



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

STRATEJİK GEREKLİLİK:
MOLEKÜLDEN
İLACA

2022-1-TR01-KA220-VET-000088373


FROM MOLECULE TO DRUG

LABORATUVAR
KILAVUZU

2024



İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1

MOLEKÜL UYGULAMASI	5
---------------------------------	---

Mine ENSOY, Demet CANSARAN DUMAN

BÖLÜM 2

İLAÇ KEŞFİNDE VERİ TABANLARININ ROLÜ	13
---	----

Nuno S. OSÓRIO

BÖLÜM 3

İN VITRO KLİNİK ÖNCESİ ANALİZLER

3.1. AKIŞ SİTOMETRİ CİHAZI İLE APOPTOZ ORANI BELİRLEME	21
---	----

Ayşe Hale ALKAN, Demet CANSARAN DUMAN

İN VITRO KLİNİK ÖNCESİ ANALİZLER

3.2. HÜCRE MİGRASYON VE İNVAZYON ANALİZİ	35
---	----

Ayşe Hale ALKAN, Demet CANSARAN DUMAN

İN VITRO KLİNİK ÖNCESİ ANALİZLER

3.3. MİKRODİZİN ANALİZİ	45
--------------------------------------	----

Ayşe Hale ALKAN, Demet CANSARAN DUMAN

BÖLÜM 4

YENİLİKÇİ İLAÇ ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

xCELLigence ANALİZİ	51
----------------------------------	----

Şeyma ÖZGÜR, Demet CANSARAN DUMAN

BÖLÜM 5

REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE

KARAKTERİZASYONU	59
-------------------------------	----

Hülya AYAR KAYALI, Elçin ÇAĞATAY, Mariam J.M. GHUNAIM

BÖLÜM 6

OMİK, BİYİNFORMATİK VE FARMAKOGENOMİK	69
--	----

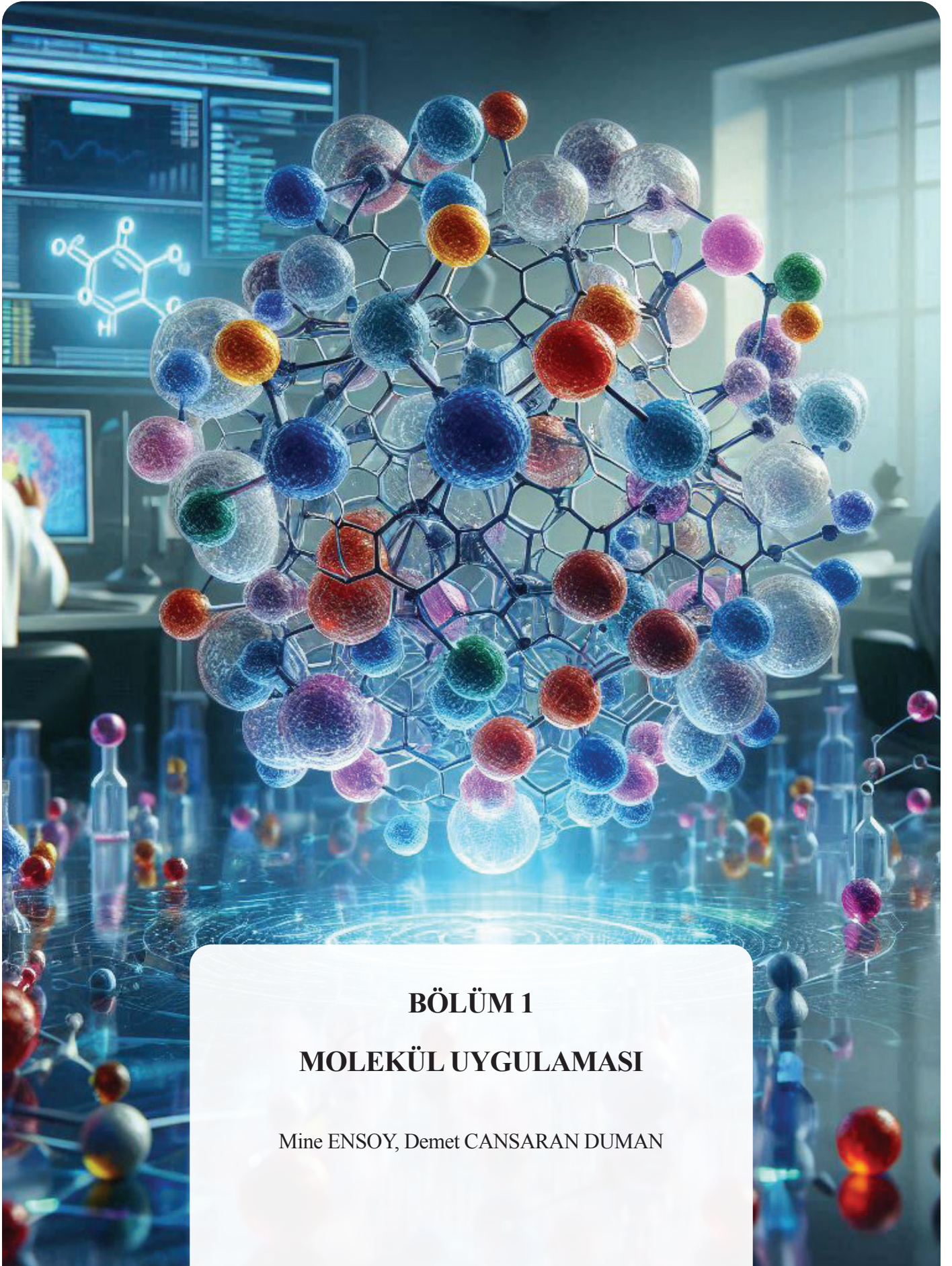
Nuno S. OSÓRIO

BÖLÜM 7

TEK HÜCRELİ KÜTLE SİTOMETRİSİ (CYTOF)	77
--	----

Açelya YILMAZER, Laura FUSCO, Lucia GEMMA DELOGU





BÖLÜM 1

MOLEKÜL UYGULAMASI

Mine ENSOY, Demet CANSARAN DUMAN



1. KONU

Aynı kimyasal formüle sahip moleküllerin yapısal farklılıklarının ilaç etkinliği üzerindeki rolünün incelenmesi

2. AMAÇ

Bu uygulama, katılımcılara aynı kimyasal formüle sahip moleküllerin farklı yapısal dizilimlerinin (stereoizomerlerin) ilaç etkinliği üzerindeki kritik rolünü göstermeyi amaçlamaktadır. Özellikle, küçük yapısal farklılıkların ilaçların etkinliği ve güvenliği üzerindeki etkilerini öğretmeyi hedefler. Uygulama kapsamında ulaşılmaları planlanan hedefler şu şekildedir;

- a) **Molekül yapılarının anlaşılması:** Katılımcılar, molekül yapılarını deneyimleyerek üç boyutlu olarak anlama fırsatı bulmaları,
- b) **Stereoizomerlerin önemi:** Aynı kimyasal formüle sahip fakat farklı üç boyutlu dizilime sahip moleküllerin ilaç etkinliğini nasıl değiştirdiğinin anlaşılması,
- c) **İlaç araştırmalarında yapı-aktivite ilişkisi:** Moleküler yapı değişikliklerinin biyolojik sistemlerdeki etkisinin nasıl önemli farklar yarattığını gösterilmesi,
- d) **Eğitsel deneyim:** Oyunlaştırma yoluyla bilimsel bilgiyi daha kolay öğrenip özümsemesi,
- e) **Etkileşimli öğrenme:** Katılımcılar arasında iletişimi artırarak grup çalışması ile öğrenmenin teşvik edilmesi.

3. UYGULAMA

Bilgilendirme: Katılımcılara stereoizomerlerin molekül yapısındaki farklılıkları ve bu farklılıkların ilaç etkinliğine olan etkileri hakkında bilgilendirme yapılır. Örnek olarak, belirli ilaçların farklı izomerlerinin farklı biyolojik etkilere sahip olduğu anlatılır.

Malzemeler: Katılımcılara molekül yapılarını inşa edebilecekleri bir molekül oluşturma kiti verilir (renkli toplar atomları, çubuklar ise bağları temsil eder). Kitler sayesinde katılımcılar, moleküllerin üç boyutlu modellerini fiziksel olarak inşa edebilirler. Kit içeriği ve temsil ettiği yapılar Şekil 1 ve Tablo 1’de yer almaktadır.



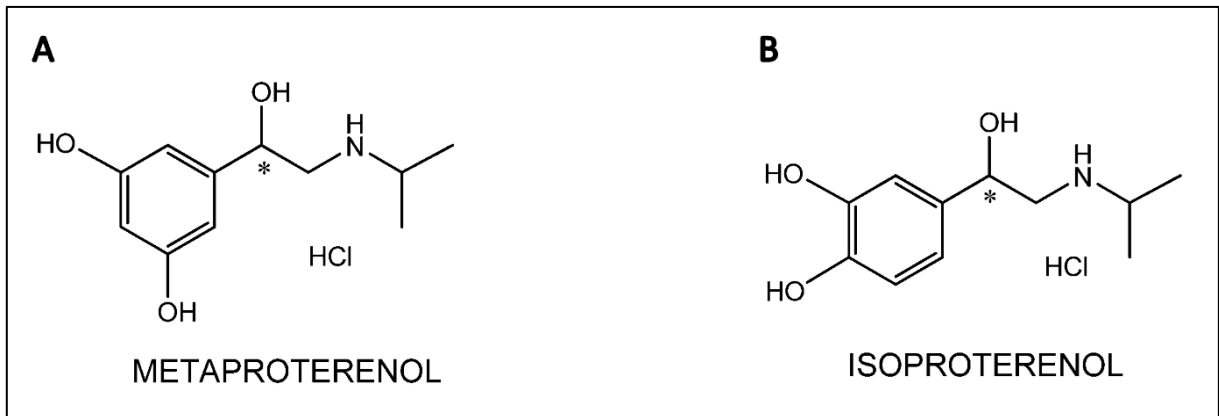
Şekil 1. Molekül oluşturma kiti içeriği

Tablo 1. Molekül oluşturma kiti içeriği

Atom	Renk	Delik Sayısı	Miktar	Element	Renk	Miktar
Karbon	Siyah	4	10	Orta uzunlukta bağ	Gri	12
Karbon	Siyah	5	15			
Oksijen	Kırmızı	1	4	Uzun bağ	Gri	6
Oksijen	Kırmızı	2	4			
Nitrojen	Açık Mavi	2	3	Orta uzunlukta bağ	Mor	4
Nitrojen	Açık Mavi	3	3			
Sülfür	Sarı	4	2	Uzun bağ	Mor	4

Sülfür	Sarı	6	2			
Klor	Yeşil	1	4	Tek parçalı bağ	Beyaz	15
Klor	Yeşil	6	4			
Fosfor	Mor	1	9			
Metal	Gri	1	3	Çift parçalı bağ	Beyaz	15
Metal	Gri	6	5			
Hidrojen	Beyaz	1	12	Ayraç		1
Hidrojen (yarım)	Beyaz	-	20	Plastik kutu		1

Görev: Katılımcılardan aynı kimyasal formüle sahip ama farklı yapısal dizilime sahip olan moleküllerinden bir tanesini yapmaları istenir. Katılımcılar molekül oluşturma kitini kullanarak kendilerine verilen 2-boyutlu moleküler yapıyı 3-boyutlu olarak oluştururlar. Yapılması istenen moleküller Şekil 2’de yer almaktadır.

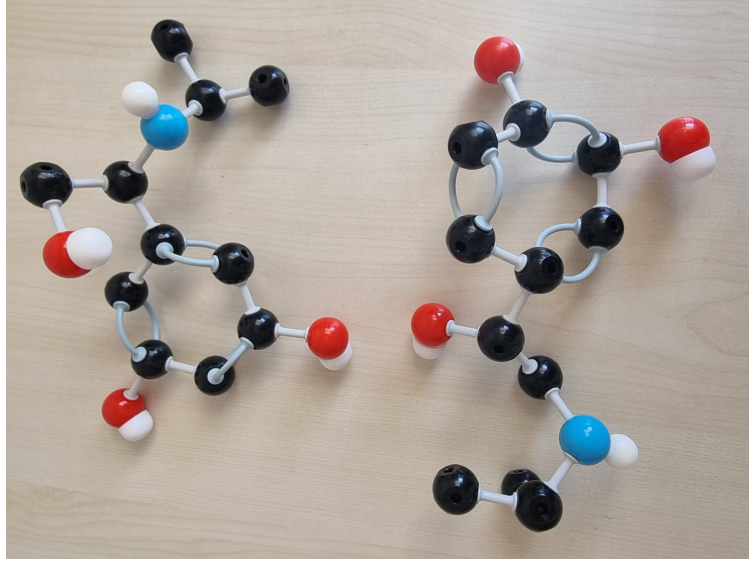


Şekil 2. Katılımcılardan yapılması istenen moleküller A) Metaproterenol ve B) Isoproterenol

Karşılaştırma: Katılımcılar, oluşturdukları moleküllerin farklı izomerlerini birbirleriyle karşılaştırır. İlaç moleküllerinin vücutta biyolojik hedeflerle nasıl etkileşime girdiği ve stereo yapının bu süreçteki önemini anlamaları sağlanır.

İnteraktif etkileşim: Katılımcılar, kendi oluşturdukları molekül modellerini diğer gruplarla paylaşır ve farklı yapıların potansiyel etkileri üzerine tartışmalar yürütür.

Etkinlik sonunda oluşturulan 3-boyutlu moleküler yapılar Şekil 3’de yer almaktadır.



Şekil 3. Etkinlik sonunda elde edilen 3-boyutlu moleküler yapılar

Eğitim esnasında çekilen fotoğraflar Şekil 4’de yer almaktadır.



Şekil 4. Eğitim fotoğrafları

4. SONUÇ

Etkinlik, moleküllerin üç boyutlu yapılarının ilaç etkinliği üzerindeki önemini uygulamalı bir şekilde sunarak, katılımcıların bilimsel bir konuyu interaktif ve öğretici bir ortamda kavramalarına olanak tanımıştır.

