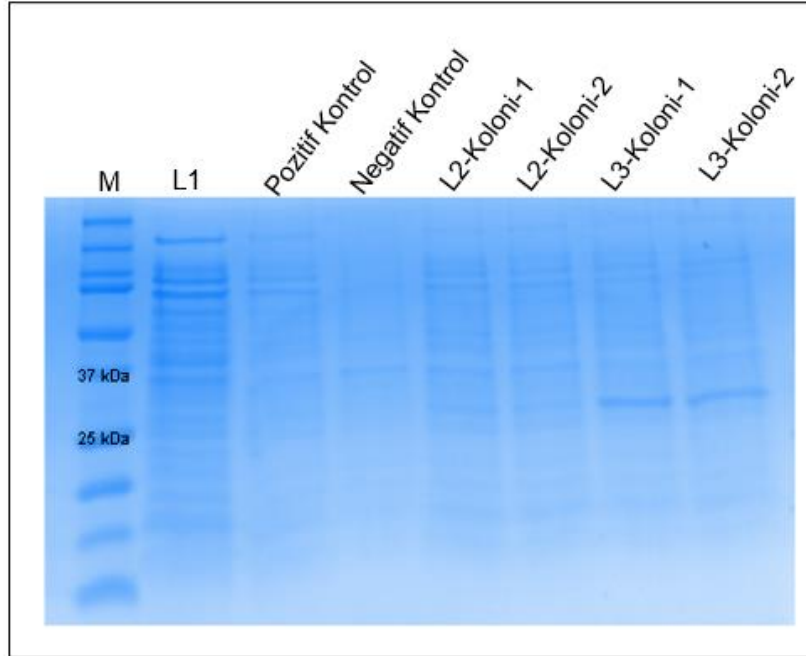
Şekil 4.10. SpYebF-anti-HER2 scFv-6xHis için ortam ve saat taraması M: Protein standardı

Üretilen scFv'lerin spDsbA-anti-HER2scFv-6xHis (L2-1) ve spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis (L3-3) ile yapılan versiyonlarının karakterizasyonu için yükleme yapılan SDS-PAGE jel görüntüsü Şekil 4.11'de hücre içi proteinler, Şekil 4.12'de ise hücre dışı proteinler olarak verilmiştir. Bu şekillerde L2 ve L3'e ait kuyulardaki periplazmik üretime yönelik tasarlanan proteinlerin 29 kDa bandında olması beklenmektedir. L3'ü gösteren bantların beklenen yerde mevcut olması, rekombinant proteinlerin varlığını ve sinyal peptidinin doğru çalıştığını göstermektedir.

spDsbA-anti-HER2 scFv-6xHis'e ait kuyular, anti-HER2 scFv-6xHis ve spYebF-anti-HER2 scFv-6xHis (L1) proteinlerine ait kuyularda beklenen yerde koyu bant net olarak gözlenememiştir. Şekil 4.12'da spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis için sadece hücre içi değil, hücre dışına da yönlendirme olduğu (L3-Koloni-1 ve L3-Koloni-2) görülmektedir.



Şekil 4.11. Hücre içi proteinleri gösteren SDS-PAGE jel görüntüleri M: Protein standardı

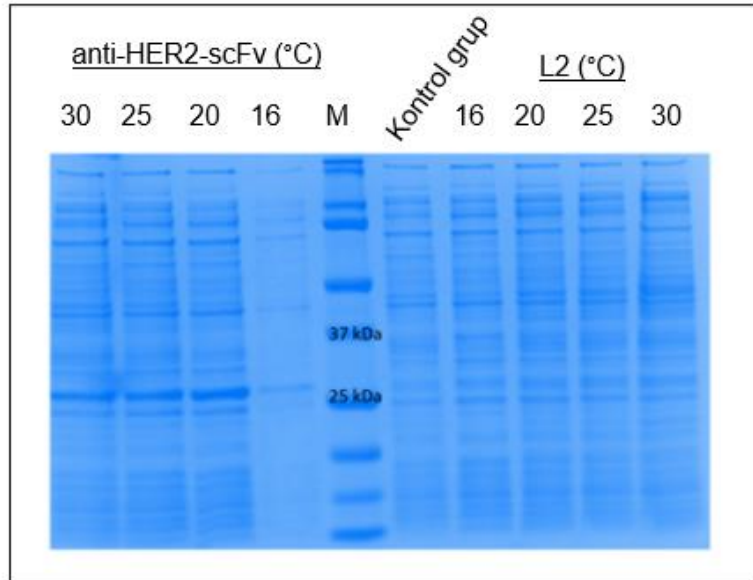


Şekil 4.12. Hücre dışı proteinleri gösteren SDS-PAGE jel görüntüleri M: Protein standardı

Üretilen scFv'lerin farklı indükleme sıcaklıklarındaki davranışını değerlendirmek adına 16°C, 20°C, 25°C ve 30°C sıcaklıkları karşılaştırılmıştır. Buna göre, kontrol grupları olarak boş pET28a ve anti-HER2 scFv plazmidi içeren *E. coli* hücreleri ile optimizasyonu hedeflenen spMBP-anti-HER2 scFv, spYebF-anti-HER2 scFv ve spDsbA-anti-HER2-scFv-6xHis plazmidlerini içeren *E. coli* hücreleri farklı sıcaklıklarda çoğaltılmıştır.

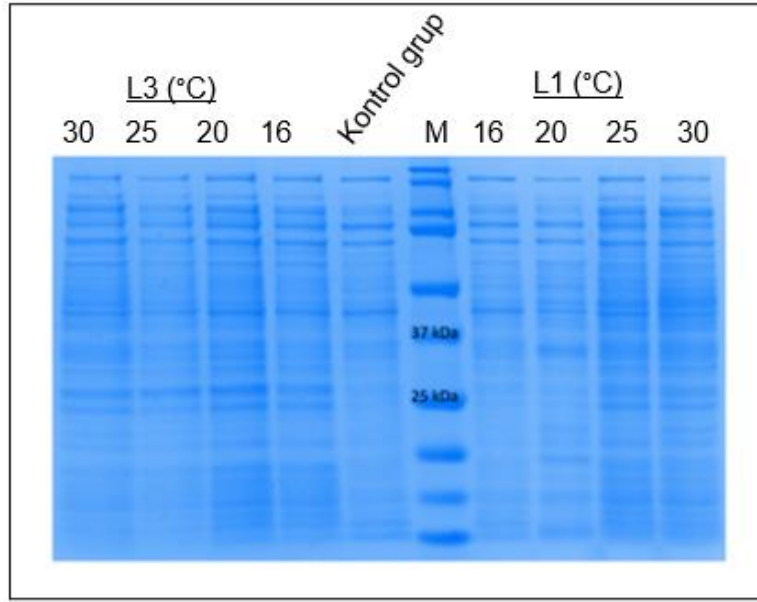
Şekil 4.13'te anti-HER2 scFv ve spDsbA-anti-HER2-scFv-6xHis (L2) proteinlerinin farklı sıcaklıklarda, hücre içi üretimlerinin jel görüntüsü verilmiştir. Buna göre ilk dört kuyudaki sitoplazmada üretime yönelik tasarlanan anti-HER2 scFv proteinleri, beklenildiği gibi 27 kDa bandında gözlenmiştir. Sıcaklık ile değişen bant yüzdelere bağlı olarak, 20 ve 25°C indükleme sıcaklıklarındaki anti-HER2 scFv üretiminin daha çok olduğu görülmektedir.

Periplazmik bölgede birikimi hedeflenen spDsbA-anti-HER2-scFv-6xHis (L2) proteinlerinin ise 29 kDa bandında olması beklenmektedir. Daha önce 30°C'deki üretimde olduğu gibi, farklı sıcaklıklarda üretimin yapılmasıyla da spDsbA-anti-HER2 scFv-6xHis proteini için beklenen yerde koyu bant gözlenememiştir.



Şekil 4.13. Farklı sıcaklıklarda (16, 20, 25, 30°C) üretilen hücre içi anti-HER2 scFv-6xHis proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü

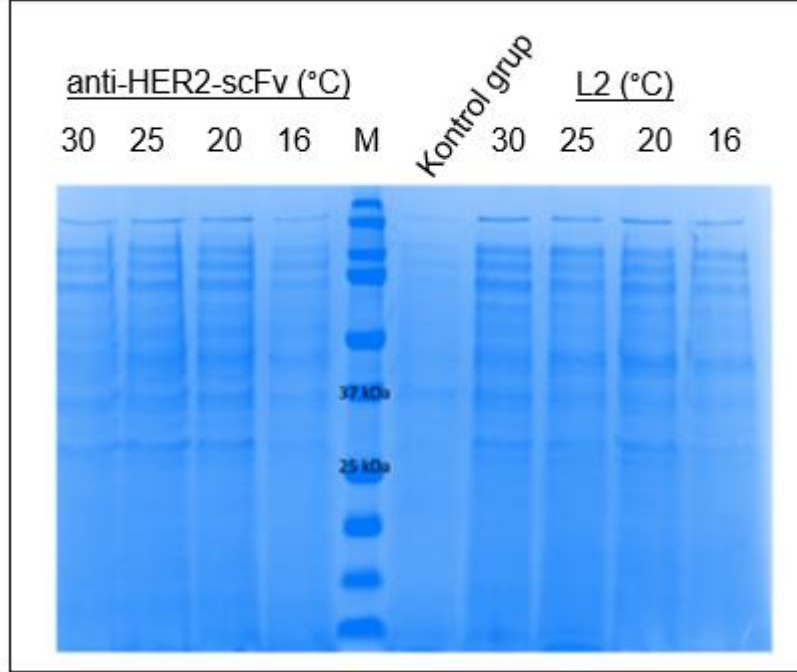
Şekil 4.14'de spMBP-anti-HER2 scFv ve spYebF-anti-HER2 scFv proteinlerinin farklı sıcaklıklarda, hücre içi üretimlerinin jel görüntüsü verilmiştir. Buna göre ilk dört kuyudaki periplazmik bölgede birikimi hedeflenen spMBP-anti-HER2 scFv proteinleri, beklenildiği gibi 29 kDa bandında gözlenmiştir. Sıcaklık ile değişen bant yüzdelere bağlı olarak, 20 ve 25°C indüklenme sıcaklıklarındaki anti-HER2 scFv üretiminin daha çok olduğu görülmektedir. Ekstraselüler bölgeye yönlendiren sinyal peptidi içermesinden dolayı, spYebF-anti-HER2 scFv proteinleri için beklenildiği gibi hücre içi bölgede 40 kDa büyüklüğünde bir bant gözlenememiştir.