Bilgilendirici deneyim: Katılımcılar, aynı kimyasal formüle sahip moleküllerin farklı yapısal dizilimlerinin ilaç etkinliğini ne kadar değiştirebileceğini somut bir şekilde deneyimleyerek öğrenmiştir. Moleküllerin üç boyutlu yapılarının biyolojik sistemlerde nasıl çalıştığını ve küçük yapısal farkların nasıl büyük biyolojik sonuçlar doğurabileceğini daha iyi bir şekilde kavramıştır. Katılımcıların stereoizomerlerin ilaç tasarımı, ilaç etkinliği, yan etkiler ve ilaç



güvenliği üzerindeki rolüne dair bilgisi ve ilaç araştırmalarındaki yapı-aktivite ilişkileri konusundaki farkındalıkları arttırmıştır.

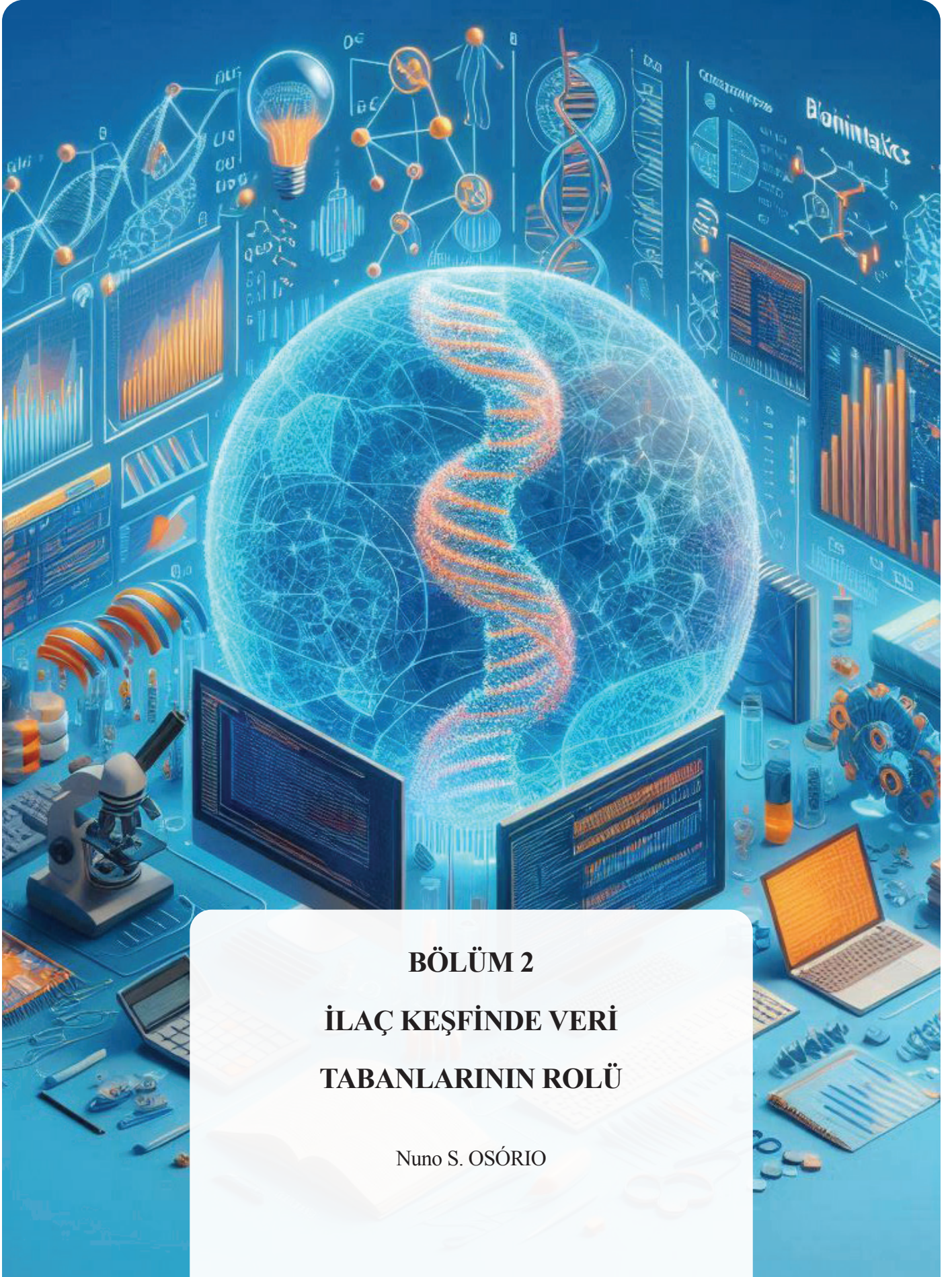
Etkileşim ve katılım: Grup çalışması ve oyun temelli öğrenme sayesinde katılımcılar, bilimsel bilgiyi daha hızlı ve eğlenceli bir şekilde özümsemiştir. Etkileşimli öğrenme ortamı, daha etkili bir bilgi aktarımı sağlamıştır. Oyunlaştırma sayesinde soyut kimyasal yapıların anlaşılması kolaylaşmış ve moleküler yapıların fiziksel olarak inşa edilmesi moleküllerin 3-boyutlu yapılarını anlamalarına yardımcı olmuştur.

Öneriler ve geri bildirimler: Katılımcılar etkinlik sonrasında, moleköl yapılarına ve farklı moleküler yapıların etkilerine dair önemli bilgiler edindiklerini ve ilaç geliştirme süreçlerinde bu farkların önemini anladıklarını belirtmiştir.

Video için
QR kodu okutunuz.



İlaç Keşfi-Uygulamalı
Eğitimde Veritabanı



BÖLÜM 2

İLAC KEŞFİNDE VERİ TABANLARININ ROLÜ

Nuno S. OSÓRIO



1. KONU

Uygulama kapsamında ilaçla ilgili veri tabanlarına nasıl erişileceğini ve bunların nasıl kullanılacağını keşfedeceğiz.

2. AMAÇ

İlgili **Python** paketlerini kullanarak **ChEMBL**'den veri almaya odaklanacağız ve ardından alınan verileri analiz edeceğiz. Bu öğretici, jupyter notebook ortamlarında çalıştırılmak üzere tasarlanmıştır ve Python kodunu çalıştırmayı içeren alıştırmalar içerir.

Not defterinin etkileşimli bulut sürümüne buradan erişebilirsiniz

(https://colab.research.google.com/github/nunososorio/bhs/blob/main/NSO_PracticalClass_I.ipynb). Hadi başlayalım!

3. UYGULAMA

İlaç keşfinde **Hedeften-Öncü moleküle ve Öncü molekülden-Lider moleküle** adımlarında veri tabanlarının kullanımı çok önemlidir. Bu veri tabanları, potansiyel ilaç hedefleri ve bu hedeflerle etkileşime girebilecek bileşikler hakkında zengin bilgi sağlar. Bu verilere erişmek ve analiz etmek, potansiyel yeni ilaçların belirlenmesine yardımcı olabilir.

Bu veritabanlarına erişim, ilgili web siteleri aracılığıyla yapılabilir. Bununla birlikte, tekrarlanabilir ve büyük ölçekli analizler için, veritabanına kod aracılığıyla programlı olarak erişmek daha verimlidir. Bu eğitimde, bunun nasıl yapılacağı konusunda size rehberlik edeceğiz.

ChEMBL veritabanı, ilaç benzeri özelliklere sahip biyoaktif moleküllerin manuel olarak seçilmiş bir veritabanıdır. Genomik bilginin etkili yeni ilaçlara dönüştürülmesine yardımcı olmak için kimyasal, biyoaktivite ve genomik verileri bir araya getirir.

chembl_webresource_client, ChEMBL verilerine erişmek için resmi Python istemci kitaplığıdır.



Kurulum

Öncelikle gerekli Python paketlerini kurmamız gerekiyor. Ortamınızda aşağıdaki komutları çalıştırın:

```
!pip install chembl_webresource_client
```

şimdi, kitaplığı ie aktarın:

```
chembl_webresource_client.new_client import new_client adresinden
```

Keşfetmek

chembl_webresource_client kullanarak ChEMBL veritabanından alabileceğimiz her türlü veri veya bilgiyi öğrenerek başlayalım. Aşağıdaki kodu kullanarak kullanılabilir veri varlıklarını listeleyebilirsiniz:

```
available_resources = dir(new_client)
```

```
#available_resources = [dir(new_client) içindeki kaynak için kaynak eğer  
değilse.startswith('_')]
```

```
available_resources
```

Python'da, alt çizgiyle başlayan öznelikler genellikle dahili amaçlar için kullanılır ve doğrudan erişilmesi amaçlanmamıştır.

ChEMBL veritabanındaki 'molekül' veri varlığına bir göz atalım:

```
new_client.molekül
```

Gördüğünüz gibi, ChEMBL veritabanındaki belirli bir molekül hakkında zengin bilgi içeren bir sözlük döndürür. Bu sözlükteki anahtarlar, molekülün farklı özelliklerini temsil eder ve bu anahtarlarla ilişkili değerler, bu özellikler hakkında özel bilgiler sağlar.

Sözlükteki bazı anahtarların kısa bir açıklaması aşağıda verilmiştir:

- **'atc_classifications'**: Anatomik Terapötik Kimyasal (ATC) sınıflandırma sistemi molekülü kodlar.
- **'availability_type'**: Molekülün kullanılabilirlik türü.



- **'biyoterapötik'**: Molekülün biyoterapötik özellikleri hakkında bilgi.
- **'black_box_warning'**: Molekül için bir kara kutu uyarısı olup olmadığını gösterir.
- **'molecule_chembl_id'**: Molekülün ChEMBL ID'si.
- **'molecule_hierarchy'**: ChEMBL veritabanındaki molekülün hiyerarşisi.
- **'molecule_properties'**: Molekülün moleküler ağırlığı, hidrojen bağı alıcılarının ve vericilerinin sayısı gibi çeşitli özellikleri.
- **'molecule_structures'**: Molekülün SMILES, InChI ve molekül gibi çeşitli formatlardaki yapıları.
- **'molecule_type'**: Molekülün türü (örneğin, 'Küçük molekül').
- **'structure_type'**: Yapının türü (örneğin, 'MOL').
- **'pref_name'**: Bu, "tercih edilen ad" anlamına gelir. ChEMBL veritabanında molekülün tercih edilen adıdır. Değer Yok ise, bu molekül için tercih edilen bir adın atanmadığı veya veritabanında mevcut olmadığı anlamına gelir.
- **'molecule_synonyms'**: Bu, molekülün eş anlamlılarının bir listesidir. Eş anlamlılar, aynı moleküle atıfta bulunmak için kullanılacak farklı isimlerdir. Bunlar, farklı veritabanlarında kullanılan adları, ortak adları, bilimsel adları vb. içerebilir. Liste boşsa, veritabanında bu molekül için hiçbir eş anlamlı kelime kaydedilmediği veya mevcut olmadığı anlamına gelir.

Bir molekülü tercih edilen isimle adlandırmak istiyorsak şunu kullanabiliriz:

```
# ChEMBL veritabanındaki 'molekül' veri varlığına erişmenizi sağlayan bir 'molekül'  
nesnesi oluşturun.
```

```
molekül = new_client.molekül
```

```
# Tercih edilen adı tam olarak 'aspirin' olan tüm molekülleri almak için 'molekül'  
nesnesinin 'filtre' yöntemini kullanın.
```

```
# 'iexact' araması, büyük/küçük harfe duyarlı olmayan tam eşleşme gerçekleştirmek için  
kullanılır.
```

```
mols = molekül.filter(molecule_synonyms__molecule_synonym__iexact='viagra')
```

```
# 'mols' artık ChEMBL veritabanında tercih edilen adı 'aspirin' olan tüm moleküllerin  
bir listesini içeriyor.
```




mols

Okuması kolay değil... Endişelenmeyin, 'mols' nesnesini bir pandas DataFrame'e dönüştürebilirsiniz, daha kolay okuma ve manipölasyon. Bunu Şu Şekilde yapabilirsiniz:

Pandaları PD olarak ie aktar

mols_df = pd.dir. DataFrame.from_records(mol)

mols_df

İsterseniz bir excel le'ye aktarabilirsiniz:

mols_df.to_excel('mols_df.xlsx', index=False)

google.colab adresinden dosyaları içe aktarma

files.download('mols_df.xlsx')

Senaryo Tabanlı AlıŐtırma

Senaryo: İlaç keşfi ve geliŐtirmenin heyecan verici dőnyasında yer alan bir araŐtırmacısınız. İŐbirliđi yapan bir kimya laboratuvarından yakın zamanda sentezlenmiŐ bir bileŐik aldınız. BileŐik posta yoluyla gönderildi ve ilgi çekici bir Şekilde, yalnızca bileŐiđin yapısının basılı bir görüntüsünü içeriyordu.

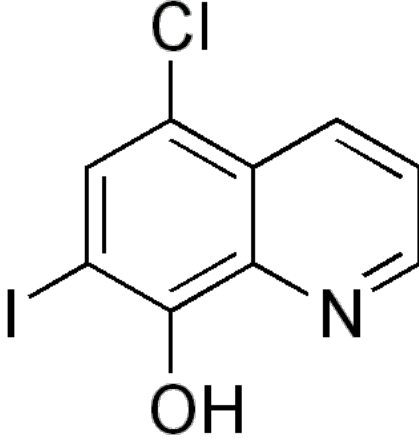
Göreviniz: Göreviniz, kabul etmeyi seçerseniz, birkaç kritik adımı içerir:

1. Yapı diyagramını bir SMILES dizesine dönüştürün. Bu, kimyasal yapı diyagramlarını yorumlama yeteneğinizi test edecektir.
2. SMILES dizesini kullanarak ChEMBL veritabanında arama yapın. Bu, veritabanlarına programlı olarak eriŐme becerilerinizi gerektirecektir.
3. Molekülün veritabanında zaten mevcut olup olmadığını ve ilgili ek açıklamaya sahip olup olmadığını belirleyin. Bu, veri analizi becerilerinizi zorlayacaktır.

Unutmayın, bu alıŐtırmaların amacı sizi uyuŐturucuyla ilgili veri tabanlarına programlı olarak eriŐmeye alıŐtırmaktır. Bu beceri, ilaç keşfi adımlarında tekrarlanabilir ve büyük ölçekli analizler için çok önemlidir.

Peki, bu yolculuğa çıkmaya hazır mısınız? Hadi başlayalım!

Bu, molekülün görüntüsüdür:



İlk adım: Kekulé diyagramını bir SMILES dizesine dönüştürün. Bunun için aşağıdakiler de dahil olmak üzere birkaç farklı yazılım kullanabilirsiniz:

<https://cactus.nci.nih.gov/cgi-bin/osra/index.cgi>

Artık SMILES'a sahip olduğunuza göre, onu ChEMBL veritabanını sorgulamak için kullanabilirsiniz:

```
# SMILES'I AŞAĞIDAKİ X'E GİRİN "Oc1c(I)cc(Cl)c2ccnc12"
```

```
canonical_smiles= X
```

```
smiles_mol = molekül.filtre(molecule_structures__canonical_smiles=canonical_smiles)
```

```
smiles_mol_df = pd'dir. DataFrame.from_records(smiles_mol)
```

```
smiles_mol_df
```

Gönderilen kimyasal molekül hakkında ne buldunuz?

Bonus

ChEMBL'de listelenen tüm geri çekilen ilaçlarla bir excel le oluşturabilir misiniz?

```
# Geri çekilen tüm molekülleri almak için 'molekül' nesnesinin 'filtre' yöntemini kullanın.
```



```
withdrawn_mols = molekül.filtre(withdrawn_flag=Doğru)

withdrawn_mol_df = pd.dir. DataFrame.from_records(withdrawn_mols)

withdrawn_mol_df.to_excel('withdrawn_mol_df.xlsx, index=False)

google.colab adresinden dosyaları içe aktarma

files.download('withdrawn_mol_df.xlsx')
```

Kanonik SMILES?

Kimyasal moleküller ve SMILES (Basitleştirilmiş Moleküler Giriş Hattı Giriş Sistemi) bağlamında, kanonik SMILES, molekülün yapısını temsil eden benzersiz bir gösterimdir. Tek bir molekül için birçok geçerli SMILES gösterimi olabilir, çünkü SMILES gösterimi başlangıç atomuna ve geçiş yoluna bağlı olarak değişebilir. Kanonik SMILES, belirli kurallara göre seçilen belirli bir SMILES notasyonudur ve molekülün çizilme veya temsil edilme şeklinden bağımsız olarak aynıdır. Bu yüzden veritabanlarında kullanılan formdur. rdkit kütüphanesi, kanonik SMILES oluşturmak için kullanılabilir.

```
# Gerekli aracı yükleyin

!pip install rdkit-pypi

itibaren rdkit içe aktarma Chem'den

# Molekülün SMILES dizisi

smiles_string =
"C/C4=C/3CCC(C)(COc2ccc(CC1SC(=O)*C1=O)cc2)OC3C(C)C(C)C4c5c[nH]5"

# SMILES dizisinden bir RDKit molekül nesnesi oluşturun

molekül = Chem.MolFromSmiles(smiles_string)

# Kanonik SMILES dizisini alın

canonical_smiles = Chem.MolToSmiles(molekül, izomerikSmiles=Doğru)

Yazdır(canonical_smiles)
```

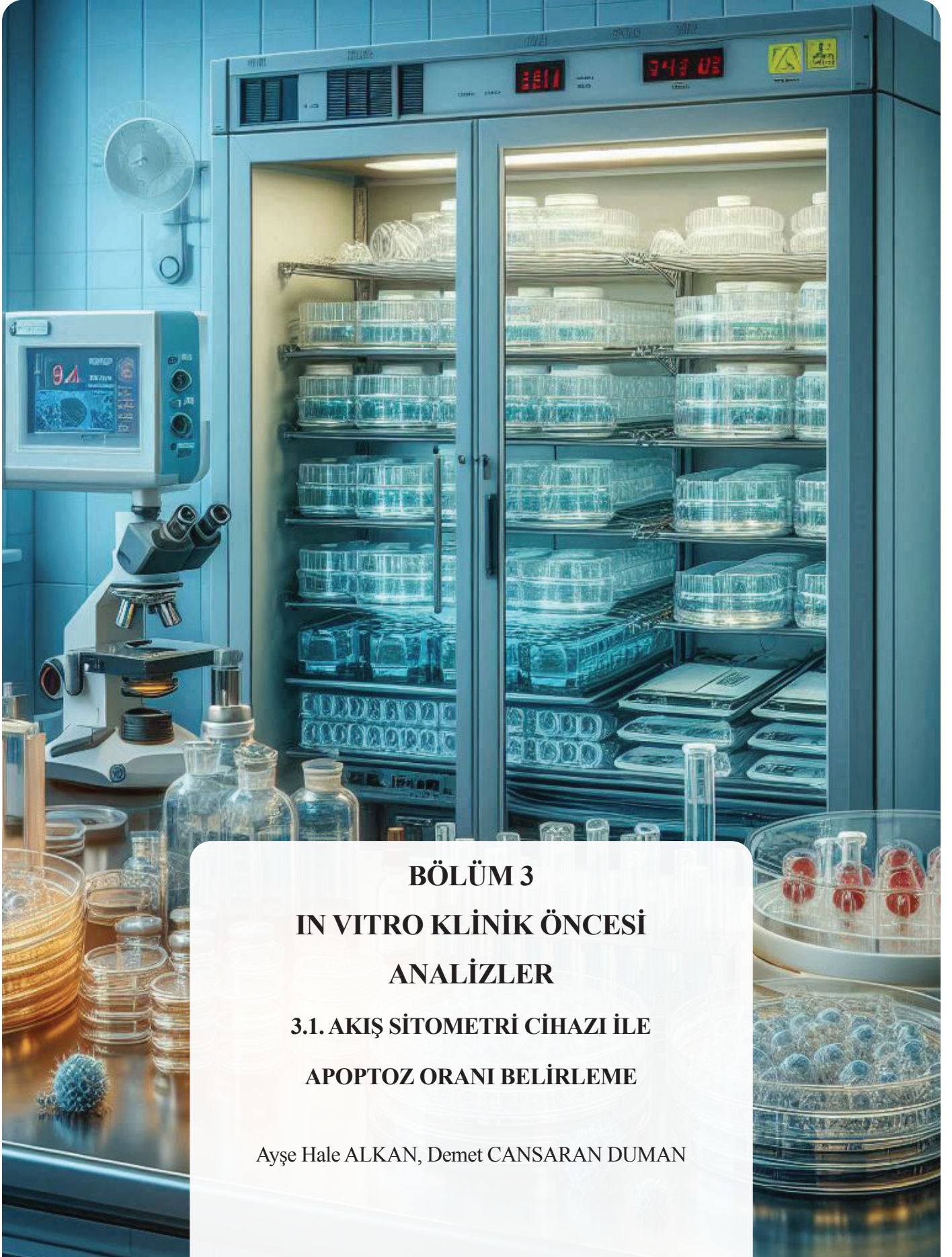

Video için
QR kodu okutunuz.



Apoptoz Analizi-1



Apoptoz Analizi - 2



BÖLÜM 3 IN VITRO KLİNİK ÖNCESİ ANALİZLER

3.1. AKIŞ SİTOMETRİ CİHAZI İLE APOPTOZ ORANI BELİRLEME

Ayşe Hale ALKAN, Demet CANSARAN DUMAN



1. KONU

Apoptoz analizi klinik öncesi ilaç araştırmaları kapsamında kullanılan yöntemlerden biridir. Akış (Flow) sitometrisi kullanılarak floresan bir madde ile işaretlenmiş antikorlar yüzey reseptörleri aracılığıyla indüksiyondan DNA parçalanmasının meydana geldiği geç evrelere kadar apoptozun tüm yönlerinin incelenmesidir.

1. AMAÇ

İlaç uygulaması sonrasında hücre apoptoz profilinin akış sitometri cihazı ile belirlenmesi.

2. UYGULAMA

İlaç/molekül uygulaması

Hücre kültürü petrilere 1×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılır.

Hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra belirlenen IC_{50} konsantrasyonunda ilaç aday molekülü hücrelere muamele edilir.

Belirlenen IC_{50} inkübasyon süresi sonunda petrilerdeki besiyeri çekilip atılır ve hücreler 2000 μ l PBS ile yıkanır.

Petrilere 400 μ l tripsin eklenerek hücrelerin kalkması (petriden ayrılması) sağlanır.

Petrilere 3 ml besiyeri eklenerek hücreler 15 ml'lik falkona alınır.

Örnek başına 1×10^6 hücre olacak şekilde hücreler sayılır ve sayılan hücreler ayrı falkona alınır.

Falkon $+4^{\circ}C$ 'de 1800 *rpm*'de 5 dakika santrifüj edilir.

Üstte kalan süpernatant boşaltılır ve üzerine yaklaşık 5 ml soğuk PBS eklenir.

Yıkama işlemi 5 ml soğuk PBS ile tekrar $+4^{\circ}C$ 'de 1800 *rpm*'de 5 dakika santrifüj edilerek tekrarlanır.

Tekrar üst sıvı boşaltılır ve hücreler 1 ml soğuk PBS ile süspanse edilir.

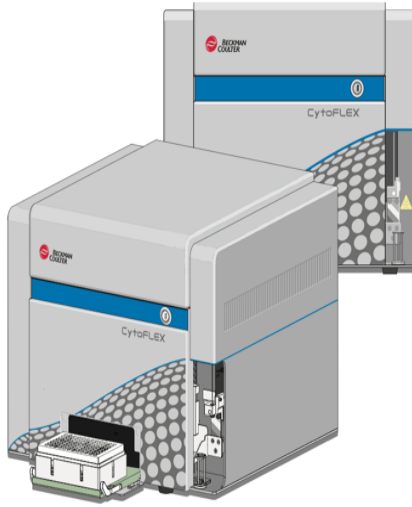
1 ml soğuk PBS içinde hazırlanan her örneğin içine 5 µl FITC Annexin V ve 10 µl PI (Örneğin: Molecular probes-Membrane Permeability/Dead Cell Apoptosis Kit) ilave edilir.

Hazırlanan örnekler 30 dk buz üzerinde inkübasyona bırakılır.

Son olarak örneklerin akış sitometri ile analizi yapılır.

- Apoptoz oranı belirlenmesi deneyi 3 tekrarlı olacak şekilde yapılır.
- Kullanılan boya miktarı hücre sayısına göre doğru orantılı olarak değişebilir.

Akış sitometre cihazında analiz ve sonuçların yorumlanması

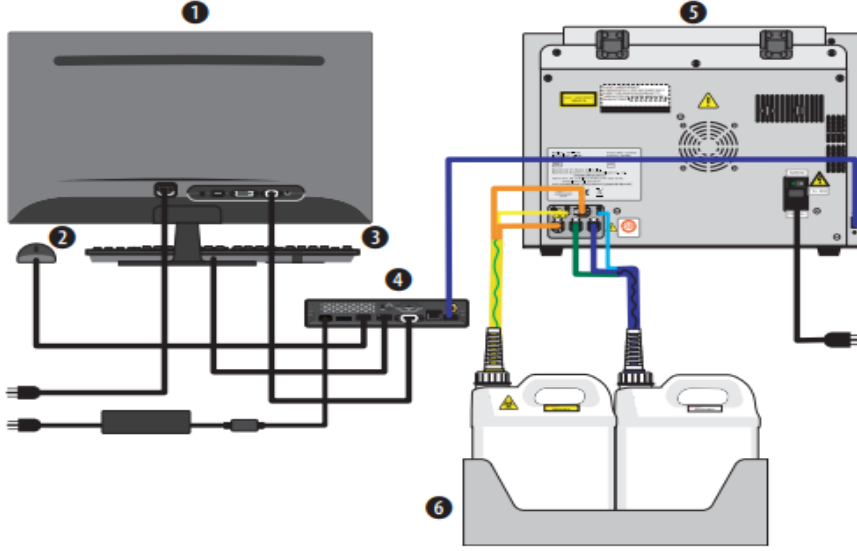


İş akışı:

Deney planlama → Örnek yükle → Cihaz ve kapı ayarlarının yapılması → Veri kaydı → Analiz ve veri eldesi → Deneyi kaydet ve sonlandır

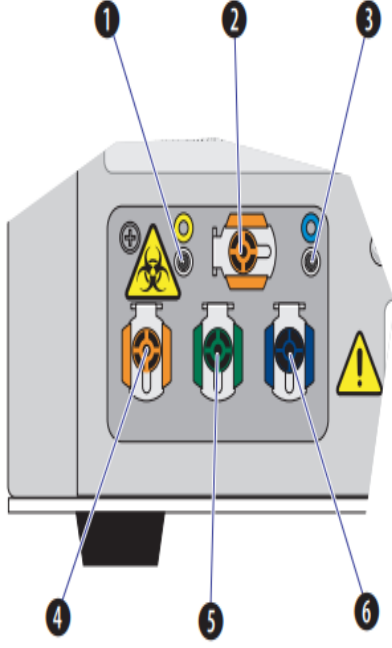
Analiz öncesi yapılacaklar

1. Sistem gereksinimlerinin doğru bağlandığından emin olunmalıdır.



- 1- MONİTÖR
- 2- MOUSE
- 3- KLAVYE
- 4- BİLGİSAYAR
- 5- AKIM SİTOMETRİSİ
- 6- SIVI KABI TUTUCU

2. Tüm boruların ve kabloların cihazdaki uygun renk kodlarına göre uygun şekilde bağlandığından emin olunmalıdır.



1- Atık Düzeyi Sensörü: Atık sıvı sensör kablosuna bağlı olmalıdır.

2- Akış Hücresi (Flow Cell) Atığı Çıkışı: Akış Hücresi (Flow Cell) atık tüpüne bağlanmalıdır.

3- Kılıf Sıvısı (Sheath Fluid) Düzeyi Sensörü: Kılıf Sıvısı (Sheath fluid) sensör kablosuna bağlı olmalıdır.

4- Atık Çıkışı: Sıvı atık tüpüne bağlı olmalıdır.

5- Kılıf (Sheath) Dönüşü: Kılıf sıvısı (Seath fluid) hortumuna bağlanmalıdır.

6- Kılıf Sıvısı (Sheath Fluid) Girişi: Kılıf sıvısı (Seath fluid) hortumuna bağlanmalıdır.

3. USB konfigürasyon anahtarının bir USB bağlantı noktasına bağlı olduğundan emin olunmalıdır.

4. Kılıf sıvısı kabı, Sıvı Kabı tutucusundan çıkarılmalı ve kılıf sıvısı kabı temin edilen kılıf sıvısıyla doldurulmalıdır.