Şekil 4.14. Farklı sıcaklıklarda (16, 20, 25, 30°C) üretilen hücre içi anti-HER2 scFv-6xHis proteinlerinin SDS- PAGE jel görüntüsü

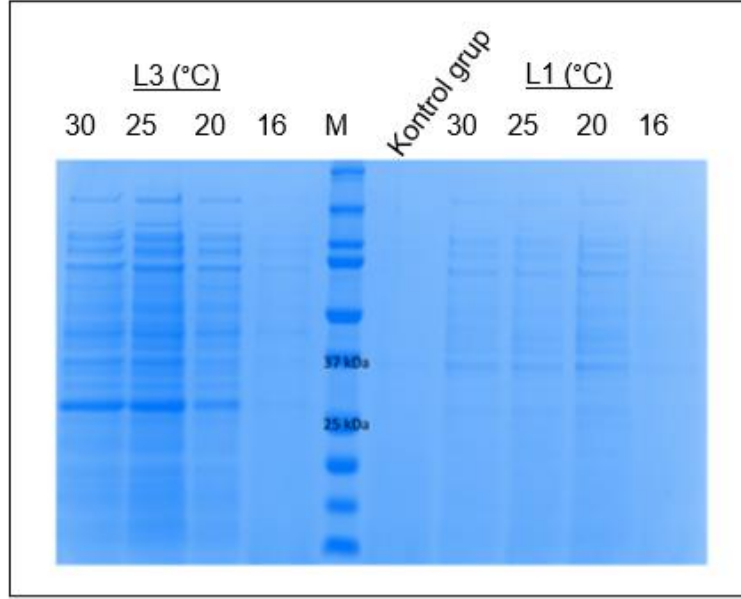
Şekil 4.15'de anti-HER2 scFv ve spDsbA-anti-HER2-scFv-6xHis proteinlerinin farklı sıcaklıklarda, hücre dışı üretimlerinin jel görüntüsü verilmiştir. Buna göre, periplazmik bölgede birikimi hedeflenen spDsbA-anti-HER2-scFv-6xHis proteinleri için 20 ve 25°C indüklenme sıcaklıklarında hücre dışına yönlendirme olduğu görülmüştür. Ancak, hücre içinde bant gözlemlenmemesi ve hücre dışındaki protein miktarının az olmasından dolayı, çalışmanın devamı için uygun bulunmamıştır. Sitoplazmada üretime yönelik tasarlanan anti-HER2 scFv proteinleri, 27 kDa bandında gözlenmiştir. Bu durum, 20, 25 ve 30°C indüklenme sıcaklıklarında belirli

bir zamandan sonra hücre dışında da birikim olduğunu göstermektedir. Şekil 4.13 ile karşılaştırıldığında, hedeflendiği gibi hücre içindeki anti-HER2 scFv miktarının hücre dışındaki birikimden fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.15. Farklı sıcaklıklarda (16, 20, 25, 30°C) üretilen hücre dışı anti-HER2 scFv-6xHis proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü

Şekil 4.16'da spMBP-anti-HER2 scFv (L3) ve spYebF-anti-HER2 scFv (L1) proteinlerinin farklı sıcaklıklarda, hücre dışı üretimlerinin jel görüntüsü verilmiştir. Buna göre, periplazmik bölgede birikimi hedeflenen spMBP-anti-HER2 scFv proteinleri için 25°C ve 30°C indükleme sıcaklıklarında sadece hücre içi değil, hücre dışına da yönlendirme olduğu görülmektedir. Ürettiği rekombinant proteini hücre dışına taşıyan sinyal peptidine sahip spYebF-anti-HER2 scFv (40 kDa) proteinleri için 20°C, 25°C ve 30°C'de görünen bantlar arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Sıcaklık optimizasyonu çalışmaları sonucunda, örneklerin hücre çoğalmaları; hücre içi ve hücre dışı rekombinant protein üretim miktarları ile göz önünde bulundurularak 25°C indükleme sıcaklığı ile üretilmeye devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.16. Farklı sıcaklıklarda (16, 20, 25, 30°C) üretilen hücre dışı anti-HER2 scFv-6xHis proteinlerinin SDS-PAGE jel görüntüsü

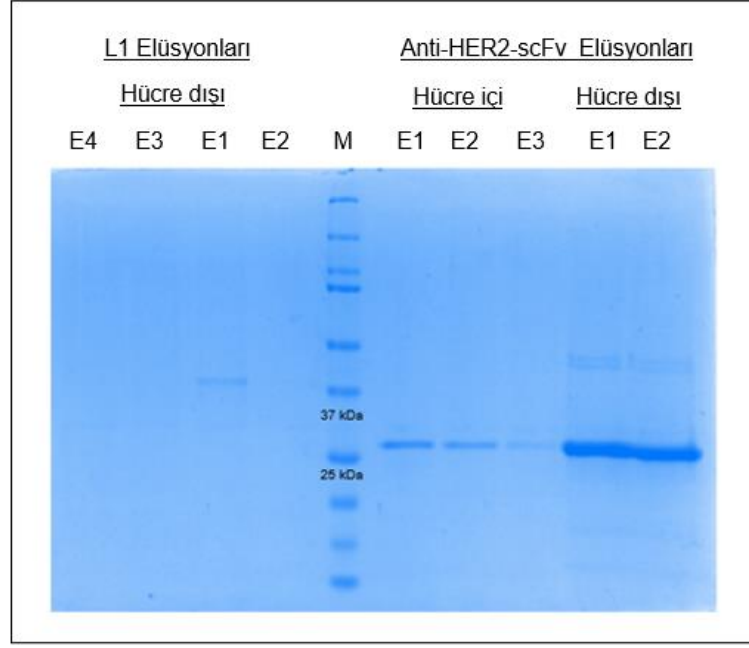
Ekstraselüler SpYebF-anti-HER2 scFv-6xHis (L1), periplazmik spDsbA-anti-HER2scFv-6xHis (L2), ekstraselüler ve periplazmik spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis (L3) ve daha önceki çalışmalarda hesaplanmış sitoplazmik örneğin verimlerinin karşılaştırılarak Çizelge 4.4'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre sitoplazmik örneğinin verimi diğerlerine kıyasla daha yüksektir. Yeni üretilen örneklerden ise en verimlisinin periplazmik spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis örneği olduğu görülmektedir. Ekstraselüler bölgeye yönelen üretim, avantajlara sahip olsa da verimi diğerlerine kıyasla daha az olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.4. Verimlerin karşılaştırılması

| Örnekler | Verim (mg/L) |
|--|--------------|
| Ekstraselüler L1 (SpYebF-anti-HER2 scFv-6xHis) | 0,41 |
| Periplazmik L2 (spDsbA-anti-HER2scFv-6xHis) | 0,55 |
| Ekstraselüler L3 (spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis) | 2,48 |
| Periplazmik L3 (spMBP-anti-HER2 scFv-6xHis) | 5,12 |
| Sitoplazmik [21] (pET28A-anti-HER2-scFv-6xHis) | 6,20 |

4.3. Üretilen Anti-HER2-ScFv'lerin Saflaştırılması ve Birincil Karakterizasyonu

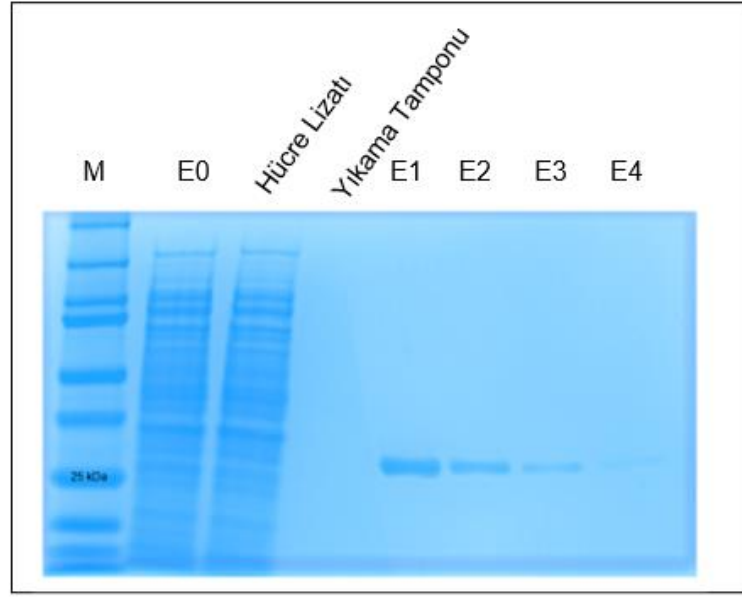
Saflaştırılan scFv'lerin Bradford yöntemi ile spektrofotometrik olarak total protein derişimleri belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisi, 0-1 mg/ml derişim aralığında, BSA proteini kullanılarak oluşturulmuştur. Anti-HER2 scFv proteinleri Bradford yöntemi ile hesaplanan protein miktarlarına göre SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile standart metodlara göre analizlenmiştir. Şekil 4.17'de anti-HER2 scFv ve yeni oluşturulan ssYebF-anti-HER2 scFv proteinlerinin saflaştırma sonrası jel görüntüleri verilmektedir. Buna göre, E1 (Elüsyon1) kuyusunda görünen bant, beklenen boyutta (40 kDa) olup, klonlanmanın doğru yapıldığını ve spYebF sinyal peptidinin ekstraselüler yönlendirmesinde sorun olmadığını göstermektedir. Diğer elüsyonlarda bant gözlemlenmemiş olması ise protein üretim veriminin düşük olduğunu göstermektedir. *E. coli* BL21(DE3) hücresinin sitoplazmasında üretimine yönelik tasarlanan anti-HER2 scFv'nin (27 kDa) ise hücre içi ve hücre dışı bölgelerde birikimi gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak, ekstraselüler ortam ayrılırken yapılan santrifüj sırasında anti-HER2 scFv'nin birikimi ve hücrelerinin patlamış olabileceği düşünülmektedir.