5. Gerekirse, sağ yan kapak çıkarılmalı ve Deep Clean (Derinlemesine Temizlik) çözeltisini 1 ölçü Contrad 70 ve 1 ölçü Dİ su karışımıyla doldurulmalıdır.

6. Atık kabı dolduğunda cihaz alarm vermektedir. Bu durumda atık kabı boşaltılmalıdır. İsteğe ve kirliliğe bağlı olarak atık kabına, 400 ml %5 -%6 çamaşır suyu ekleyerek temizlik işlemi yapılmalıdır.

Cihazın başlatılması

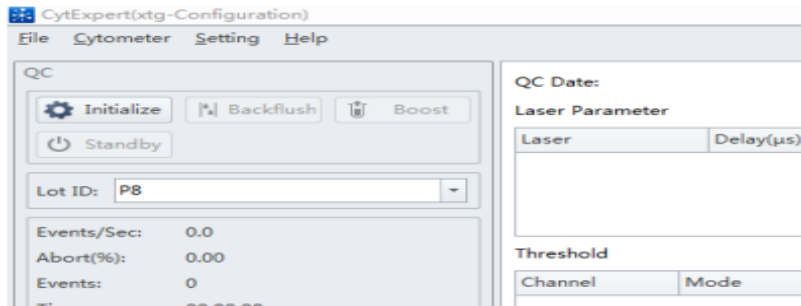
1. Cihazın arka kapağında güç kablosunun hemen üzerinde bulunan güç anahtarı açılmalıdır.
2. Bilgisayarda oturum açılmalı ve CytExpert'i başlatmak için CytExpert logosu ögesine çift tıklanmalıdır.
3. Ekranın sol alt tarafındaki Durum Çubuğunda Bağlı simgesinin yeşil olduğundan emin olunmalıdır. Simge yeşil değilse, cihaz USB'sinin bilgisayara güvenli bir şekilde bağlandığından emin olunmalıdır ve bilgisayar yeniden başlatılmalıdır.



4. Cytometer menüsünde **System Startup Procedure** (Sistem Başlatma Prosedürü) ögesi seçilmelidir, **Initialize (Başlat)** ögesi tıklanarak yazılım komutları izlenmelidir.

Kalite kontrol analizi

1. Menü sekmesinden **START QC** seçilir.




2. QC bead'lerinin lot numarasının Lot ID bölümüne girilmesi gerekmektedir.
3. QC beadleri önce vortekslenerek 1 ml distile suya (75-mm akış sitometre tüp içine) 3 damla eklenir.
4. **INITIALIZE** seçilir, QC tüpü cihaza yüklenir ardından **START**'a tıklanır.

5. QC için min event/sn 100 olmalıdır. Yeşil ikon sonuçların geçtiğini bildirirken, kırmızı ikon sonuçların doğru olmadığını göstermektedir.

6. Eğer kırmızı ikon ekranda görülürse cihaz **PRIME**'a alınmalıdır ve daha sonra QC testi tekrarlanmalıdır.

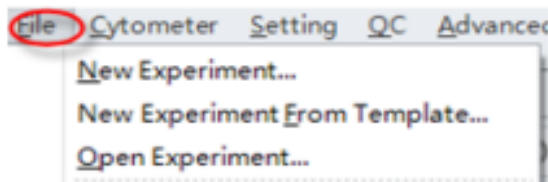
Analiz


1. Cihaz software'ni açmak için bilgisayar desktopunda yer alan  ikona tıklanılır.

2. Açılan sayfada yeni çalışma sayfası açmak için **New Experiment** veya **New Experiment from Template** seçilir. **Open Experiment** sekmesine tıkladığında ise hafızada kayıtlı çalışılmış sayfa yeniden açılır.

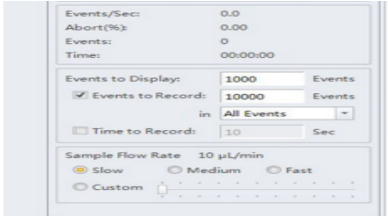


3. Ayrıca **New Experiment** veya **New Experiment from Template** ve **Open Experiment** sekmelerine File'dan da ulaşılır.

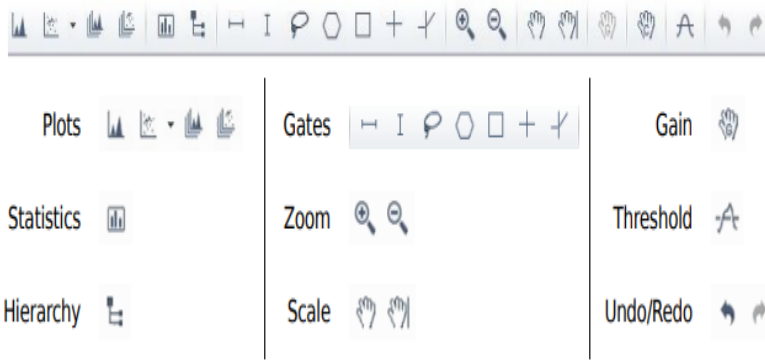


4. Eğer çalışma tüpleri cihaza tanıtılmamışsa;  ikonu kullanılarak yeni tüp cihaza tanıtılır. Sekme seçildikten sonra tüp adı girilir.

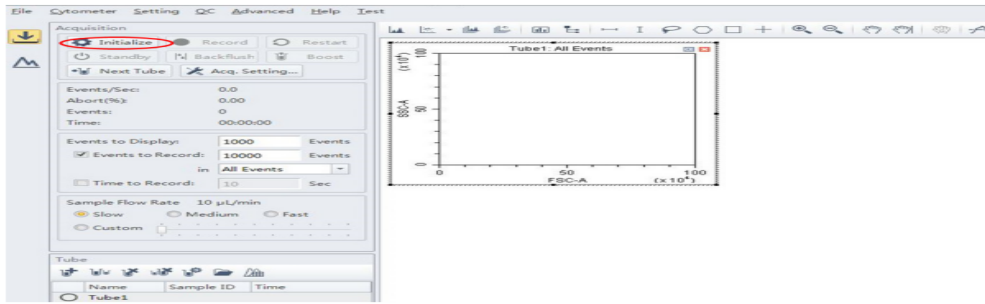
5. **Event** bilgileri veya **Sec** seçimi yapılır. Slow durumunda cihaz okutulmaya hazırlanır.



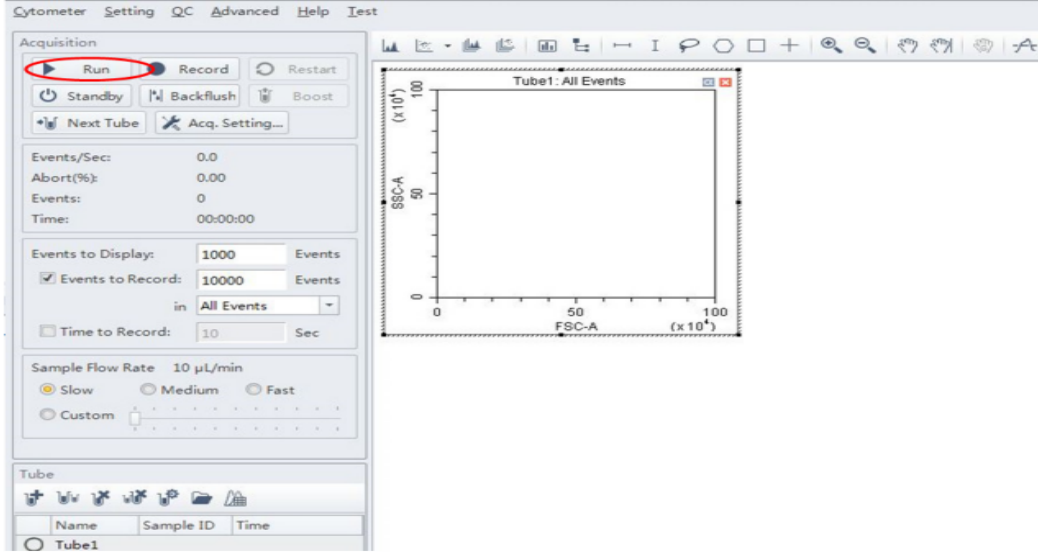
6. Toolbar'dan plots tipleri seçilir ve bir plots açılır. (Dot plot veya histogram)







7. **INITIALIZE** seçilir.



8. Seçilen plotta analiz edilecek hücre veya parçacıklar uygun alanda görülmeye başlanırsa bu kez **RUN** sekmesine tıklanılır. Bu aşamada hız istenirse **Medium** veya **Fast**' a alınabilir.



Verilerin kaydedilmesi

1. **RUN** sekmesinin seçiminden sonra cihaz tüm verileri kaydetmektedir. Aynı zamanda **RUN** esnasında cihaz ayarlarıyla yapılan herhangi bir değişiklikte (voltaj veya kompenzasyon) kaydedilmektedir.
2. **RUN** esnasında kaydedilen (geçici hafızaya alınan) datalar mavi ile gösterilirken  kaydedilmiş datalar yeşil  ile gösterilir.
3. Kaydetme işlemi event sayısına veya girilen sec'e ulaşana kadar devam edip, durmaktadır. Ama buna alternatif olarak ekranda yer alan **STOP** sekmesinden de kaydetme durdurulabilir.
4. Yeni bir tüpe devam edilecekse  ikonuna tıklanılır ya da  seçilir. Yeni tüp seçiminde bir önceki tüp için yapılan tüm ayarlar geçerli olmaktadır.

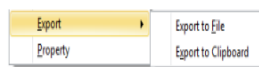
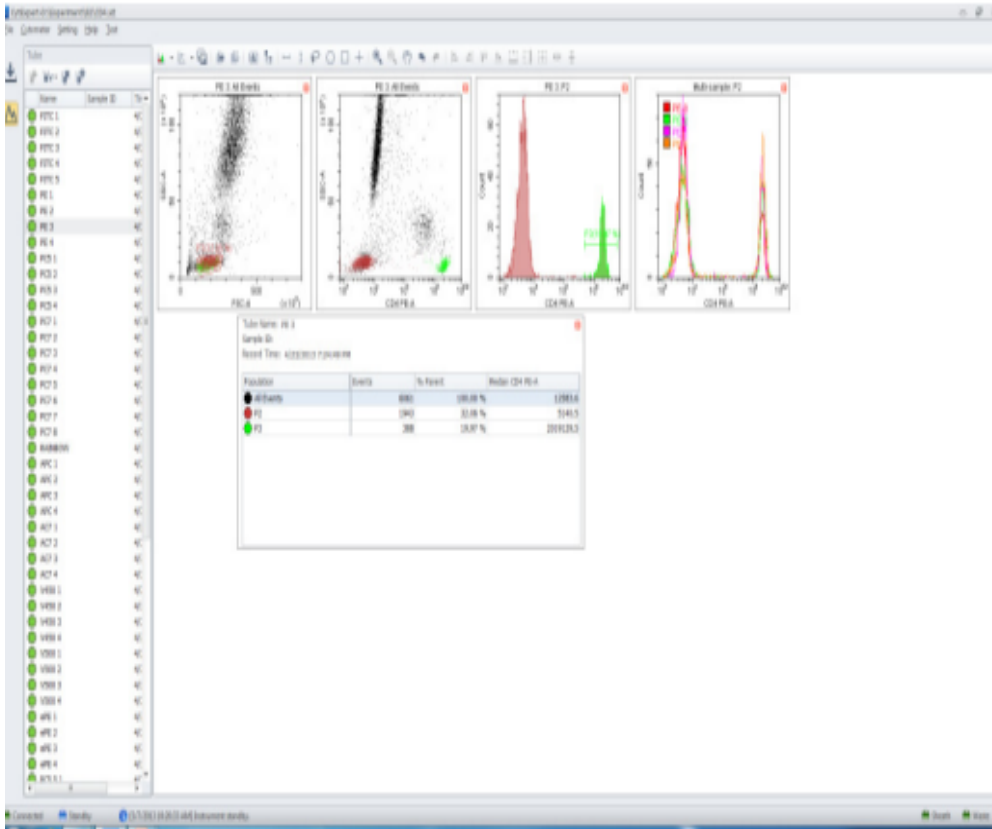
Veri analizi

1. Önceden çalışılmış verinin.xit uzantılı dosyası CYTExpert dosyaları içinden seçilir.



2. Çoklu örnek analizi için  ikonu, tekli örnek analizi için  ikonu kullanılır.

3. Plot, kapı, İstatistik Tablosu ve Populasyon hiyerarşisi analizde gösterilir.



4. Plot Analiz verileri sağa tıklandığında

şeklinde export edilir.

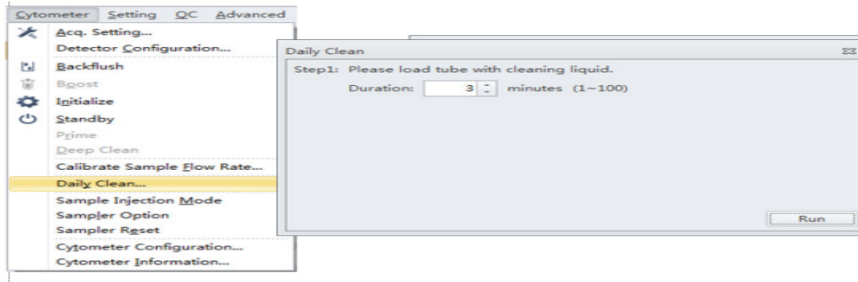
İstatistiksel tablo da sağ tıklanarak aynı şekilde export edilir.

5. Analiz tamamlandığında software kapatılır, çalışma sayfası kapatılır ve güç kaynağı kesilir.

Cihaz kapatma

1. **FILE** menüsünden herhangi bir experiment açılır ve cihaz **INITIALIZE** konumuna getirilir.

2. **CYTOMETER** menüsünden **Daily Clean** seçilir.



3. FlowClean için yıkama süresi 5 dk ve distile su için yıkama süresi de 5 dk olarak ayarlanır.

4. Atık kutusu dolu ise boşaltılır.

5. Örnek tüpleri cihazdan alınır.

6. CytExpert software kapatılır.

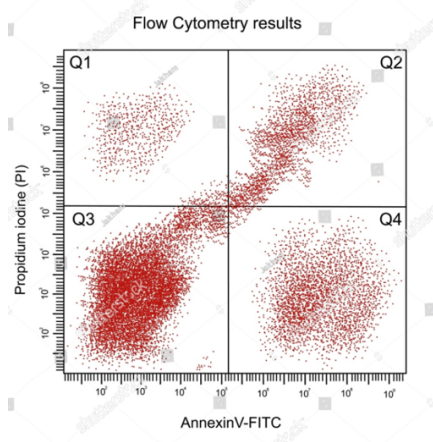
7. Cihaz açma-kapama düğmesinden kapatılır.

Analiz yorumlama

1. Örnek gruplarının oluşturulması;

- İlaç aday bir molekül farklı konsantrasyonlarda veya IC₅₀ konsantrasyonunda meme kanser hücrelerine uygulanır.
- İlaç aday molekülün çözücüsü kontrol olarak benzer şekilde hücreye uygulanır.
- Örnekler;
 - Sadece PBS ile inkübe edilmiş ve ilaç aday molekül uygulanmamış örnek (boyanmamış örnek)

- AnnexinV ve PI ile aynı anda inkübe edilmiş ve ilaç aday molekül uygulanmış örnek
 - AnnexinV ve PI ile aynı anda inkübe edilmiş ve ilaç aday molekül uygulanmış örnek
2. Cihazda apoptoz analizi için kullanılan antikorlara uygun dalga boyu seçilerek analiz yapılır.
 3. Apoptoz analizi sonrası sonuç yorumlama



Q1: Annexin -, PI+
Q2: Annexin +, PI+
Q3: Annexin -, PI -
Q4: Annexin +, PI -

Akış sitometre okuma sonucunda dağılım grafiğindeki farklı kadrantlardaki hücre popülasyonu okuması yapılan hücre profili ile ilgili bilgi vermektedir. Apoptoz veya nekrozun her aşamasındaki hücre yüzdesi kadrantlardaki hücre popülasyonu ile anlaşılabilir.

Aşağıda Tablo 1’de farklı kadrantlardaki hücre popülasyonunun durumunun nasıl yorumlandığı bilgisi verilmiştir;

Tablo 1. Akış sitometre apoptoz analizi sonucu kadrantlardaki hücre durumu

Kadran	Annexin V	PI	Hücre Durumu	Yorum
Q1	-	+	Nekrotik Hücreler	Membran hasarlı, apoptotik değil
Q2	+	+	Geç Apoptotik/Nekrotik Hücreler	Apoptoz veya ikincil nekroz
Q3	-	-	Canlı (Sağlıklı) Hücreler	Sağlıklı hücreler, apoptoz veya nekroz yok
Q4	+	-	Erken Apoptotik Hücreler	Erken apoptoz, membran sağlam

- Q1 (Sol Üst Kadran): Annexin V-negatif, PI-pozitif
Hücre Durumu: Nekrotik Hücreler
Açıklama: Bu hücreler PI-pozitif ancak Annexin V-negatiftir. PI, zarları tehlikeye girdiği için bu hücrelere nüfuz edebilir, bu da nekrozu gösterir, ancak erken apoptoz evrelerinden geçemedikleri için Annexin V'e bağlanmazlar.
- Q2 (Sağ Üst Kadran): Annexin V-pozitif, PI-pozitif
Hücre Durumu: Geç Apoptotik veya Nekrotik Hücreler
Açıklama: Bu hücreler hem Annexin V hem de PI için pozitifdir. Hücreler dışsallaştırılmış fosfatidilserin (Annexin V bağlanması) ve tehlikeye girmiş zarlara (PI boyama) sahiptir, bu da geç apoptozda olduklarını veya sekonder nekroza geçtiklerini gösterir.
- Q3 (Sol Alt Kadran): Annexin V-negatif, PI-negatif
Hücre Durumu: Canlı (Canlı) Hücreler
Açıklama: Bu hücreler ne Annexin V ne de PI'ye bağlanmaz, bu da zarlarının sağlam olduğunu ve apoptoz veya nekroz geçirmediğini gösterir.
- Q4 (Sağ Alt Kadran): Annexin V-pozitif, PI-negatif
Hücre Durumu: Erken Apoptotik Hücreler



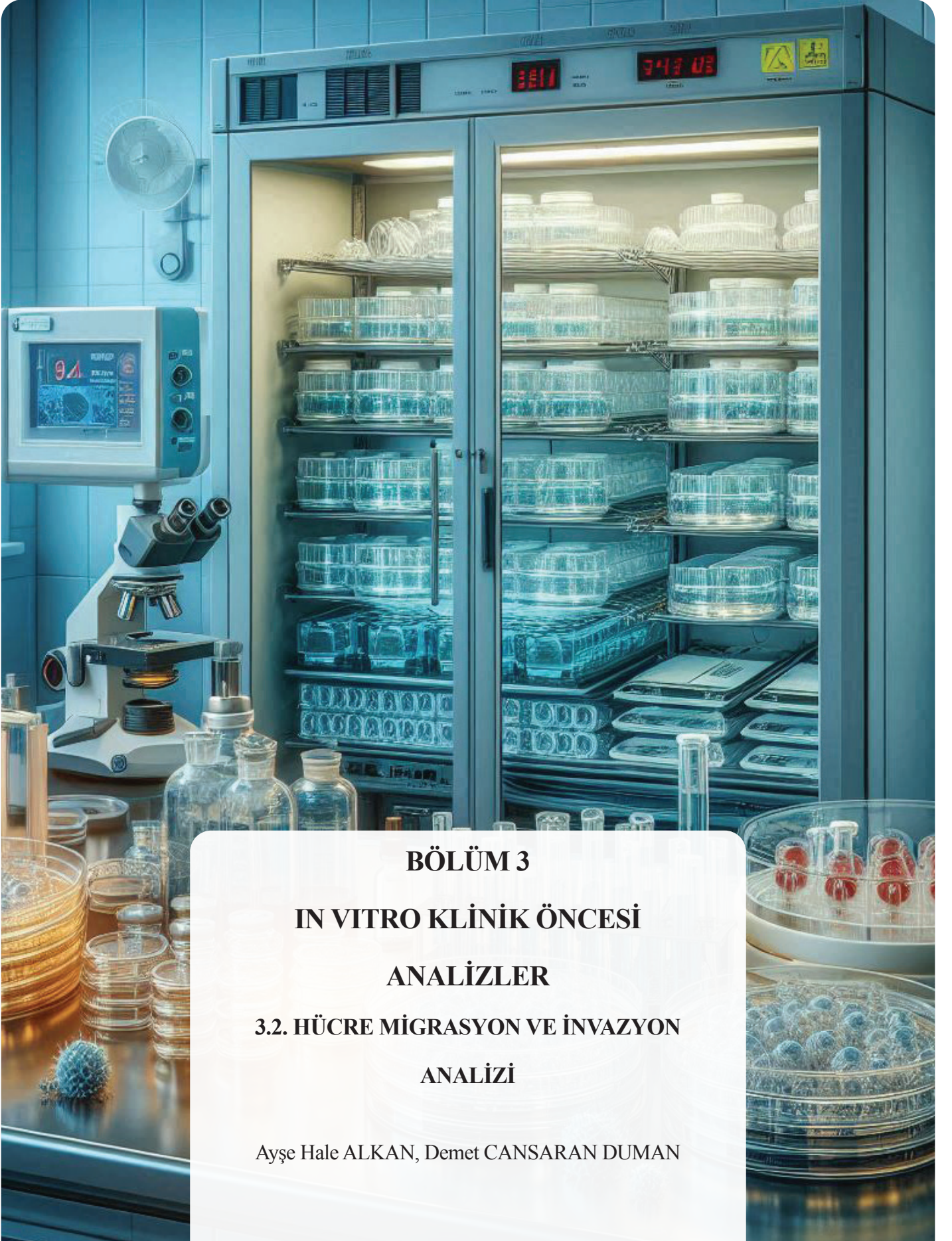
Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

Açıklama: Bu hücreler Annexin V için pozitif ancak PI için negatiftir. Dışsallaştırılmış fosfatidilserin (Annexin V bağlanması) içerirler ancak hala sağlam hücre zarlarına sahiptirler (PI hariç), bu da apoptozun erken evrelerinde olduklarını gösterir.

Video için
QR kodu okutunuz.



İnvazyon Analizi



BÖLÜM 3

IN VITRO KLİNİK ÖNCESİ

ANALİZLER

3.2. HÜCRE MİGRASYON VE İNVAZYON

ANALİZİ

Ayşe Hale ALKAN, Demet CANSARAN DUMAN



1. KONU

Hücrelerin migrasyon ve invazyon potansiyelinin belirlenmesidir.

2. AMAÇ

xCELLigence DP cihazındaki migrasyon ve invazyon deneyleri, kanser araştırmalarının, doku mühendisliğinin ve gelişimsel biyolojinin önemli bir yönü olan hücre hareketliliğini araştırmak amaçlı tasarlanmıştır. xCELLigence DP cihazı, hücre davranışlarını sürekli olarak izlemek için gerçek zamanlı empedans tabanlı ölçümler kullanır ve etiketleme veya manuel gözlem ihtiyacı olmadan hassas izleme sağlar. Bu yöntem, göç veya istila oranı ve kapsamı hakkında gerçek zamanlı veri sağlayarak araştırmacıların farklı deneysel koşullar altında hem hücre hareketliliğini hem de istila özelliklerini değerlendirmesini sağlamayı amaçlar.

3. UYGULAMA

A. HÜCRE MİGRASYON ANALİZİ

Materyal

Deneyde kullanılacak hücre hattı. (Hücre ekimi için her kuyucuğa 100 µl hacimle 20.000-80.000 hücre ekilmesi önerilmektedir.)

Tripsin/EDTA

Serum içermeyen besiyeri (Hücre ekimi için kullanılan mediumun serumsuz hali)

Kritik adım: Bazı hücre hatları serumsuz mediumlara karşı hassas oldukları için, kullanılan hücre tipine bağlı olarak 0.1%-2 serum eklenebilir. Bunun yanı sıra, serum içermeyen besiyeri % 0.25-0.5 oranında BSA (Bovine serum albumin) ile zenginleştirilebilir. Eğer BSA kullanılacaksa, en saf halinin kullanıldığından emin olunmalıdır.

Kemotaksis indükleyici (Genellikle % 5-10 serum ile zenginleştirilmiş serum içermeyen besiyeri ya da büyüme hormonuyla zenginleştirilmiş serum içermeyen besiyeri kullanılır).

Kritik adım: Eğer serum içermeyen besiyeri az miktar serum ile ya da BSA ile zenginleştirilmişse, aynı besiyerine kemotaksis faktör eklenmesi önemli olabilir.

Kalsiyum ve Magnezyum içermeyen PBS



Ekipman

RTCA DP xCELLigence Cihazı

16-well E-Plate

CIM Plate Hazırlanması

Top chamber (üst bölme) ve bottom chamberlar (alt bölme) laminar akış kabini içerisinde paketinden çıkartılır.

Kritik adım: Alt bölmenin cihaza uyması için belirli bir pozisyonda olması gerekmektedir.

Mavi işarete göre hizalanmalıdır.

Alt bölmedeki kuyuların içerisinde 160 µl besiyeri eklenir ve her kuyunun besiyeri ile doldurulduğundan emin olunur.

Üst bölmeyi montaj ünitesinin üstüne mavi işaretler hizalanacak şekilde yerleştirilir. Yerleştirme sonrası, montaj ünitesi saat yönünün tersine 90 derece çevrilir ve üst bölme iki el ile tutularak alt bölmenin üstüne yerleştirilir.

Kritik adım: İki bölmenin kesin olarak yerleştiğini anlamak için çift “click” sesini duyduğunuzdan emin olun.

Üst bölmenin üzerindeki her kuyuya membran yüzeyi örtülecek kadar 25-50 µl serum içermeyen besiyeri eklenir.

Kritik adım: Bu basamakta önemli olan serum içermeyen besiyeri değil, membran yüzeyinin tamamen kapanmasıdır.

CIM Plate Dengeye Getirilmesi (37 °C)

CIM Plate inkübatörün içindeki RTCA DP xCELLigence Cihazı içerisinde uygun pozisyonda yerleştirilir. Besiyerinin dengelenmesi için CIM Plate'in inkübatörde 1 saat kalması gerekmektedir.

Arka plan ölçümü

İlk adım (1 dakika ve 1 tarama), RTCA DP xCELLigence Cihazı analiz programı içerisinde gerçekleştirilir.

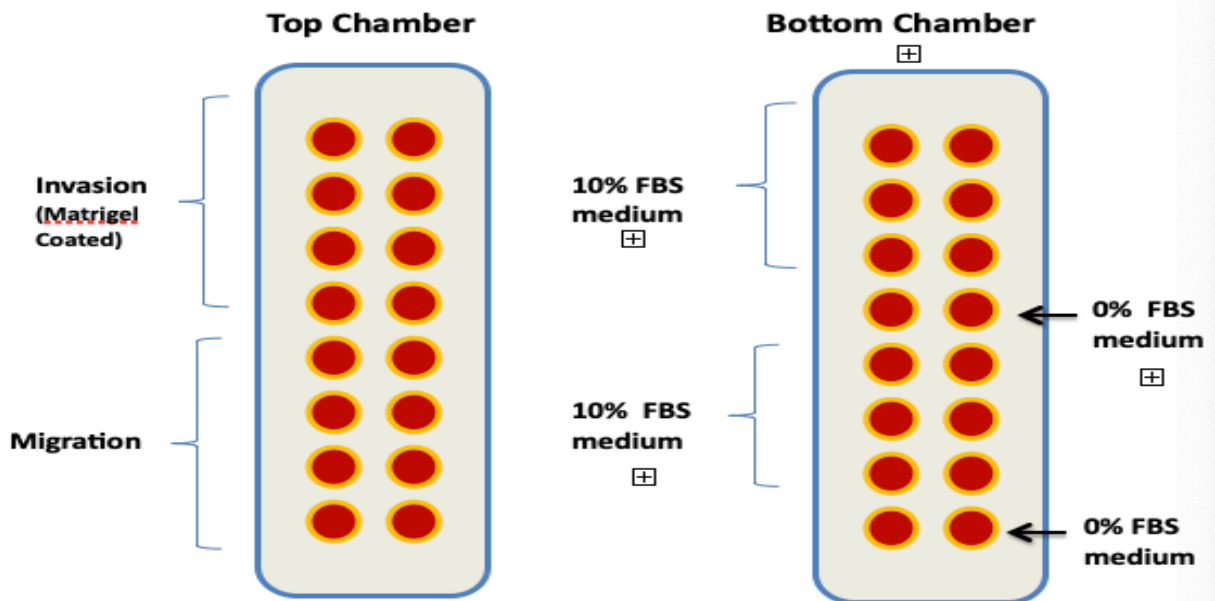
Hücre hazırlama

1. Deneyde kullanılacak hücrelerin % 60-80 doluluk oranına sahip olduğundan emin olunur.
2. Serum içeren besiyeri çekilip atılır ve hücreler PBS ile yıkanır.
3. % 0.05 Trypsin/EDTA çözeltisinden 0.5 ml her 25'lik flask içerisine eklenir ve inkübatörde 1-2 dakika hücrelerin kalkması beklenir.