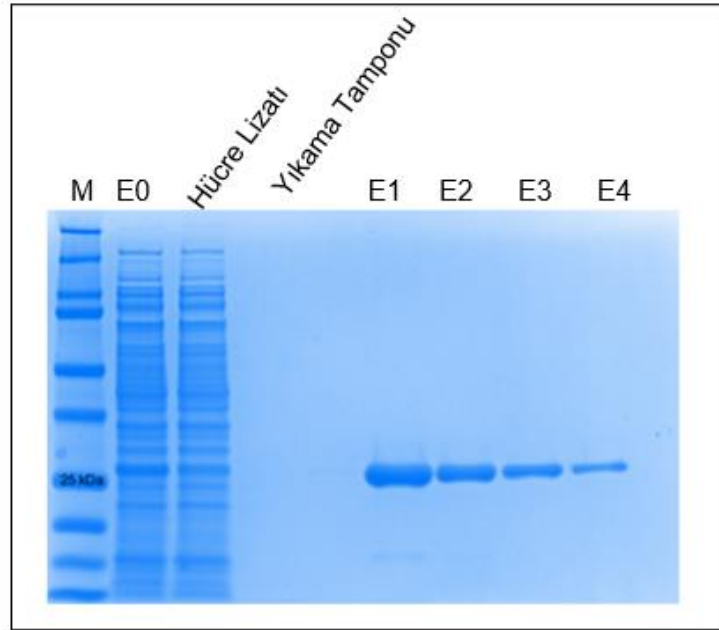
Şekil 4.17. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüleri *E. coli* BL21(DE3) pET28a-spYebF-anti-HER2 scFv-6His hücre dışı proteinleri (40 kDa)
M: Protein standardı

Saflaştırılan spDsbA-anti-HER2 ve spMBP-anti-HER2 scFv proteinleri Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmiştir. SpMBP-anti-HER2 scFv proteininin tüm elüsyonlarında (E1, E2, E3, E4) net bir bant gözlenmesi protein üretim ve saflaştırma verimlerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Şekil 4.18'de üç elüsyonda (E1, E2, E3) net olarak bant gözlemlenmiş olması spDsbA-anti-HER2 proteinin varlığını destekler nitelikte olup, verimi Şekil 4.19'daki spMBP-anti-HER2 scFv proteinine göre düşük olduğu için ileriki çalışmalar için tercih edilmemiştir.

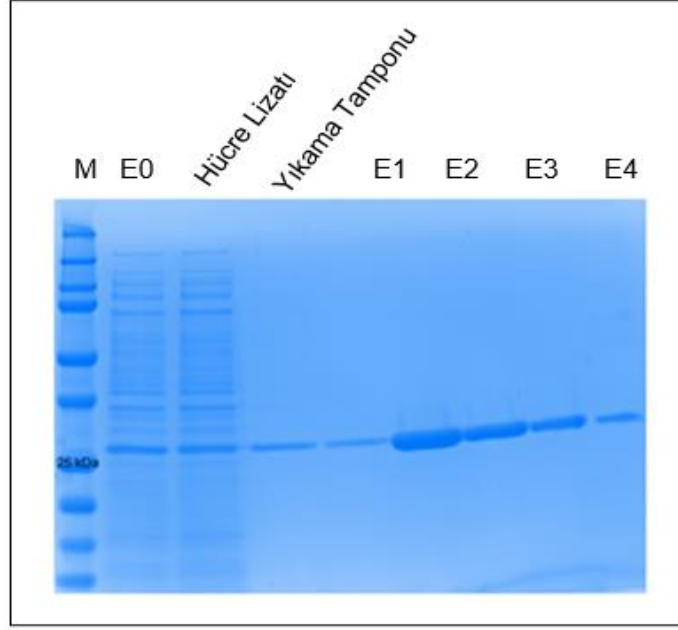
SpMBP ile yapılan üretimde hücre dışında da protein gözlemlenmesinin ardından hücre dışı proteinler de saflaştırılmıştır. Şekil 4.20'de görüldüğü gibi tüm elüsyonlarda (E1, E2, E3, E4) net bir bant gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan sonra, spMBP-anti-HER2 scFv ekstraselüler proteinleri çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 4.18. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüleri *E. coli* BL21(DE3) pET28a-spDsbA-anti-HER2 scFv-6His periplazmik proteinleri (27 kDa) M: Protein standardı

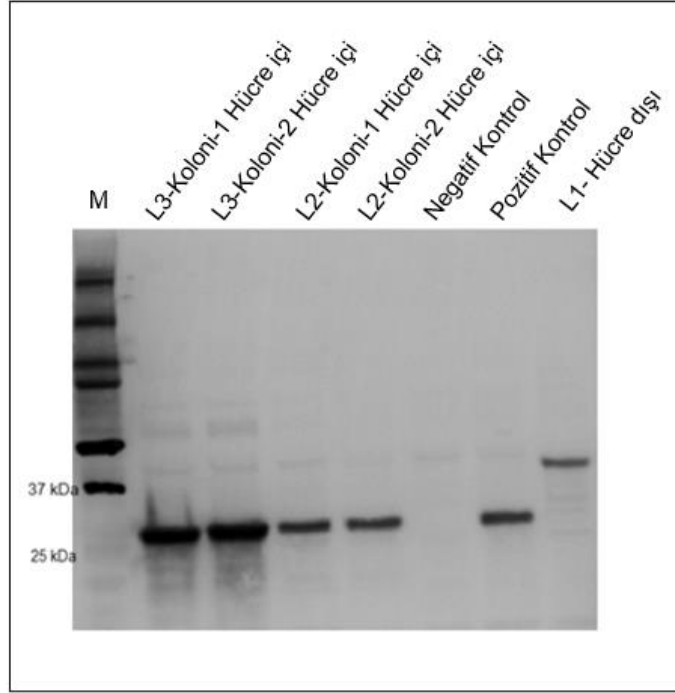


Şekil 4.19. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüleri *E. coli* BL21(DE3) pET28a-spMBP-anti-HER2 scFv-6His periplazmik proteinleri (27 kDa) M: Protein standardı



Şekil 4.20. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE jel görüntüleri *E. coli* BL21(DE3) pET28a-spMBP-anti-HER2 scFv-6His ekstraselüler proteinleri (27 kDa) M: Protein standardı

Anti-HER2 scFv proteinlerinin tamamı, Western aktarım yöntemi [78, 109][78, 109] kullanılarak, anti-His antikoruna ile analiz edilmiştir. BioRad Gel Doc Ez sistemi ile Şekil 4.21’de verildiği gibi görüntülenmiştir. Şekilde spMBP-anti-HER2 scFv (L3) ile pDsbA-anti-HER2 scFv-6xHis (L2) proteinleri beklenildiği gibi 29 kDa bandında görülmüştür. Periplazmik bölgede üretime yönelik tasarlanan spDsbA-anti-HER2 scFv-6xHis’in Şekil 4.11’de net bir şekilde görülmemesi Western blot analizi (Şekil 4.21) ile gözlenmesi, spDsbA sinyal peptidinin doğru bir şekilde çalıştığını ancak Şekil 4.18’de görüldüğü üzere spDsbA-anti-HER2 scFv proteininin üretim veriminin az olduğu çıkarımını doğrulamaktadır.

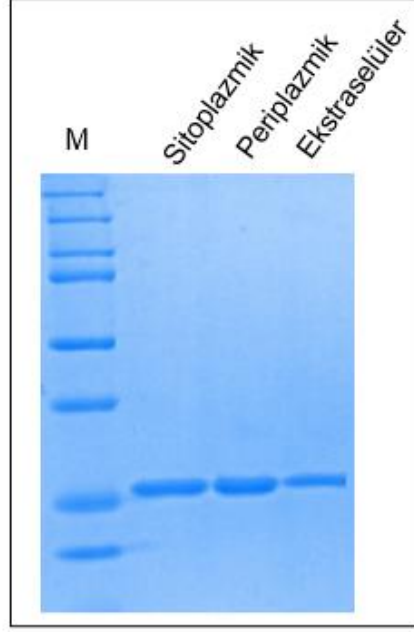


Şekil 4.21. Western Blot görüntüsü M: Protein standardı

4.4. Üretilen Anti-HER2-ScFv'lerin İkincil Karakterizasyonu

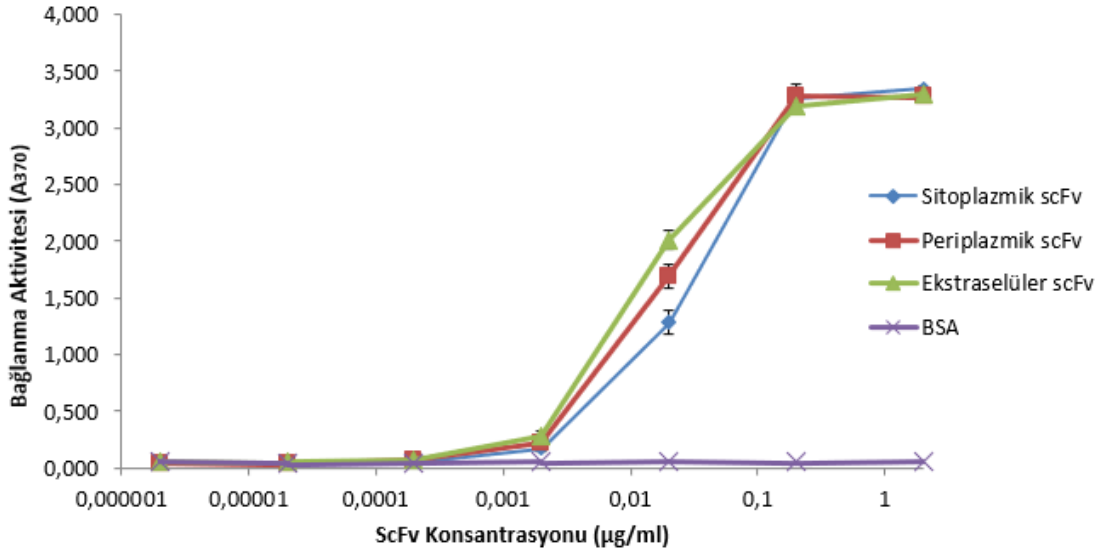
Ekstraselüler, periplazmik ve sitoplazmik bölümlerden alınarak saflaştırılan scFvler, saflaştırıldıktan sonra konsantre edilmiştir. Yüzde yüze yakın oranda saf çıkan örneklerin SDS jel görüntüleri Şekil 4.22'te verilmiştir. Örneklerin bulunduğu sütunlarda farklı hiçbir bant olmaması tamamen saf olduklarını göstermektedir.