Kritik adım: Hücreleri çok fazla tripsin ile BIRAKMAYINIZ! Deneylerin kalitesi ve sağlığı için bu adım çok önemlidir.

5. Trypsinin etkisi serum içeren besiyeri veya TNS solution 1:1 oranında eklenerek sıfırlanır.
6. Trypsin içeren hücreler serum içermeyen besiyeri ile santrifüjlenir. Genel olarak, bu adım için 800g'de 5 dakika yeterlidir.
7. Süpernatant (Üst kısım) çekilip atıldıktan sonra, pelletin üzerine birkaç ml serum içermeyen besiyeri yeniden eklenir ve hücre sayımı yapılır. Deney için hücre yoğunluğunun en az 3×10^5 /ml olmalıdır. Deney en az üç ya da dört tekrar şeklinde gerçekleştirilmelidir.

CIM Plate'e hücre ekimi





Üst bölmedeki her kuyuya 100 µl hücre içeren çözeltiden eklenir. Her kuyuda 30.000 hücre bulunmalıdır.

Kritik adım: Hücreleri üst bölmeye eklerken, köpük oluşumundan kaçınılmalıdır. Köpük oluşumu hücre göçünü tamamen bloke edebilir ya da hücrelerin köşeye göç etmesine sebebiyet verebilir. Oluşan köpükler pipet ucu yardımıyla üst bölmenin tabanına değdirilmeden yok edilir. Eğer köpük gitmiyorsa, kuyunun içindeki çözelti hemen çekilip yeniden köpük olmayacak şekilde eklenebilir.

CIM plate'in oda sıcaklığında bekletilmesi

Hücrelerin yerleşmesi için CIM plate laminar akış cihazı içerisinde en az yarım saat oda sıcaklığında bekletilmelidir.

Ölçüm alınması

Hücre içeren CIM Plate inkübatörün içindeki DP Sistemine yerleştirilir. Yapılacak olan ölçümün 15 dakikalık aralıklarla (tercihen) 24 saat boyu sürmesi gerekmektedir.

Kritik adım: DP sistemine yerleştirilecek hücre içeren CIM Plate'in arkaplan ölçümü alınırken kullanılan modüle yerleştirilmelidir. Her modülün birbirinden farklı arkaplan dirençleri gösterebildiği için deney verisinde yanlışlıklar olabilir.

Kritik adım: Çoğu hücre hattı için, göç süresi 3-24 saat arası sürmektedir. XCelligence DP sistem ile migration analizini istediğiniz kadar sürdürebilirsiniz. Ancak, migration analizi süresine karar vermedeki en büyük etken hücrelerin sayısının ikiye çıkma süresidir (doubling time). Elde edilen veriyi yorumlarken hücre çoğalması ile hücre göçünün karıştırlmaması için, ikiye katlanma süresinin “well below” olan kısmı seçilir.

Veri analizi

Ölçüm 24 saat geçtikten sonra durdurulur.

Tüm tekrarların ortalamaları alınır.

Cell Index (CI) eğrileri analiz edilir. Pozitif göç sinyalleri ortalama $CI \geq 2$ kriterini karşılamalıdır.



Kritik adım: Farklı hücre hatları, eklenen hücre sayısına ve hücre morfolojisine bağlı olarak farklı direnç gösterebilmektedir. Eğer kullanılan hücre hattının CI değer, 0.2'lik değer dahilindeyse, genel sinyali arttırmak için daha fazla hücre eklenebilir ya da farklı koşullarda ECM proteinlerinin membran üzerini örtmesi kontrol edilebilir.

Öneri: Gerekli olmamakla birlikte, hücre göçünün oranı ile CI sinyali hakkında bir izlenim elde etmek için membran altında kalan hücreler boyanabilmektedir. Hücreleri boyamak için:

Alt ve üst bölmesi birleşik olan CIM Plate birbirinden ayrılır.

Üst bölmedeki kuyucuklardaki besiyeri çekilip atılır.

CIM plate membran üzerindeki göç etmiş hücreler Diff-Quick staining kit kullanılarak boyanır. Modife edilmiş boyama protokolü aşağıda verilmiştir:

Üst bölmeyi 2 dakika sabitleştirici solüsyon içerisine membran üzerindeki elektronlar direk çözeltiyeye denk gelecek şekilde yerleştirilir.

Ardından üst bölme membran üzerindeki elektronlar direk çözeltiyeye denk gelecek şekilde solüsyon I içerisinde 1 dakika bekletilir.

Üst bölme membran üzerindeki elektronlar direk solüsyona denk gelecek şekilde solüsyon II içerisinde 1 dakika bekletilir.

Son olarak, üst bölme su ile hafifçe yıkanır ve hücreler “upright” mikroskop altında sayılır ve incelenir.



B. İNVAZYON ANALİZİ

Materyal

Matrijel

Kritik adım: Matrijel buz üstünde eritilir ve 0.5 ml eppendorf tüplerin içerisine 100 µl olacak şekilde bölünür. Hazırlanan Matrijel stokları -80°C’de muhafaza edilir. Kullanılmış Matrigel’in yeniden kullanılması tavsiye edilmez. Matrijellerin konsantrasyon ve kalitesi farklılık gösterebilmektedir. Matrijelin kalitesi ve konsantrasyonunu ölçmek için Matrijel titration analizi yapılması ve sonuçlarının karşılaştırılması tavsiye edilmektedir.

Hücre spesifik hazırlanmış besiyeri

CIM plate’in üst bölmesinin matrijel ile kaplanması

Kritik adım: Deneye başlamadan önceki gün, kullanılacak pipet uçları, eppendorf tüpleri ve CIM Plate’in üst bölmesi +4 °C’ye kaldırılır ve bir gün soğuması beklenir. Buna ek olarak, 1 tüp Matrigel -80 °C’den +4’ye çıkarılır.

Önceden soğutulmuş serum içermeyen besiyeri ile matrijel seyreltilir. Bu adım, buz üzerinde bulunan eppendorf tüplerde yapılmalıdır. Yaklaşık olarak 1 ml Matrijel CIM Plate’in üst bölmesini kaplamalıdır (16 kuyu için toplam hacim).

Matrijel soğuk serum içermeyen besiyeri ile 800 µg/ml olmak üzere hazırlanır. Bu adım polimerasyondan kaçınmak için BUZ üstünde gerçekleştirilmelidir.

Üst bölmedeki her kuyuya 50 µl Matrijel eklenir ve Matrigel’in tüm yüzeyi kapladığından emin olunur.

30 µl Matrijel her kuyudan çekilerek, her kuyu içerisinde 20 µl tüm yüzeyi kaplayan Matrijel kalması sağlanır.

Kritik adım: Bu aşamada her kuyudaki Matrijel zemini tamamen kapatması çok önemlidir. 30 µl Matrijel kuyulardan çekilirken, membrana değmeden inilebilecek en



alt bölmeye kadar inilip çekilmesine dikkat edilmelidir. Bu aşamada baloncuk yapmamak önemlidir.

Matrijel ile kaplanmış üst bölme 4 saat boyunca 37 °C'deki inkübatörde bekletilmelidir.

Kritik adım: İnkübatöre kaldırılan üst bölmenin hiçbir yüzeye değmeden askıda kalması gerekmektedir. Ayrıca, kontaminasyon ve buharlaşmadan kaçınmak için üst bölmenin kapağının kapatılması gerekmektedir.

Matrijel polimerize olduktan sonra üst bölme laminar akış cihazı içerisine alınır ve cihaz protokolü başlatılır. Bu süreç Migrasyon analizi ile aynıdır.

Veri analizi

CIM plate'de hücre invazyonunu ölçmek için birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Hücre Invazyon İndeks (CII), farklı zaman dilimlerindeki hücre invazyonunu gösteren ve Matrijel kaplı kuyularla (invazyon) kaplanmamış kuyular arasındaki oranı belirtmektedir.

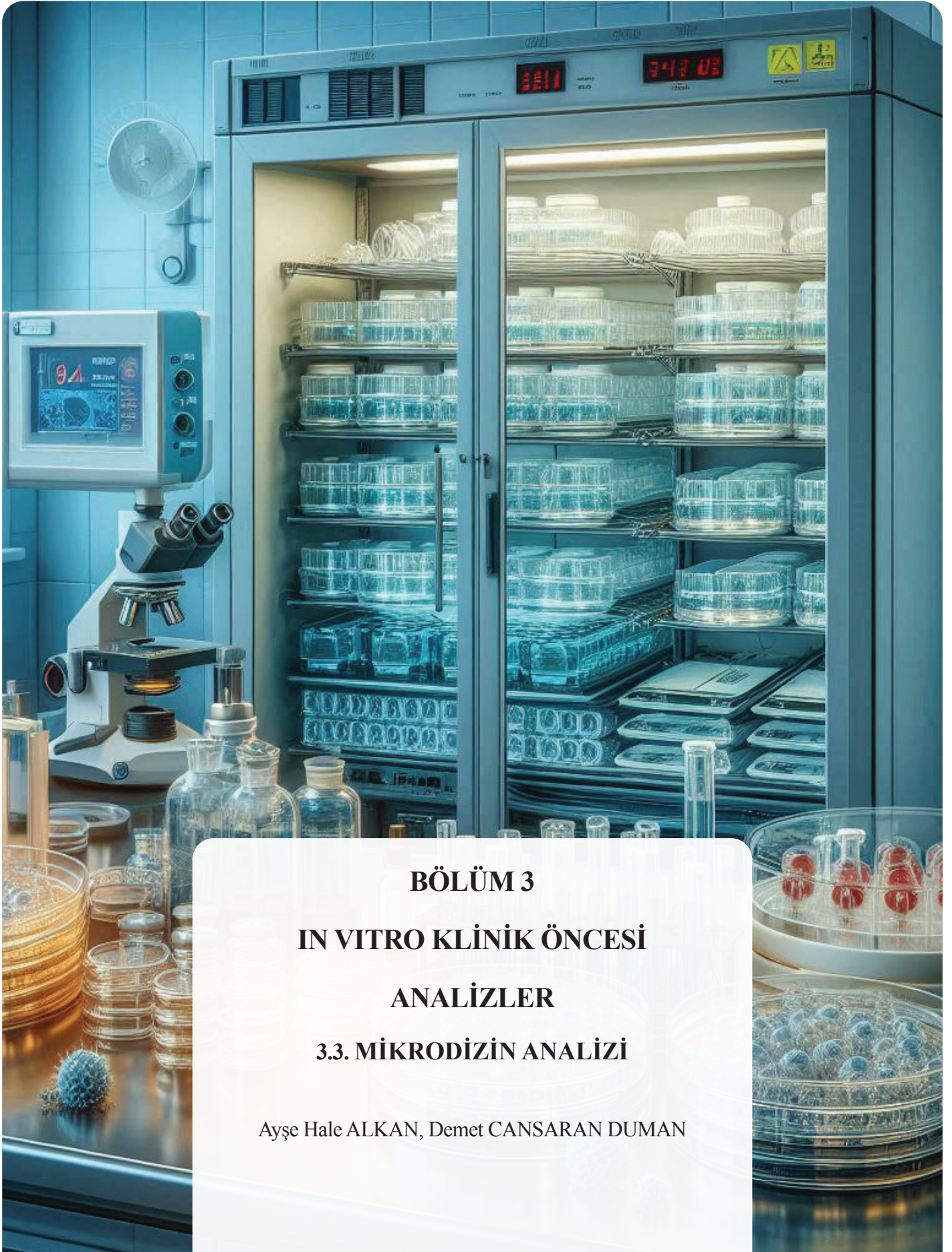
Önemli Noktalar

1. Tekrarlar arasında çok fazla fark oluşuyorsa;
 - Matrijelin son kullanma tarihini kontrol edin.
 - Matrijelin deneyden önce bir gece boyunca +4°C beklediğinden emin olun.
 - Her deneyde yeni matrijel kullanın. Çözünen Matrijel tekrar dondurulup kullanılamaz.
 - Matrijel ile temas eden her araç-gereç +4°C'de soğutulduğundan ve soğuk bir şekilde muhafaza edildiğinden emin olun.
 - Seyreltilmiş olarak kullanılan matrijelin tüm zemini kapladığından emin olun.
 - Kaplama aşamasında baloncuk yapmadığınızdan emin olun.
 - 30 µl matrijeli geri çekerken her yerden eşit olarak çektiğinizden emin olun.
2. Matrijel ile kaplanmış kuyulardan sinyal gelmiyorsa;
 - Matrijeli uygun bir şekilde seyrelttiğinizden emin olun.



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

3. Matrijel kaplı ve kaplanmamış kuyulardan yeterli sinyal ya da CI değeri alamıyorsanız;
- Matrijeli çok fazla seyreltmiş olabilirsiniz.
 - Matrijel yeterince polimerize olmamış olabilir. Matrijelin 37°C'de CO₂ inkübatörde polimerize olması çok önemlidir. Optimal Matrijel polimerizasyonu için nemli ortam gereklidir.



BÖLÜM 3

IN VITRO KLİNİK ÖNCESİ

ANALİZLER

3.3. MİKRODİZİN ANALİZİ

Ayşe Hale ALKAN, Demet CANSARAN DUMAN



1. KONU

İlaç araştırma gelişme çalışmalarında mikrodizin analizi yöntemi.

2. AMAÇ

In vitro klinik öncesi çalışmalarda mikrodizin analizi, **hücresel yanıtla ilişkin** binlerce gende gen ifadesi profillerini aynı anda değerlendirmek için kullanılır ve tedavilere, ilaçlara veya çevresel değişikliklere karşı hücresel tepkiler hakkında kapsamlı bilgi sunmayı amaçlar.

3. UYGULAMA

RNA izolasyonu

IC₅₀ konsantrasyonu belirlenmiş MCF-7 ve MCF-12A hücrelerinin vulpinik asit uygulaması ile RNA izolasyonun gerçekleştirilmesi aşamasına geçilmiştir. RNA izolasyonu için ilk olarak 6 kuyulu plate'lere her bir kuyuya 5x10⁵ hücre düşecek oranda hem MCF-7 için hem de MCF-12A hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin plate oturması için 24 saat beklendikten sonra, hücre ekilen kuyulardan besiyeri çekilip atılmıştır. Hücrelerin üzerine 2 ml IC₅₀ konsantrasyonunda vulpinik asit eklenmiştir. Kontrol olarak ise vulpinik asit uygulanmamış 2 ml besiyeri ve ayrıca vulpinik asit çözücüsü DMSO (% 0.01) eklenmiştir. Bu şekilde hücreler belirlenen optimal etkin zamana kadar (48 saat) inkübatörde bekletilmiştir. 48 saat sonra plate'deki kuyulardan kontrol ve ilaç konsantrasyonu çekilip atılmış, her bir kuyu 2 ml PBS ile yıkanmıştır. 6 kuyulu plakalara ekilen hücrelerin tüm deney gruplarından RNA izolasyonu aşağıda belirtilen yöntemle göre yapılmıştır.

1. 6 kuyulu plakada yer alan her bir kuyuya 1 ml Genazol eklenerek ependorf tüplere aktarılmıştır.
2. Tüplere 200 µl kloroform eklenmiş ve tüpler hafifçe çalkalanmıştır.
3. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen tüpler daha sonra +4 °C'de 12000 rcf'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonunda tüplerde 3 farklı faz oluşmuş ve en üst faz yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır.
5. Tüplere 500 µl izopropanol eklenmiş ve tüpler 1 dk boyunca hafifçe aşağı yukarı çalkalanmış ve ardından tüpler 10 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.



6. 10 dk sonra tüplerin +4 °C’de 12000 rcf’de 10 dk santrifüj edilmesiyle RNA’ların pellet olarak tüplerin dibine çökmesi sağlanmıştır. RNA’ların pellet olarak dibe çökmesi sebebiyle süpernatant kısım çekilip atılmıştır.
7. Tüplere 1 ml %75’lik etanol eklenerek pelletler etanol içerisinde çözülmüştür.
8. Tüpler yine +4 °C’de 12000 rcf’de 5 dk santrifüj edilmiştir.
9. Tüplerdeki etanol uzaklaştırılmıştır.
10. Tüpler kapağı açık bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Böylece tüplerdeki kalan alkolün uçması sağlandıktan sonra pelletler 35-40 µl RNase serbest suda çözülmüştür. RNA örnekleri spektrofotometrede ölçüm alınmıştır, pasajlanarak sonrasında -80°C’de muhafaza edilmiştir.

RNA örneklerinin saflık ve miktar tayini agaroz jel, spektrofotometre ve biyoanaliz cihazında yapılmalıdır.

miRNA mikrodizin analizi

RNA örnekleri mikrodizin analizi için kullanılmıştır. miRNA mikrodizin analizine başlamadan önce RNA örneklerinin agaroz jele yüklenerek kalite değerlendirmesi yapılmıştır.

miRNA mikrodizin deneyi Agilent teknolojisinde kullanılan Protokol (miRNA Microarray System with miRNA Complete Labeling and Hyb Kit, Protocol Version 3.1.1, August 2015) ve miRNA Complete Labeling and Hyb Kit-Human kit (Agilent), Gene expression wash buffer kit (Agilent), DNase/RNase-free distilled water (Invitrogen) gerçekleştirilmiştir. Deneysel işlemler beş alt basamaktan oluşmaktadır. *RNA Konsantrasyonunun Hazırlanması:* Spektrofotometrede konsantrasyonu ve saflığı belirlenmiş RNA örnekleri mikrodizin reaksiyonun etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi için 500 ng (8 µl hacime distile su ile tamamlanmıştır) olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca biyoanalizör cihazında RNA örneklerinin kalite analizi yapılır. *Poly(A) Kuyruğunun Eklenmesi:* Bu aşamada uygulama buz üzerinde yapılır ve bu süreçte miRNA molekülünün 3' ucuna Poly(A) kuyruğu eklenmesi yapılır. Kuyruklama için gerekli enzim ve tamponlar hazırlanırken, bu aşamada özel olarak ATP karışımının 1 mM’lık Tris ile seyreltilmesi gerekir. Dilüsyon için kullanılacak formül: 1000/µg başlangıç total RNA hesaplamasına dayanmaktadır. RNA örneği üzerine dilüe edilen ATP ve diğer enzim ve tamponlarda eklenip ve 15 dakika 37C’de inkübasyona bırakılmıştır. Deney basamağında; RNA spike control oligos, 2,0 µl; ATP karışımı (dilüe edilmiş) 1,0 µl; PAP Enzimi 1,0 µl; 10X



Reaksiyon tampon 1,5 µl; 25 Mm MnCl₂ 1,5 µl eklenerek toplam hacim 15 µl'ye tamamlanmıştır. *miRNA'ların biotin ile işaretlenmesi (Ligasyon)*: İnkübe edilen örnek alınıp buz üzerinde bekletilir. Bu aşamada 15 biyotinli DNA'nın moleküle ligasyonu aşamasıdır. Biyotin karışımı ve T4 DNA ligaz enzimi eklenir ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi dolduktan sonra reaksiyonu durdurmak için son olarak durdurucu solüsyon eklenip ve ligasyon evresi tamamlanmıştır. Deney basamağında; 5X Flash Tag Ligation Mix Biotin 4,0 µl; T4 DNA Ligase 2,0 µl; Stop Solution 2,5 µl eklenmesi ile toplam hacim 23,5 µl'ye tamamlandıktan sonra hacmin 21,5 µl'lik kısmı ayrılır. *Hibridizasyon*: Bu aşama örnek Array'e yüklenmeden önceki son aşamadır. Hibridizasyon karışımı hazırlanıp örnek üzerine eklenir, 99° C'de 5 dakika, 45° C'de 5 dakika inkübe edilir. Örnekler array içine yüklenir ve 48° C hibridizasyon fırınında 16 saat boyunca hibridize olması beklenir. Deney basamağında; 2x hybridization mix 50 µl; Nuclease free water 10 µl; Deionized formamide 5 µl; DMSO 10 µl; 20x ökaryotik hibridizasyon kontrollerinden 5 µl; Kontrol oligonucleotide B₂, 3nm 23.2 µl ve toplam hacim 103.2 µl'e tamamlanmıştır. *Yıkama, boyama, tarama*: 16 saat sonunda Array hibridizasyon fırınından alınır ve bilgisayara bağlı olan yıkama istasyonunda array için uygun protokol seçilmiştir. Gerekli tampon ve solüsyonlarla yıkama ve boyama yapılmış olur. Yıkama-boyama protokolü tamamlanan Array alınıp ve tarayıcıya konulmuştur. Tarama sonucunda analiz için gerekli olan veriler elde edilmiş ve cihaza ait software'de (Agilent) analizler gerçekleştirilmiştir.

Biyoinformatik analizi

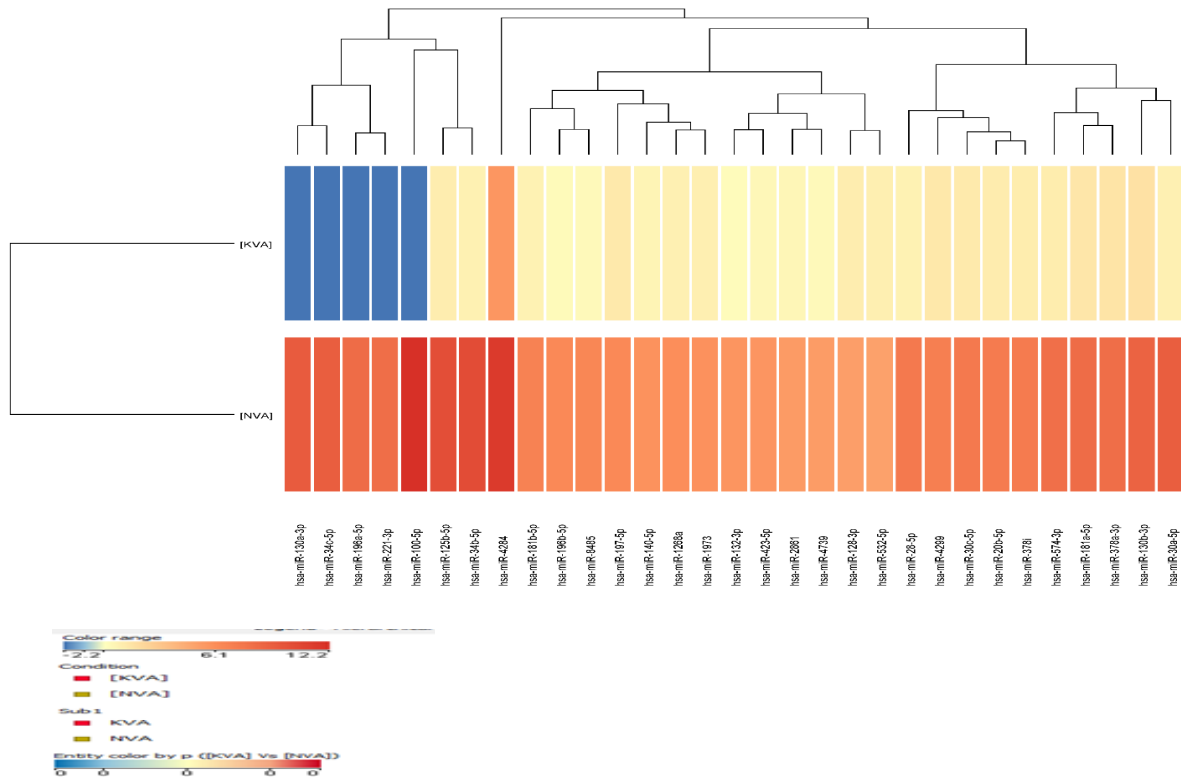
Biyoinformatik analiz ve yorumlama örnek çalışma üzerinden açıklanacaktır. Örneğin, Vulpinik asit (VA) molekülünün MCF-7 meme kanser ve MCF-12A meme epitel hücrelerine uygulanması sonrası miRNA profili belirlenmiştir. Vulpinik asit molekülünün çözümü olarak DMSO kullanılmış olup bu grup kontrol olarak değerlendirilmiştir.

MCF-7 hücrelerine vulpinik asit uygulaması ile MCF-12A hücreleri vulpinik asit uygulama sonuçları ile karşılaştırılmış ve farklılaşan miRNA listesi oluşturulmuştur. İstatistik analiz yöntemi olarak Bonferroni FWER doğrulama metodu ve p<0.05 analiz bariyeri ile analiz gerçekleştirilmiştir. Ayrıca analiz yöntemi uygulanırken; kanserli hücre vulpinik asit uygulaması spesifik miRNA listesini elde edebilmek adına;

kanserli hücre vulpinik asit uygulaması'dan *kanserli hücre kontrol + normal hücre ilaç uygulaması + normal hücre kontrol* verileri çıkarılarak elde edilmiştir.

Sonuçların yorumlanması

MCF-7 hücresine Vulpinik asit uygulanmış örnek (KVA) ile MCF-12A hücresine vulpinik asit uygulanmış örneklerin (NVA) karşılaştırması ile HEAT-MAP oluşturulmuştur. Üst grup kanser hücresine ilaç aday molekül uygulanmış (KVA), alttaki grup ise normal hücreye ilaç aday molekül uygulanması sonrası (NVA) miRNA ifade seviyesi profilini gösterir. İstatistiksel analizler sonrasında mavi renk -2.2 kat ile ifade seviyesi baskılanmış miRNA'ların ifade seviye profilini, sarı renk olan grup ifade seviyesinde bir değişim gözlenmemiş, turuncudan koyu kırmızıya geçen renk sıkalasında ise ifade seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derece de artmış miRNA profilini yansıtmaktadır. En yüksek ifade seviyesi oranı 12.2 kat olarak belirlenmiştir.