Üretilen scFv'lerin doğru antijene bağlanıp bağlanmadığını görmek adına yapılan ELISA testinde scFv derişimi her defasında 10 kat seyreltilerek ilerlenmiştir. Sonucu Şekil 4.23'te verilen analizde, scFv'ler doğru antijene sorunsuz bir şekilde bağlanmış ve benzer bağlanma davranışı göstermiştir. Bu sonuç, yeni scFvler'in tam-antikorlardaki gibi antijenlerle anahtar kilit ilişkisi göstermesi sayesinde oluşmuştur. Özgüllük açısından fark olmadığını, tam-antikorlar yerine özellikle diagnostik gibi özgüllük gerektiren konular için yeterli olacağı fikrini desteklemektedir. Beklendiği gibi konsantrasyon arttıkça sinyal artmıştır



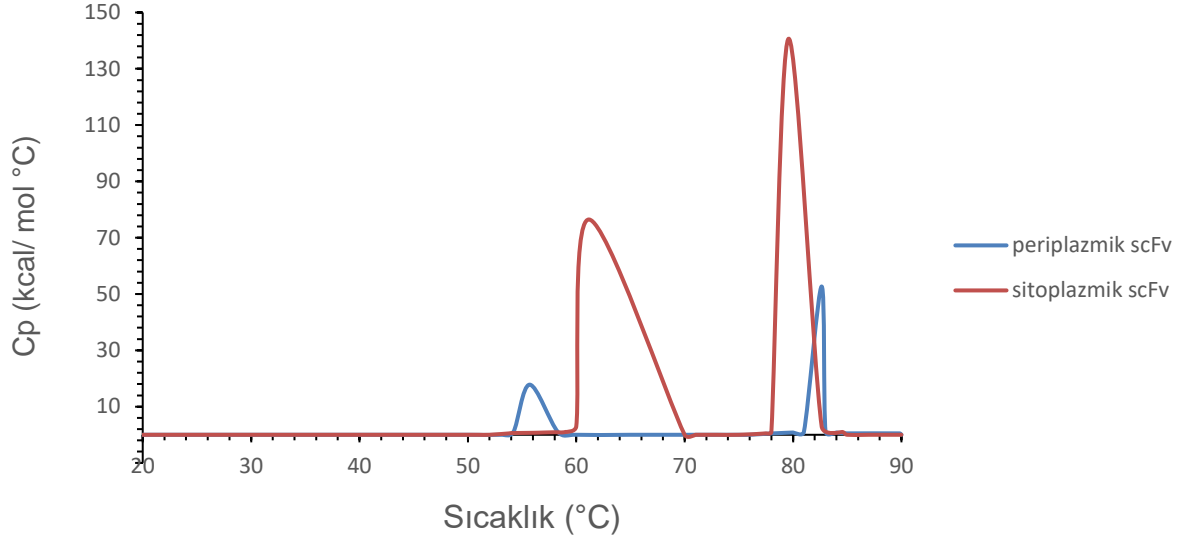
Şekil 4.22. Saflaştırılan ve konsantre edilen scFv'lerin SDS- PAGE jel görüntüsü M: Protein standardı

Özgüllük açısından fark olmadığını, tam-antikorlar yerine özellikle diagnostik gibi özgüllük gerektiren konular için yeterli olacağı fikrini desteklemektedir. Beklendiği gibi konsantrasyon arttıkça sinyal artmıştır. Doymuluktan önceki noktada bağlanma aktivitelerinde fark görünse de, aynı noktada doymuluğa ulaşmışlardır. Bu sonuç scFvlerin ana sekanslarının (VL, VH ve disülfid bağı) aynı olması nedeniyle olası bir sonuçtur. N-uçlarına eklenen sinyal peptitlerinin, scFv'lerin antijen bağlanma bölgesine ve dolayısıyla aktivesine etki etmediği Şekil 4.23'ten görülmektedir. Stabilizasyon için önemli olan disülfid bağının, üç scFv türünde aynı olması da bu sonucu desteklemektedir. Böylece, çalışmaya katılan scFv'ler arasında özgüllükleri açısından anlamlı bir fark olmadığı ve hangi ortamdan alındıklarının özgüllüklerine kayda değer bir etkisi olmadığı sonucu çıkmaktadır. Negatif kontrol olarak kullanılan BSA proteininde sinyal göstermemesi bağlanmadığını, yani çalışmayı doğrulamaktadır.



Şekil 4.23. Saflaştırılmış anti-HER2 scFv'lerinin ticari HER2'ye karşı antijen bağlama aktivitesi (ELISA).

DSC taramasında sıcaklık yükseltildiğinde proteinsel yapı açılırken entalpi değişimleri (ΔH) ölçülmüştür. Yapısal olarak açılma gösterirken oluşan tepenin orta noktası, T_m olarak adlandırılan karakteristik bir sıcaklıktır. Antikorlar ve antikor fragmanları için tek bir tepe noktası olmayabilir [110]. Şekil 4.24'te görüldüğü gibi perioplazmik örnek için bu sıcaklıklar $55,7^\circ\text{C}$ ve $82,6^\circ\text{C}$ iken, sitoplazmik örnek için $61,2^\circ\text{C}$ ve $79,6^\circ\text{C}$ 'dir. T_m değerleri kıyaslandığında, sitoplazmik örnek için termal olarak daha karardır sonucuna ulaşılır. Isı kapasitesi (C_p), değerleri de sırasıyla perioplazmik örnek için $17,8$ ($\text{kcal}/(\text{mol}\times^\circ\text{C})$) ve $52,7$ ($\text{kcal}/(\text{mol}\times^\circ\text{C})$); sitoplazmik örnek için $76,5$ ($\text{kcal}/(\text{mol}\times^\circ\text{C})$) ve $140,7$ ($\text{kcal}/(\text{mol}\times^\circ\text{C})$) olarak bu sonucu desteklemektedir.



Şekil 4. 24. Periplazmik ve Sitoplazmik scFv örnekleri için DSC termogram grafiği

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak antikor fragmanlarından olan anti-HER2-scFv'nin *Escherichia coli*'de farklı şekillerde üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen scFv'lerin çözünür, aktif ve doğru katlanmış özelliklere sahip olduğu doğrulanmıştır. ScFv'nin *E. coli*'nin periplazmik ve hücre dışı üretimine yönelik dört yeni tasarım yapılmıştır. Daha önce laboratuvar ekibimiz tarafından tasarlanan anti-HER2-scFv [21] sitoplazmik bölüme yönelik olarak kullanılmıştır. *E. coli*'nin üç farklı bölümünden alınan spMBP, spDsbA, spYebF ile birleştirilen scFv genleri, agaroz jel ile desteklenen restriksiyon kontrollerinin ardından DNA dizi analizi ile sekanslarının doğruluğu ispatlanmıştır. Daha sonra üretim aşamasına geçmek için plazmidler *E. coli* BL21(DE3) suşuna aktarılmıştır. Sitoplazmik örnek için ise *E. coli* SHuffle T7 Express ile üretim gerçekleştirilmiştir. Yapılan tasarımların, öncelikle en yaygın kullanımdaki LB ortamı ile üretimine başlanmıştır. Daha sonra, üretim sonrası SDS jel ile görüntülenemeyen spYebF ile birleştirilmiş scFv'nin üretimi ise TB ortamında başarılı olmuştur. Tüm scFv'lerin hücre içi ve hücre dışı durumları değerlendirilmiştir.

Tasarlanan scFv'lerin üretim sürecindeki verimini arttırmak adına 16°C, 20°C, 25°C ve 30°C sıcaklıklarında üretim verimleri karşılaştırılmıştır. Sitoplazmik üretim için de kullanılan ve davranışı bilinen anti-HER2 scFv pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. SpDsbA ile yapılan sıcaklık taramasında ilk üretimde olduğu gibi diğer sıcaklıklarda da net bir bant gözlemlenememiştir. SpDsbA ile yapılan üretimde hücre içinde net bant gözlenmesi ve hücre dışında 25°C ve 30°C'de net olmayan bir bant gözlenmiş olması spDsbA ile yapılan üretimin veriminin ileri aşama deneyleri için yetersiz olduğu sonucunu doğurmuştur.

Hücre içi üretimi gözlemlmek adına spMBP ve spYebF ile yapılan üretimler aynı jel üzerinde değerlendirilmiştir. Beklendiği gibi spMBP ile yapılan üretimde hücre içinde 20°C ve 25°C'de 29 kDa bandında gözlenmiştir. SpYebF ile yapılan üretim hücre dışına özgü olduğu için hücre içinde protein gözlemlenmemiştir. Hücre dışına da yönlendirebildiği görülen spMBP ile yapılan üretim ile hücre dışı üretim için seçilen spYebF ile yapılan üretimin sıcaklık taraması aynı jelle yüklenerek görüntülenmiştir. SpMBP ile yapılan üretimde 25°C ve 30°C indüklenme sıcaklıklarında sadece hücre içi değil, hücre dışına da yönlendirme olduğu

görülmektedir. spYebF ile yapılan üretimde 20°C, 25°C ve 30°C'de belirgin bir fark görülmemiştir.

Optimizasyon amaçlı yapılan sıcaklık taraması sonucunda, çoğalmaları hücre içi ve hücre dışı scFv'lerin üretim miktarlarına göre değerlendirilerek 25°C indüklenme sıcaklığı ile devam edilmiştir. Seçilen sıcaklık ve ortamlarda yeniden üretim yapılarak örnekler saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucunda spYebF ve spDsbA ile yapılan üretimde de beklenen yerlerde bant gözlenmiştir.

Saflaştırılan scFv'ler kullanılarak verim hesabı yapılmıştır. SDS jel görüntülerinde safsızlıkları kontrol edilmiştir. Saflaştırma başarıyla gerçekleştirilmiş ve devam etmek için uygun bulunmuştur. Ekstraselüler örneklerden spMBP ile yapılan üretim verimi spYebF ile yapılandan daha yüksek olması ikincil analizlere ekstraselüler spMBP ile yapılan üretimle devam edilmesi sonucuna ulaştırmıştır. Periplazmik üretim için ise SDS jel görüntülerinden beklendiği gibi spDsbA için oldukça düşüktür. Bu yüzden ikincil analizlere spMBP periplazmik örnekleri seçilmiştir. Sitoplazmik üretimin verimi diğerlerine kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir.

Western Blot analizi ile saflaştırılan scFv'lerin antijen bağlanıp bağlanmadığı kontrol edilmiş, bütün scFv'ler bağlanma göstermiştir. DSC ve ELISA analizleriyle ikincil karakterizasyonları yapılmıştır. ELISA analizine her bölümden bir protein seçilmiş ve üç bölüme ait bağlanma davranışı kıyaslanmıştır. Üç farklı bölümden alınan proteinler benzer bağlanma davranışı göstermiştir. Aynı konsantrasyonda bağlanarak, aynı noktada doygunluğa ulaşmıştır. Bu sonuç, farklı sinyal peptidi kullanılmasının ve farklı bölümlere yönlendirilerek yapılan üretiminin bağlanma davranışını etkilemediğini göstermektedir. DSC analizi için ekstraselüler örneğin verimi yetersiz bulunmuştur. Periplazmik ve sitoplazmik scFv'lerin stabiliteleri kıyaslanmıştır. Analiz ile edilen sonuçlardan özgül ısıları hesaplanarak sıcaklığa karşı özgül ısı grafiği oluşturulmuştur. İki farklı pik gözlemlenmesinin antikor fragmanları için gözlemlenebilen bir davranış olduğu ve ikinci pikten sonra protein yapısının tamamen açıldığı bilinmektedir. Kıyaslanan scFv'ler için sitoplazmik örneğin özgül ısı ve Tm sıcaklıkları değerlendirildiğinde, stabilitesinin periplazmik örnekten daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çalışma sonucunda sitoplazmik üretim, birçok açıdan daha verimli bulunmuştur. Ancak spMBP ile yapılan periplazmik üretiminin sonuçlarının sitoplazmik üretime yakınlığı yadsınamayacak düzeydedir. Literatürdeki *E. coli*'nin üç bölmesine özgü yöntemler kullanılarak yapılan çalışma eksikliğini doldurmasının yanı sıra anti-HER2 scFv'nin aktif ve çözünebilir formda spYebF ile ekstraselüler üretimi ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma HER2+ meme kanseri hücrelerine ilaç hedeflemeye ve tanı kitlerinde kullanılacak bir molekülün daha verimli bir şekilde ve daha düşük maliyetle üretiminin yanı sıra, *E. coli*'de disülfid bağı içeren kompleks rekombinant proteinlerin üretimine yönelik çalışmalar için de yol gösterici bir çalışma olmuştur.

6. KAYNAKLAR

- [1] V.J. Bruce, A.N. Ta, B.R. McNaughton, Minimalist Antibodies and Mimetics: An Update and Recent Applications, *Chembiochem* 17(20) **(2016)** 1892-1899.
- [2] K.J. Jeong, S.H. Jang, N. Velmurugan, Recombinant antibodies: Engineering and production in yeast and bacterial hosts, *Biotechnology Journal* 6(1) **(2011)** 16-27.
- [3] R. O'Kennedy, S. Fitzgerald, C. Murphy, Don't blame it all on antibodies - The need for exhaustive characterisation, appropriate handling, and addressing the issues that affect specificity, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 89 **(2017)** 53-59.
- [4] R.S. Fu, L. Carroll, G. Yahioğlu, E.O. Aboagye, P.W. Miller, Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications, *Chemmedchem* 13(23) **(2018)** 2466-2478.
- [5] H. Kabayama, M. Takeuchi, N. Tokushige, S. Muramatsu, M. Kabayama, M. Fukuda, Y. Yamada, K. Mikoshiba, An ultra-stable cytoplasmic antibody engineered for in vivo applications, *Nature Communications* 11(1) **(2020)**.
- [6] A. Liu, Y. Ye, W. Chen, X. Wang, F. Chen, Expression of V(H)-linker-V(L) orientation-dependent single-chain Fv antibody fragment derived from hybridoma 2E6 against aflatoxin B1 in *Escherichia coli*, *J Ind Microbiol Biotechnol* 42(2) **(2015)** 255-62.
- [7] R.Z. Wang, S.S. Xiang, Y.J. Feng, S. Srinivas, Y.H. Zhang, M.S. Lin, S.H. Wang, Engineering production of functional scFv antibody in *E. coli* by co-expressing the molecule chaperone Skp, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 **(2013)**.
- [8] T. Yokota, D.E. Milenic, M. Whitlow, J. Schlom, Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms, *Cancer Res* 52(12) **(1992)** 3402-8.

- [9] R.H. Engel, V.G. Kaklamani, HER2-Positive Breast Cancer, *Drugs* 67(9) **(2007)** 1329-1341.
- [10] S. Shak, Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group, *Semin Oncol* 26(4 Suppl 12) **(1999)** 71-7.
- [11] C. Sheridan, FDA approves pertuzumab, *Nature Biotechnology* 30(7) **(2012)** 570-570.
- [12] D.B. Kirpotin, D.C. Drummond, Y. Shao, M.R. Shalaby, K. Hong, U.B. Nielsen, J.D. Marks, C.C. Benz, J.W. Park, Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models, *Cancer Res* 66(13) **(2006)** 6732-40.
- [13] F. Chen, K. Ma, B. Madajewski, L. Zhuang, L. Zhang, K. Rickert, M. Marelli, B. Yoo, M.Z. Turker, M. Overholtzer, T.P. Quinn, M. Gonen, P. Zanzonico, A. Tuesca, M.A. Bowen, L. Norton, J.A. Subramony, U. Wiesner, M.S. Bradbury, Ultrasmall targeted nanoparticles with engineered antibody fragments for imaging detection of HER2-overexpressing breast cancer, *Nature Communications* 9 **(2018)**.
- [14] M. Colombo, F. Corsi, D. Foschi, E. Mazzantini, S. Mazzucchelli, C. Morasso, E. Occhipinti, L. Polito, D. Prosperi, S. Ronchi, P. Verderio, HER2 targeting as a two-sided strategy for breast cancer diagnosis and treatment: Outlook and recent implications in nanomedical approaches, *Pharmacological Research* 62(2) **(2010)** 150-165.
- [15] A. Saeed, R.Z. Wang, S.M. Ling, S.H. Wang, Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future, *Frontiers in Microbiology* 8 **(2017)**.

- [16] V. Joosten, C. Lokman, C. van den Hondel, P.J. Punt, The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi, *Microbial Cell Factories* 2 **(2003)**.
- [17] A. Bates, C.A. Power, David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments, *Antibodies* 8(2) **(2019)**.
- [18] N.E. Weisser, J.C. Hall, Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics, *Biotechnol Adv* 27(4) **(2009)** 502-20.
- [19] V. Akbari, H.M. Sadeghi, A. Jafarian-Dehkordi, D. Abedi, C.P. Chou, Improved biological activity of a single chain antibody fragment against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expressed in the periplasm of *Escherichia coli*, *Protein expression and purification* 116 **(2015)** 66-74.
- [20] A. Gaciarz, J. Veijola, Y. Uchida, M.J. Saaranen, C. Wang, S. Hörkkö, L.W. Ruddock, Systematic screening of soluble expression of antibody fragments in the cytoplasm of *E. coli*, *Microb Cell Fact* 15 **(2016)** 22.
- [21] I. Kocer, E.C. Cox, M.P. DeLisa, E. Celik, Effects of variable domain orientation on anti-HER2 single-chain variable fragment antibody expressed in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Biotechnology Progress* 37(2) **(2021)**.
- [22] J. Lobstein, C.A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, M. Berkmen, SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm, *Microb Cell Fact* 11 **(2012)** 56.
- [23] G. Ren, N. Ke, M. Berkmen, Use of the SHuffle Strains in Production of Proteins, *Current protocols in protein science* 85 **(2016)** 5.26.1-5.26.21.
- [24] S.H. Yoon, S.K. Kim, J.F. Kim, Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Recent Pat Biotechnol* 4(1) **(2010)** 23-9.

- [25] C.M. Cheng, S.C. Tzou, Y.H. Zhuang, C.C. Huang, C.H. Kao, K.W. Liao, T.C. Cheng, C.H. Chuang, Y.C. Hsieh, M.H. Tai, T.L. Cheng, Functional Production of a Soluble and Secreted Single-Chain Antibody by a Bacterial Secretion System, *Plos One* 9(5) **(2014)**.
- [26] E. Maverakis, K. Kim, M. Shimoda, M.E. Gershwin, F. Patel, R. Wilken, S. Raychaudhuri, L.R. Ruhaak, C.B. Lebrilla, Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review, *Journal of Autoimmunity* 57 **(2015)** 1-13.
- [27] P.T. Charles A. Janeway Jr, Mark Walport, Mark J. Shlomchik et al. , *Immunobiology*, 5th ed.**2001**.
- [28] M. Reth, Matching cellular dimensions with molecular sizes (vol 14, pg 765, 2013), *Nature Immunology* 15(2) **(2014)** 205-205.
- [29] P.J. Conroy, S. Hearty, P. Leonard, R.J. O'Kennedy, Antibody production, design and use for biosensor-based applications, *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(1) **(2009)** 10-26.
- [30] J.M. Woof, D.R. Burton, Human antibody - Fc receptor interactions illuminated by crystal structures, *Nature Reviews Immunology* 4(2) **(2004)** 89-99.
- [31] G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispen, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Frontiers in Immunology* 5 **(2014)**.
- [32] M.K. Mert Selimoğlu, Gürler Akpınar, Aynur Karadenizli, Monoklonal Antikor Teknolojisi'nin Dünü, Bugünü Ve Geleceği, *Journal of Health Sciences of Kocaeli University* Vol.2, No.1, pp. 6-14 **(2016)**.

- [33] R.M. Lu, Y.C. Hwang, I.J. Liu, C.C. Lee, H.Z. Tsai, H.J. Li, H.C. Wu, Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases, *Journal of biomedical science* 27(1) **(2020)**.
- [34] M. Arbabi-Ghahroudi, Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook, *Frontiers in Immunology* 8 **(2017)**.
- [35] K. Kurosawa, W. Lin, K. Ohta, Chimeric Antibodies, in: M. Steinitz (Ed.), *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* **2014**, pp. 139-148.
- [36] G.P. Smith, Filamentous Fusion Phage - Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens On The Virion Surface, *Science* 228(4705) **(1985)** 1315-1317.
- [37] Y. Asaadi, F.F. Jouneghani, S. Janani, F. Rahbarizadeh, A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments, *Biomarker Research* 9(1) **(2021)**.
- [38] Z.A. Ahmad, S.K. Yeap, A.M. Ali, W.Y. Ho, N.B.M. Alitheen, M. Hamid, scFv Antibody: Principles and Clinical Application, *Clinical & developmental immunology* **(2012)**.
- [39] A. Todorovska, R.C. Roovers, O. Dolezal, A.A. Kortt, H.R. Hoogenboom, P.J. Hudson, Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting, *Journal of Immunological Methods* 248(1-2) **(2001)** 47-66.
- [40] M. Whitlow, B.A. Bell, S.L. Feng, D. Filpula, K.D. Hardman, S.L. Hubert, M.L. Rollence, J.F. Wood, M.E. Schott, D.E. Milenic, T. Yokota, J. Schlom, An Improved Linker For Single-Chain Fv With Reduced Aggregation And Enhanced Proteolytic Stability, *Protein Engineering* 6(8) **(1993)** 989-995.

- [41] P.K. Satheeshkumar, Expression of Single Chain Variable Fragment (scFv) Molecules in Plants: A Comprehensive Update, *Molecular Biotechnology* 62(3) **(2020)** 151-167.
- [42] Z. Li, B.F. Krippendorff, S. Sharma, A.C. Walz, T. Lave, D.K. Shah, Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments, *Mabs* 8(1) **(2016)** 113-119.
- [43] P. Holliger, P.J. Hudson, Engineered antibody fragments and the rise of single domains, *Nature Biotechnology* 23(9) **(2005)** 1126-1136.
- [44] K.J. Arlotta, S.C. Owen, Antibody and antibody derivatives as cancer therapeutics, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 11(5) **(2019)** e1556.
- [45] J. Kaur, A. Kumar, J. Kaur, Strategies for optimization of heterologous protein expression in E-coli: Roadblocks and reinforcements, *International Journal of Biological Macromolecules* 106 **(2018)** 803-822.
- [46] A. Sandomenico, J.P. Sivaccumar, M. Ruvo, Evolution of Escherichia coli Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments, *International Journal of Molecular Sciences* 21(17) **(2020)**.
- [47] G.L. Rosano, E.S. Morales, E.A. Ceccarelli, New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update, *Protein Science* 28(8) **(2019)** 1412-1422.
- [48] G.J. Gopal, A. Kumar, Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli, *Protein Journal* 32(6) **(2013)** 419-425.
- [49] G.L. Rosano, E.A. Ceccarelli, Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges, *Frontiers in Microbiology* 5 **(2014)**.

- [50] B. Jia, C.O. Jeon, High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives, *Open Biology* 6(8) **(2016)**.
- [51] D.F. Gao, S.J. Wang, H.R. Li, H.L. Yu, Q.S. Qi, Identification of a heterologous cellulase and its N-terminus that can guide recombinant proteins out of *Escherichia coli*, *Microbial Cell Factories* 14 **(2015)**.
- [52] M. Ahmadzadeh, F. Farshdari, L. Nematollahi, M. Behdani, E. Mohit, Anti-HER2 scFv Expression in *Escherichia coli* SHuffle (R) T7 Express Cells: Effects on Solubility and Biological Activity, *Molecular Biotechnology* 62(1) **(2020)** 18-30.
- [53] M. Ahmadzadeh, F. Farshdari, M. Behdani, L. Nematollahi, E. Mohit, Cloning, Expression and One-Step Purification of a Novel IP-10-(anti-HER2 scFv) Fusion Protein in *Escherichia coli*, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 27(1) **(2021)** 433-446.
- [54] A. Sarker, A.S. Rathore, R.D. Gupta, Evaluation of scFv protein recovery from *E-coli* by in vitro refolding and mild solubilization process, *Microbial Cell Factories* 18 **(2019)**.
- [55] S. Schlegel, E. Rujas, A.J. Ytterberg, R.A. Zubarev, J. Luirink, J.W. de Gier, Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels, *Microbial Cell Factories* 12 **(2013)**.
- [56] A. Malik, Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of *E. coli*, *3 Biotech* 6 **(2016)**.
- [57] A. Mesgari-Shadi, M.H. Sarrafzadeh, Osmotic conditions could promote scFv antibody production in the *Escherichia coli* HB2151, *Bioimpacts* 7(3) **(2017)** 199-206.

- [58] C.J. Huang, H. Lin, X.M. Yang, Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39(3) **(2012)** 383-399.
- [59] L.A. Fernandez, I. Sola, L. Enjuanes, V. de Lorenzo, Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system, *Applied and Environmental Microbiology* 66(11) **(2000)** 5024-+.
- [60] J.L. Baker, E. Celik, M.P. DeLisa, Expanding the glycoengineering toolbox: the rise of bacterial N-linked protein glycosylation, *Trends in Biotechnology* 31(5) **(2013)** 49-59.
- [61] O. Pines, M. Inouye, Expression and secretion of proteins in *E. coli*, *Molecular Biotechnology* 12(1) **(1999)** 25-34.
- [62] C. Goemans, K. Denoncin, J.F. Collet, Folding mechanisms of periplasmic proteins, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1843(8) **(2014)** 1517-1528.
- [63] Uniprot, <https://www.uniprot.org/help/signal>, **2022**. (Accessed 24.05.2022 2022).
- [64] NCBI, BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, **2022**. (Accessed 24/04/2022 2022).
- [65] D.H. Tech, Signal P-6.0, <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>, **2022**. (Accessed 25/04/2022 2022).
- [66] L. LABORATORIES, SoluProt 1.0, <https://loschmidt.chemi.muni.cz/soluprot/>. (Accessed 25/04/2022 **2022**).

- [67] T. Baumgarten, A.J. Ytterberg, R.A. Zubarev, J.W. de Gier, Optimizing Recombinant Protein Production in the Escherichia coli Periplasm Alleviates Stress, *Applied and Environmental Microbiology* 84(12) **(2018)**.
- [68] NIH, GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. (Accessed 25/04/2022 **2022**).
- [69] H. Sonoda, Y. Kumada, T. Katsuda, H. Yamaji, Effects of cytoplasmic and periplasmic chaperones on secretory production of single-chain Fv antibody in Escherichia coli, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111(4) **(2011)** 465-470.
- [70] A. Gaciarz, N.K. Khatri, M.L. Velez-Suberbie, M.J. Saaranen, Y. Uchida, E. Keshavarz-Moore, L.W. Ruddock, Efficient soluble expression of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of Escherichia coli in fed-batch fermentations on chemically defined minimal media, *Microbial Cell Factories* 16 **(2017)**.
- [71] A.P. Liu, Y. Ye, W.F. Chen, X.H. Wang, F.S. Chen, Expression of V-H-linker-V-L orientation-dependent single-chain Fv antibody fragment derived from hybridoma 2E6 against aflatoxin B-1 in Escherichia coli, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 42(2) **(2015)** 255-262.
- [72] T. Yokota, D.E. Milenic, M. Whitlow, J. Schlom, Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms, *Cancer Research* 52(12) **(1992)** 3402-3408.
- [73] A. Karyolaimos, H. Ampah-Korsah, T. Hillenaar, A. Mestre Borrás, K.M. Dolata, S. Sievers, K. Riedel, R. Daniels, J.W. de Gier, Enhancing Recombinant Protein Yields in the E. coli Periplasm by Combining Signal Peptide and Production Rate Screening, *Front Microbiol* 10 **(2019)** 1511.
- [74] K. Mirzadeh, P.J. Shilling, R. Elfageih, A.J. Cumming, H.L. Cui, M. Rennig, M.H.H. Norholm, D.O. Daley, Increased production of periplasmic proteins in

Escherichia coli by directed evolution of the translation initiation region, *Microbial Cell Factories* 19(1) **(2020)**.

[75] K.S. Rostinawati T1*, Yusuf M2, Gaffar S2 and Subroto, T2, Construction and Expression of Synthetic-gene encoding anti-HER2 scFv Fused with pelB in *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* Vol. 9(11) **(2017)**.

[76] K.S. Dewi, D.S. Retnoningrum, C. Riani, A.M. Fuad, Construction and Periplasmic Expression of the Anti-EGFRvIII ScFv Antibody Gene in *Escherichia coli*, *Scientia Pharmaceutica* 84(1) **(2016)** 141-152.

[77] K.I. Na, S.J. Kim, D.S. Choi, W.K. Min, S.G. Kim, J.H. Seo, Extracellular production of functional single-chain variable fragment against aflatoxin B-1 using *Escherichia coli*, *Letters in Applied Microbiology* 68(3) **(2019)** 241-247.

[78] Z. Yildirim, E. Celik, Periplasmic and extracellular production of cellulase from recombinant *Escherichia coli* cells, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 92(2) **(2017)** 319-324.

[79] Z.Y. Chen, J. Cao, L. Xie, X.F. Li, Z.H. Yu, W.Y. Tong, Construction of leaky strains and extracellular production of exogenous proteins in recombinant *Escherichia coli*, *Microbial biotechnology* 7(4) **(2014)** 360-70.

[80] Z.G. Qian, X.X. Xia, J.H. Choi, S.Y. Lee, Proteome-based identification of fusion partner for high-level extracellular production of recombinant proteins in *Escherichia coli*, *Biotechnol Bioeng* 101(3) **(2008)** 587-601.

[81] G. Zhang, S. Brox, J.H. Weiner, Extracellular accumulation of recombinant proteins fused to the carrier protein YebF in *Escherichia coli*, *Nature Biotechnology* 24(1) **(2006)** 100-104.

- [82] A. Sandomenico, J.P. Sivaccumar, M. Ruvo, Evolution of Escherichia coli Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments, *Int. J. Mol. Sci.* 21(17) **(2020)** 39.
- [83] C. Huang, Jr., H. Lin, X. Yang, Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39(3) **(2012)** 383-399.
- [84] K.J. Jeong, S.H. Jang, N. Velmurugan, Recombinant antibodies: engineering and production in yeast and bacterial hosts, *Biotechnol J* 6(1) **(2011)** 16-27.
- [85] S.K. Gupta, P. Shukla, Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review, *Critical Reviews in Microbiology* 43(1) **(2017)** 31-42.
- [86] S.S.J. Leong, W.N. Chen, Preparing recombinant single chain antibodies, *Chemical Engineering Science* 63(6) **(2008)** 1401-1414.
- [87] M. Liu, B. Wang, F. Wang, Z. Yang, D. Gao, C. Zhang, L. Ma, X. Yu, Soluble expression of single-chain variable fragment (scFv) in Escherichia coli using superfolder green fluorescent protein as fusion partner, *Applied microbiology and biotechnology* 103(15) **(2019)** 6071-6079.
- [88] D. Esposito, D.K. Chatterjee, Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags, *Curr Opin Biotechnol* 17(4) **(2006)** 353-8.
- [89] P.H. Bessette, F. Aslund, J. Beckwith, G. Georgiou, Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(24) **(1999)** 13703-8.
- [90] A. Gaciarz, J. Veijola, Y. Uchida, M.J. Saaranen, C. Wang, S. Hörkkö, L.W. Ruddock, Systematic screening of soluble expression of antibody fragments in the cytoplasm of E. coli, *Microbial Cell Factories* 15(1) **(2016)** 22.

- [91] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: a cancer journal for clinicians* 71(3) **(2021)** 209-249.
- [92] C.S. Wynn, S.C. Tang, Anti-HER2 therapy in metastatic breast cancer: many choices and future directions, *Cancer and Metastasis Reviews* 41(1) **(2022)** 193-209.
- [93] G. Valabrega, F. Montemurro, M. Aglietta, Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer, *Annals of Oncology* 18(6) **(2007)** 977-984.
- [94] D. Zahavi, L. Weiner, Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy, *Antibodies* 9(3) **(2020)**.
- [95] L.M. Lin, L. Li, C.H. Zhou, J. Li, J.Y. Liu, R. Shu, B. Dong, Q. Li, Z. Wang, A HER2 bispecific antibody can be efficiently expressed in *Escherichia coli* with potent cytotoxicity, *Oncology Letters* 16(1) **(2018)** 1259-1266.
- [96] M. Ueda, H. Hisada, T. Temma, Y. Shimizu, H. Kimura, M. Ono, Y. Nakamoto, K. Togashi, H. Saji, Gallium-68-Labeled Anti-HER2 Single-Chain Fv Fragment: Development and In Vivo Monitoring of HER2 Expression, *Molecular Imaging and Biology* 17(1) **(2015)** 102-110.
- [97] F. Nejatollahi, M. Jaberipour, M. Asgharpour, Triple blockade of HER2 by a cocktail of anti-HER2 scFv antibodies induces high antiproliferative effects in breast cancer cells, *Tumor Biology* 35(8) **(2014)** 7887-7895.
- [98] S. Dou, X.Z. Yang, M.H. Xiong, C.Y. Sun, Y.D. Yao, Y.H. Zhu, J. Wang, ScFv-Decorated PEG-PLA-Based Nanoparticles for Enhanced siRNA Delivery to Her2(+) Breast Cancer, *Advanced Healthcare Materials* 3(11) **(2014)** 1792-1803.

- [99] F. Farshdari, M. Ahmadzadeh, L. Nematollahi, E. Mohit, The improvement of anti-HER2 scFv soluble expression in Escherichia coli, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 56 (2020).
- [100] Z. Yıldırım, E. Çelik, Periplasmic and extracellular production of cellulase from recombinant Escherichia coli cells, 92(2) (2017) 319-324.
- [101] K.A.J. Nina Irwin, *Molecular Cloning Laboratory Manual 3th Editin*, 2001
- [102] A.C. Fisher, C.H. Haitjema, C. Guarino, E. Çelik, C.E. Endicott, C.A. Reading, J.H. Merritt, A.C. Ptak, S. Zhang, M.P. DeLisa, Production of secretory and extracellular N-linked glycoproteins in Escherichia coli, *Appl Environ Microbiol* 77(3) (2011) 871-81.
- [103] M.S. Green, J., *Molecular Cloning A Laboratory Manual (4th Edition)*, 2012.
- [104] K. Salimi, D.D. Usta, İ. Koçer, E. Çelik, A. Tuncel, Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni²⁺ carrying monodisperse composite microspheres, *RSC Advances* 7(14) (2017) 8718-8726.
- [105] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- [106] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4, *Nature* 227(5259) (1970) 680-&.
- [107] Ç. Kip, R.B. Tosun, S. Alpaslan, İ. Koçer, E. Çelik, A. Tuncel, Ni(II)-decorated porous titania microspheres as a stationary phase for column chromatography applications: Highly selective purification of hemoglobin from human blood, *Talanta* 200 (2019) 100-106.

[108] K. Salimi, D.D. Usta, İ. Koçer, E. Çelik, A. Tuncel, Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO₂ microspheres for affinity purification of immunoglobulin G, *Int J Biol Macromol* 111 **(2018)** 178-185.

[109] J.F.S. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, USA: Cold Spring Harbor. 2100. **(2001)**.

[110] T. Tadokoro, M.L. Jahan, Y. Ito, M. Tahara, S. Chen, A. Imai, N. Sugimura, K. Yoshida, M. Saito, T. Ose, T. Hashiguchi, M. Takeda, H. Fukuhara, K. Maenaka, Biophysical characterization and single-chain Fv construction of a neutralizing antibody to measles virus, *Febs j* 287(1) **(2020)** 145-159.

EKLER

EK 1 – Sekans sonuçları

EK-1A. pET28a-spYebF-anti-HER2-scFv-6xHis sekans analizi (L1)

```

          *       *       *       *       *       *       *
18>-----AACAAATCCOCTCTAGAAAAGGAGATATACATATGAAAAAAGAGGGGGCGTTTTAGGGCTGTTGTTGGTTCTGCOCTGCG>97
4999>taggggaattgtgagcggataacaattccoctctagaaggagatatacaTatgaaaaaaagagggcggttttagggctgtgtgtggtttctgcoctgcg>5098

          *       *       *       *       *       *       *
98>CATCAGTTTTGCGTCCAATAATGAAACCAGCAAGTCGGTCACTTCCCAAAGTGTGAAGATCTGGATGCTGCCGGAATTGCCGCGAGCGTAAAACGTGA>197
5099>catcagttttcgtgccaataatgaaaccagcaagtcggtcactttcccaaagtgtgaagatctggatgctgccggaattgccgcgagcgtaaaacgtga>5198

          *       *       *       *       *       *       *
198>TTATCAACAAAATCGCGTGGCGCGTGGGGCAGATGATCAAAAAATTGTCGGTCAGGCCGATCCCGTGGCTTGGGTCAGTTGCAGGACATTCAGGGTAAA>297
5199>ttatcaacaaaatcgctggcgttggggcagatgatcaaaaaattgtcggtcaggccgatcccgtggcttgggtcagtttgaggacattcagggtaaa>5298

          *       *       *       *       *       *       *
298>GATGATAAATGGTCAGTACCCTAACCGTGCCTGAAAGTGCCTGATTCATTACAGGTCAGCGTGGACTGCAAAAGCGGGAATGGCGGAATATCAGC>397
5299>gatgataaattggtcagtaccgctaaccgtgcgtggtaaaagtgccgatattcattaccaggtcagcgtggactgcaaaagcgggaatggcggaaatcagc>5398

          *       *       *       *       *       *       *
398>GGCGTACCATGGATATTCAAATGACCCAAAGCCCGCTCTCTTTAAGCGCGTCTGTCGGTGATCGCGTGACCATCACGTTGTCGGGACCAAGATGTTAA>497
5399>ggcgtAccatgATATTCAAATGACCCAAAGCCCGCTCTCTTTAAGCGCGTCTGTCGGTGATCGCGTGACCATCACGTTGTCGGGACCAAGATGTTAA>5498

          *       *       *       *       *       *       *
498>TACGGCGTGGCTGGTATCAACAAAACCGGGTAAAGCCCGAAGCTGTTAATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACTCTGGCGTCCCGAGCCGCTTTTCT>597
5499>TACGGCGTGGCTGGTATCAACAAAACCGGGTAAAGCCCGAAGCTGTTAATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACTCTGGCGTCCCGAGCCGCTTTTCT>5598

          *       *       *       *       *       *       *
598>GGCAGCCGCGAGCGGTACGGACTTCACGCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTTGCCACCTATTATTGTGACGAGCACTACACACCCCGCCAA>697
5599>ggcagccgCGAGCGGTACGGACTTCACGCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTTGCCACCTATTATTGTGACGAGCACTACACACCCCGCCAA>5698

          *       *       *       *       *       *       *
698>CCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTGGAGATTAACGCACGGGTGGAGGCGGTTACGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGATCGGAGGTTCAATTAGTGA>797
5699>CCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTGGAGATTAACGCACGGgtggaggggttcaggcggaggtggcagcggcgggtggcggatcgGAGGTTCAATTAGTGA>5798

          *       *       *       *       *       *       *
798>ATCTGGCGGTGCTGTTGTCAGCCAGGCGGTAGCTTACGCTCTGAGCTGTGCAGCGTCTGGCTTCAACATCAAAGATACCTACATTCAATGGGTTGCGCAA>897
5799>ATCTGGCGGTGCTGTTGTCAGCCAGGCGGTAGCTTACGCTCTGAGCTGTGCAGCGTCTGGCTTCAACATCAAAGATACCTACATTCAATGGGTTGCGCAA>5898

          *       *       *       *       *       *       *
898>GCCCCAGGTAAGGCCTGGAGTGGGTGGCCCGTATCTATCCAACCAATGGCTACACGCGTTATGCAGACTCTGTGAAAGGCCGCTTCAACCATTAGCGCG>997
5899>GCCCCAGGTAAGGCCTGGAGTGGGTGGCCCGTATCTATCCAACCAATGGCTACACGCGTTATGCAGACTCTGTGAAAGGCCGCTTCAACCATTAGCGCG>5998

```

EK-1B. pET28a-spDsbA-anti-HER2-scFv-6xHis sekans analizi (L2)

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1>NNGATGTGAGCGGATAACATTCCCTCTAGAAAGGAGATATACATATGAAAAAGATTGGCTGGCGCTGGCTGGTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCATCG>100
1>NNGATGTGAGCGGATAACATTCCCTCTAGAAAGGAGATATACATATGAAAAAGATTGGCTGGCGCTGGCTGGTTAGTTTTAGCGTTTAGCGCATCG>100

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
101>GCGGCCATGGATATTCAAATGACCCAAAGCCCGTCTTCTTTAAGCGCGTCTGTCGGTGATCGCGTGACCATCACGTGTCGTGCGAGCCAAGATGTTAATA>200
101>GCGGCCATGGATATTCAAATGACCCAAAGCCCGTCTTCTTTAAGCGCGTCTGTCGGTGATCGCGTGACCATCACGTGTCGTGCGAGCCAAGATGTTAATA>200

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
201>CGGCGGTGGCTGGTATCAACAAAAACCGGGTAAAGCCCCGAAGCTGTTAATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACTCTGGCGTCCCAGCCGCTTTCTGG>300
201>CGGCGGTGGCTGGTATCAACAAAAACCGGGTAAAGCCCCGAAGCTGTTAATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACTCTGGCGTCCCAGCCGCTTTCTGG>300

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
301>CAGCCGACGCGGTACGGACTTCACGCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTTGCGCCACTATTATTGTCAGCAGCACTACACCACCCCGCCAACC>400
301>CAGCCGACGCGGTACGGACTTCACGCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTTGCGCCACTATTATTGTCAGCAGCACTACACCACCCCGCCAACC>400

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
401>TTTGCCAGGGTACGAAAGTGGAGATTAAACGCACGGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGATCGGAGGTTCAATTAGTGAAT>500
401>TTTGCCAGGGTACGAAAGTGGAGATTAAACGCACGGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGGATCGGAGGTTCAATTAGTGAAT>500

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
501>CTGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGCGGTAGCTTACGCTGAGCTGTGCAGCGTCTGGCTTCAACATCAAAGATACCTACATTCAATTGGGTTCCGCCAAGC>600
501>CTGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGGCGGTAGCTTACGCTGAGCTGTGCAGCGTCTGGCTTCAACATCAAAGATACCTACATTCAATTGGGTTCCGCCAAGC>600

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
601>CCAGGTAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCCGTATCTATCCAACCAATGGCTACAGCGTTATGCAAGTCTGTGAAAGGCCGCTTACCATTAGCGCCGAC>700
601>CCAGGTAAGGCCCTGGAGTGGGTGGCCCGTATCTATCCAACCAATGGCTACAGCGTTATGCAAGTCTGTGAAAGGCCGCTTACCATTAGCGCCGAC>700

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
701>ACCTCTAAGAACACCGCATATTTACAGATGAACTCTTTACGCGCAGAGGACACGGCGGTGACTACTGCTCTCGTTGGGGCGGTGACGGTTTCTACGCGA>800
701>ACCTCTAAGAACACCGCATATTTACAGATGAACTCTTTACGCGCAGAGGACACGGCGGTGACTACTGCTCTCGTTGGGGCGGTGACGGTTTCTACGCGA>800

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
801>TGGACTACTGGGGTACGGTACGCTGGTACAGGTCAGCTCTCATCATCATCATCACTAAAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCA>900
801>TGGACTACTGGGGTACGGTACGCTGGTACAGGTCAGCTCTCATCATCATCATCACTAAAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCA>900

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
901>CTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTC>1000
901>CTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTC>1000

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1001>TTGAGGGGTTTTTGGCTGAAAGGAGGAACATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCCTTAA>1074
1001>TTGAGGGGTTTTTGGCTGAAAGGAGGAACATATCCGGATTGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCCTTAA>1074

```

EK-1C. pET28a-spMBP-anti-HER2-scFv-6xHis sekans analizi (L3)

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1>CTTGGATGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAAGGAGATATACATATGAAAAATAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGA>100
1>CTTGGATGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAAGGAGATATACATATGAAAAATAAAACAGGTGCACGCATCCTCGCATTATCCGCATTAACGACGA>100

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
101>TGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTCGCCGCATGGATATTCAAATGACCCAAAGCCCGTCTTCTTTAAGCGCGTCTGTGCGGTGATCGCGTGACCATCACGTG>200
101>TGATGTTTTCCGCCTCGGCTCTCGCCGCATGGATATTCAAATGACCCAAAGCCCGTCTTCTTTAAGCGCGTCTGTGCGGTGATCGCGTGACCATCACGTG>200

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
201>TCGTGCGAGCCAAGATGTTAATACGGCGGTGGCCTGGTATCAACAAAAACCGGGTAAAGCCCGAAGCTGTTAATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACTCT>300
201>TCGTGCGAGCCAAGATGTTAATACGGCGGTGGCCTGGTATCAACAAAAACCGGGTAAAGCCCGAAGCTGTTAATCTACAGCGCCAGCTTTCTGTACTCT>300

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
301>GGCGTCCCAGCGCTTTTCTGGCAGCCGCGAGCGGTACGGACTTACAGCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTTCCGCCACTATTATTGTACAG>400
301>GGCGTCCCAGCGCTTTTCTGGCAGCCGCGAGCGGTACGGACTTACAGCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTTCCGCCACTATTATTGTACAG>400

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
401>AGCACTACACCACCCGCCAACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTGGAGATTAACGCACGGGTGGAGCGGTTACAGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGG>500
401>AGCACTACACCACCCGCCAACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTGGAGATTAACGCACGGGTGGAGCGGTTACAGCGGAGGTGGCAGCGCGGTGGCGG>500

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
501>ATCGGAGGTTCAATTAGTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGCGGTAGCTTACGCTGAGCTGTGCAGCGTCTGGCTTCAACATCAAAGATACC>600
501>ATCGGAGGTTCAATTAGTGAATCTGGCGGTGGTCTGGTGCAGCCAGCGGTAGCTTACGCTGAGCTGTGCAGCGTCTGGCTTCAACATCAAAGATACC>600

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
601>TACATTCATTGGGTTCCGCCAAGCCCAAGGTAAGGCTGGAGTGGGTGGCCCGTATCTATCCAACCAATGGCTACACGCGTTATGCAGACTCTGTGAAAG>700
601>TACATTCATTGGGTTCCGCCAAGCCCAAGGTAAGGCTGGAGTGGGTGGCCCGTATCTATCCAACCAATGGCTACACGCGTTATGCAGACTCTGTGAAAG>700

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
701>GCCGCTTACCAATTAGCGCCGACACCTCTAAGAACACCGCATATTTACAGATGAACTCTTTACGCGCAGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCTCTCGTTG>800
701>GCCGCTTACCAATTAGCGCCGACACCTCTAAGAACACCGCATATTTACAGATGAACTCTTTACGCGCAGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCTCTCGTTG>800

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
801>GGGCGGTGACGGTTTCTACGCGATGGACTACTGGGGTACGGGTACGCTGGTACGGTACGCTCTCATCATCATCATCACTAAAAGCTTGCGGCCGCA>900
801>GGGCGGTGACGGTTTCTACGCGATGGACTACTGGGGTACGGGTACGCTGGTACGGTACGCTCTCATCATCATCATCACTAAAAGCTTGCGGCCGCA>900

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
901>CTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCATAACTAGCATAACC>1000
901>CTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCATAACTAGCATAACC>1000

      *      *      *      *      *
1001>CCTTGGGGCTCTAAACGGGCTTTGAGGGTTTTTGTGAAAGGAGGAATATATCCG>1058
1001>CCTTGGGGCTCTAAACGGGCTTTGAGGGTTTTTGTGAAAGGAGGAATATATCCG>1058

```




International Biotechnology Congress

Title:

Production of ScFv Antibody Fragments and Their Applications

Authors:

İlkay Koçer¹, Dilek Şahinbaş², Selen Cilasun², Eda Çelik^{1,2}

Affiliations:

¹Department of Chemical Engineering, Hacettepe University, Beytepe, 06800 Ankara, Turkey

²Institute of Science, Bioengineering Division, Hacettepe University, Beytepe, 06800 Ankara, Turkey

Abstract:

Intact antibodies, soluble serum glycoproteins are highly specific targeting reagents and are involved in the defence against pathogenic organisms and toxins. IgG is the main serum antibody with a Y-shaped structure, divided into two separate domains: antigen-binding region (Fab) and crystallizable (Fc) region. In addition to whole structure antibodies, the individual protein fragments of antibodies can be isolated or novel classes of antibody fragments can be generated to be used in biomedical research and applications with the help of protein engineering tools. Single chain variable fragments (scFvs), first engineered in 1988 (Bird et al.), are comprised of the heavy (V_H) and light (V_L) chains of antibody's variable domains that are joined by a flexible peptide linker, which varies from 10 to 30 amino acids in length.

The scFv is the smallest active component of an antibody that shows specificity to a target antigen and has a wide range of uses in medical, diagnostic and biotechnological applications as a substitute for full-length antibodies (Holliger & Hudson, 2005), which have an expected market value of about 250 billion USD by 2024 (Fu et al., 2018). Compared with the antibodies produced by hybridoma technology, the scFv antibody fragments can be easily modified to improve selectivity and affinity, and the production cost can be reduced (Wang et al., 2013). Moreover, they penetrate tissues easier and have lower immunogenicity compared to whole antibodies.

In literature, there are number of studies on the development and production of scFv molecules using various bacteria and yeast systems (Frenzel et al., 2013). *E. coli* is the most popular host for the production of scFvs due to its numerous advantages including low cost, fast growth, easy genetic manipulation, high biomass with scalable cultivation in bioreactors and scFv production levels upto 3.5 g/L (Joosten et al., 2003; Gupta et al., 2017).



International Biotechnology Congress

This review will provide an overall evaluation of the tremendous potential of antibody fragments as robust diagnostic reagents or as nonimmunogenic biopharmaceuticals, in addition to an overview of recombinant production schemes especially towards their bioconjugation. Finally, our efforts towards bioprocess development for highly soluble and functional recombinant anti-HER2-scFv production in *E. coli* will be summarized.

Keywords:

Single chain variable fragment, Recombinant *Escherichia coli*, Theranostics

References:

- Bird, R., Hardman, K., Jacobson, J., Johnson, S., Kaufman, B., Lee, S., Lee, T., Pope, S., Riordan, G., Whitlow, M. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242(4877), 423-426.
- Frenzel, A., Hust, M., Schirrmann, T. 2013. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol*, 4, 217.
- Fu, R., L. Carroll, G. Yahioğlu, E. O. Aboagye, and P. W. Miller. 2018. Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications. *ChemMedChem* 13 (23):2466-2478.
- Gupta, S.K., Shukla, P. 2017. Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 31-42.
- Holliger, P., Hudson, P.J. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, 23(9), 1126-36.
- Joosten, V., Lokman, C., van den Hondel, C.A., Punt, P.J. 2003. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microbial Cell Factories*, 2, 1-1.
- Wang, R., Xiang, S., Feng, Y., Srinivas, S., Zhang, Y., Lin, M., Wang, S. 2013. Engineering production of functional scFv antibody in *E. coli* by co-expressing the molecule chaperone Skp. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 72.