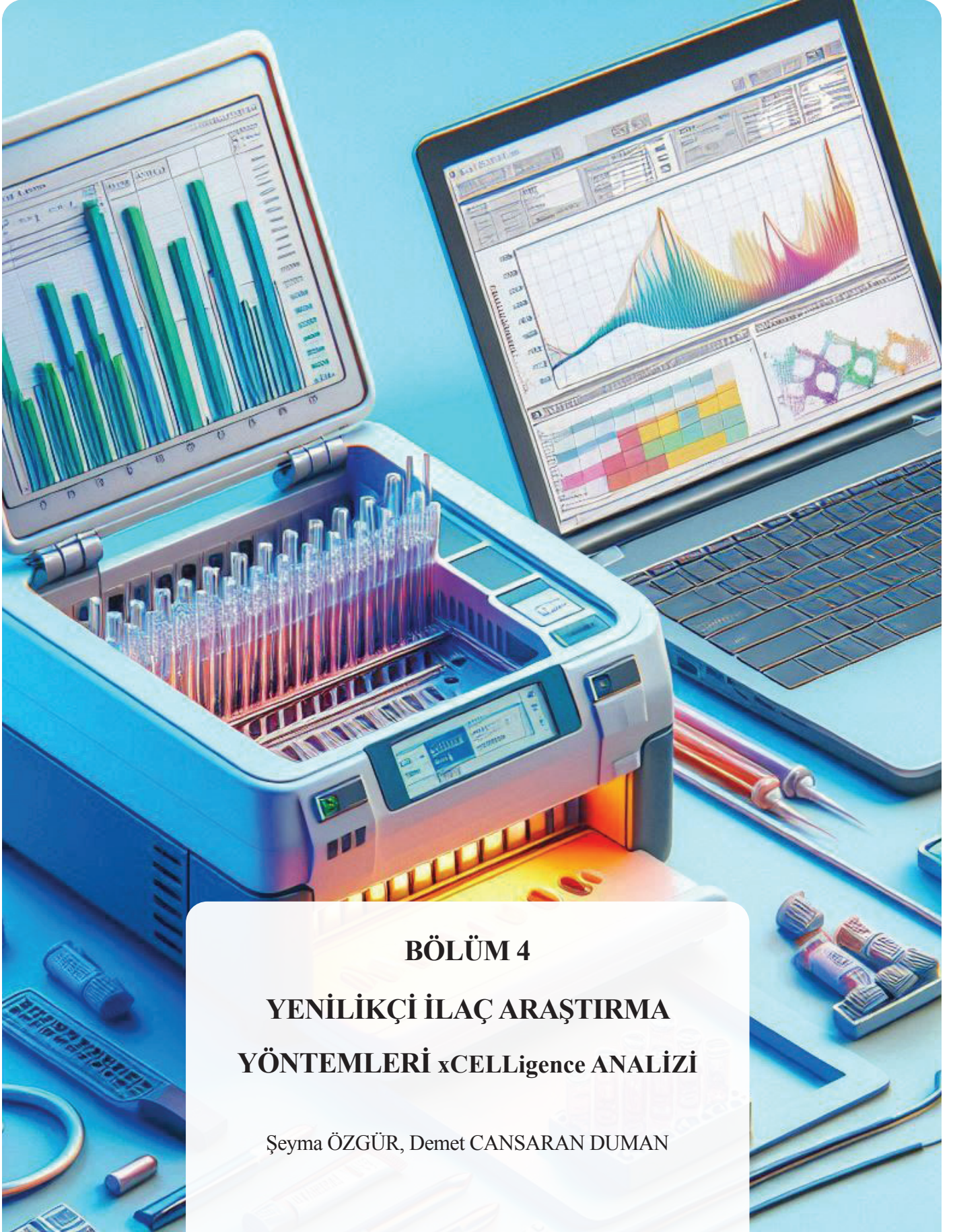
MCF-7 hücresine Vulpinik asit uygulanmış örnek (KVA) ile MCF-12A hücresine vulpinik asit uygulanmış örneklerin (NVA) karşılaştırması ile oluşturulan heat-map. (KVA: Kanser hücre (MCF-7) VA uygulanmış, NVA: Normal hücre (MCF-12A) VA uygulanmış).



Video için
QR kodu okutunuz.



xCELLigence Analizi



BÖLÜM 4

YENİLİKÇİ İLAÇ ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ xCELLigence ANALİZİ

Şeyma ÖZGÜR, Demet CANSARAN DUMAN



1. KONU

İlaç araştırma gelişme çalışmalarında xCELLigence cihazı ile hücre canlılık analizi yöntemi.

2. AMAÇ

In vitro klinik öncesi çalışmalarda sitotoksosite belirleme deneylerinde boyaya dayalı klasik yöntemler yerine ilaç uygulama sonrası online olarak hücre profilini izleme ve sitotoksosite analizini çok tekrarlı, hassas ve valide olarak belirlenmesini amaçlar.

3. UYGULAMA

A. HÜCRE KÜLTÜRÜ VE İDAMESİ

Dikkat : Aşağıda yer alan protokoller adeziv hücre hatları içindir.

Hücrelerin Açılması

- Hücre hattı sıvı nitrojen tankından alınıp hızlıca kültür odasına getirilir.
- 15 ml'lik falcon tüp içerisine 5 ml ortam koyulur ve üzerine çözdürülen hücreler (yaklaşık 1 ml) eklenir.
- 4°C, 1500 rpm, 5 dakika santrifüj edilir.
- Supernatant atılır. Hücre peleti yeniden taze ortam ile çözdürülüp T-25 flask içerisine eklenip son hacim 5 ml olacak şekilde ortam ile tamamlanır.
- Mikroskopta kontrol edildikten sonra 37°C CO₂ inkübatöre yerleştirilir.

Hücrelerin Pasajlanması

- T-25 flask içerisindeki ortam uzaklaştırılır. Üzerine 3 ml PBS solüsyonu* eklenir ve flask hafifçe çalkalanarak yıkanır. Bu işlem bazı hücreler için iki kez yapılabilir.
- PBS uzaklaştırıldıktan sonra yaklaşık 1 ml olacak şekilde tripsin eklenir ve 37°C CO₂ inkübatörde birkaç dakika inkübe edilir.
- Mikroskopta hücrelerin tam olarak kalkıp-kalkmadığı kontrol edilir. Gerekirse bir süre daha inkübe edilebilir.
- Mikroskopta hücrelerin durumu kontrol edildikten sonra üzerine 5 ml ortam eklenir ve 1:2** olacak şekilde 2 adet flaska bölünür. Ardından her flask için son hacim dikkate



alınarak ortam eklenir. Mikroskopta kontrol edilen hücreler 37°C CO₂ inkübatöre yerleştirilir.

*Protokolde belirtilen miktarlar T-25 flask içindir.

**Her hücrenin pasaj dilüsyonu farklılık gösterir. Hücre hatları ile gelen bilgi formu dikkate alınmalıdır.

Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin dondurulma işlemi kademeli şekilde farklı sıcaklıklarda yapılmalıdır.

- Flask içerisindeki ortam uzaklaştırılır. Üzerine 3 ml PBS solüsyonu eklenir ve flask hafifçe çalkalanarak iki kez yıkanır. Ardından tripsin eklenip 37°C CO₂ inkübatörde birkaç dakika inkübe edilir.
- Hücreler mikroskopta kontrol edildikten sonra üzerine 5 ml ortam eklenir ve 15 ml falcon tüp içerisine alınır. 4°C'de 1500 rpm, 5 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sırasında %90 FBS ve %10 DMSO içeren *freezing solution* hazırlanır.
- Süpernatant uzaklaştırılır ve pelet üzerine 1 ml önceden hazırlanan *freezing solution* eklenir. Pelet solüsyon içerisinde çözündürüldükten sonra tüpe alınır ve hızlıca -20°C dolaba kaldırılır. Yaklaşık 1 saat -20°C'de bekletilen hücreler ardından -80°C dolaba alınır, bekleme süresi yaklaşık 18 saat (overnight)'dir. Bu işlemin ardından hücreler sıvı nitrojen tankında uygun şekilde saklanır.

Hücrelerin Ekilmesi

Optimum hücre yoğunlukları, her hücre tipine özgü olup belirlenmesi gereken büyüme özelliklerine göre değişecektir.

- Hücre hattına özgü 96 kuyulu plaklara uygun hücre yoğunluğu belirlenir. Ardından hücreler tripsinlenip sayılır ve 100 µL solüsyonda uygun kaplama yoğunluğunu elde etmek için hücreler antibiyotik ve serum içeren ortamda seyreltilir.
- 96 kuyulu plaklara her bir kuyuya 100 µL hücre ekilir ve gece boyunca %5 CO₂, 37°C'de inkübe edilir.



A. HÜCRE CANLILIğINI WST-1 YÖNTEMİ İLE BELİRLEME

İlaç Aday Molekül Uygulama

Çalışılacak molekül belirlendikten sonra uygun konsantrasyonda ana stok hazırlanır sonrasında uygulama doz aralığı belirlenir ve hazırlanır. Benzer şekilde ilaç aday molekülün çözücüsü de kontrol olarak hazırlanır.

WST-1 protokolü ile hücre canlılık testi

WST-1 protokolü yaşayan hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmek amacı ile tasarlanmış bir protokoldür ve hücre çoğalması ve sitotoksisite testleri için kullanılan bir yöntemdir. Protokol, WST-1'in yaşayan hücreler tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda suda çözülebilen formazan tuzu oluşur ve açığa çıkan formazan boyası bir spektrofotometrik okuyucu tarafından ölçülür. Absorbans değereri hücre sayısı ile doğru orantılıdır, yani OD (optik dansite) değereri yüksek ise hücre canlılığı fazla demektir. Bu yöntem aracılığıyla farklı dozlardaki ilaç uygulamasının hücre çoğalmasına etkisi gözlenebilmekte ve IC₅₀ değereri hesaplanabilmektedir. IC₅₀ değereri; bir ilacın hücre çoğalmasının en az yarısını (%50) inhibe etmesi için gereken konsantrasyondur, bir başka değişle etkinlik gösterdiği minimum konsantrasyondur.

Buna göre, uygun ilaç/madde konsantrasyonlarını belirlenmesi için ilk olarak 96 kuyulu hücre plaklarında her bir kuyuya denk düşecek ideal hücre sayısı belirlenmelidir. Ardından hücreler uygun miktarda ekilip değişen konsantrasyonlarda ilaç/madde uygulaması yapılır.

İlaç/madde çözücü ile de aynı konsantrasyonlarda sulandırmalar hazırlanıp hücrelere kontrol grubu olarak verilir. Bunun dışında hücrelerin durumunu kontrol etmek amacıyla sadece hücre ve besiyerinden ibaret "Hücre Kontrol" kuyuları, absorbans ölçümü sırasında kullanılan ve sadece besiyerinden oluşan "Blank" kuyuları da plak üzerinde hazırlanır. Hücreler uygun inkübasyon zamanının ardından uygulama yapılan plaktaki kuyulara 10 µl WST-1 eklenip 2 saat boyunca %5 CO₂'de 37°C'de inkübe edilir ve ardından 450 nm spektrofotometrik ölçüm yapılır. Sonuçta elde edilen absorbans değereri kullanılarak IC₅₀ değereri ve canlılık oranları hesaplanır.



B. HÜCRE CANLILIğINI RTCA- xCELLigence ANALİZ SİSTEMİ İLE BELİRLEME

Hücre ekimi

- Cihaz ve kablosu %70'lik etil alkol ve peçete ile dikkatli bir şekilde temizlenir.
- Cihaz deneye başlamadan yarım saat önce inkübatöre yerleştirilmelidir.
- Bilgisayar açılır ve cihaz kablosu bilgisayara bağlanır.
- Bilgisayardan **RTCA** programı açılır.
- **ExpNote** bölümüne deney bilgisi yazılır.
- **Layout** bölümüne kuyuların isim ve bilgisi yazılır. Tekrar kuyularının isimleri tamamen aynı olmalıdır. Daha sonra kuyular mouse ile seçilerek **Apply** tuşuna basılır. Cihazın hangi kuyularda ölçüm yapacağı belirlenmiş olur.
- **Schedule** bölümünde ilk sütuna sağ tıklanır ve **Add a Step** seçilerek birinci ölçüm adımı eklenir. Bu adım ile medium için background ölçümü yapılır.
- **Message** bölümünden her aşama kontrol edilebilir.
- **Plot** bölümünde sağda yer alan kuyular seçilir ve **Add** tıklanır bu sayede seçilen kuyuların grafikleri izlenebilir. Grafikten kuyuları çıkarmak için sağ taraftan kuyular seçilerek **Remove** tıklanır.
- Ekimi yapılacak hücrelerin sayımı yapılır ve ekim için gerekli olan miktar belirlenir. Hücreler ekime hazır hale getirilir.
- Hücrelerin ekiminden önce background ölçümü için cihaz plate'inde tüm kuyulara 100 ul medium (hücrelerin büyütüleceği) eklenir.
- Plate cihaza dikkatli bir şekilde yerleştirilir. Öncelikle cihaz üzerindeki siyah tuşa basılarak cihaz kapağı açılır. Plate'in kesik ucu cihazda bulunan bölmedeki kesik kısma denk gelecek şekilde yavaşça plate bölmeye bırakılır. Cihaz kapağı dikkatli bir şekilde kapatılır.
- **Message** bölümü kontrol edilir. Bir problem yok ise **Schedule** bölümünde ilk eklenen adım sol üstte yer alan **Play** kısmına tıklanarak başlatılır.
- Cihaz deneye başlamadan önce deneyin nasıl kayıt edileceğini sorar. Masaüstü seçilerek deney adı girilir. Background ölçümü başlar, deney satırında **Test** yazar. Ölçüm yaklaşık 10-15 sn sürer. Tamamlandığında deney satırında **Done** yazar.
- **Message** bölümünden kuyularda bir problem olup olmadığı kontrol edilir. Problem var ise o kuyulara ekim yapılmadan diğer kuyular ile deneye devam edilir.
- Plate dikkatli bir şekilde cihazdan çıkarılır. **Message** bölümünden kontrol edilir.



- Plate kabin içine alınarak kuyulara 100 ul hücre ekimi yapılır. (Kuyularda 100 ul medium + 100 ul hücreli medium = 200 ul. medium olacaktır.)
- Hücrelerin oturması için plate kabin içerisinde 30 dk bekletilir. (Bekleme süresi tam 30 dk olmalıdır!)
- Bilgisayarda **Schedule** bölümünde sağ tıklanır ve **Add a Step** tıklanarak ikinci adım eklenir. Bu adımda toplam deney süresi (rn. 120 saat) ve ölçüm aralığı (rn. 15 dk) belirlenir ve **Apply** tıklanır.
- 30 dk'lık bekleme sresinden sonra plate dikkatli bir Şekilde cihaza yerleştirilir. Message bölümü kontrol edilir.
- Deney Play tuŐu tıklanarak başlatılır. **Schedule** bölümünde deney satırında **Test** yazmalıdır. **Message** bölümü tekrar kontrol edilir.
- **Plot** bölümünde sağda yer alan kuyular seçilir ve **Add** tıklanır bu sayede seçilen kuyuların grafikleri izlenebilir.

**Hücre ekimi yapıldıktan 24 saat sonra sitotoksinite testi için ilaç uygulaması yapılır. (Hücre tipine göre bu saat değişebilir, kontrol edilmelidir. İlaç uygulaması logaritmik faz sonunda yapılır.)

İlaç uygulama

- Uygulanacak ilaç konsantrasyonları hazırlanır.
- Programda sol üstteki **Pause** tuŐu tıklanarak deney durdurulur. **Message** bölümü kontrol edilir.
- Plate cihazdan dikkatli bir Şekilde çıkarılır ve kabin içine alınır. Kuyulardan tabanlarına değmeden 100 ul besiyeri çekilip atılır. Kuyuda kalan 100 ul besiyeri üzerine 100 ul ilaç konsantrasyonları eklenir (kontrol kuyusu için besiyeri eklenir). Hafif bir Şekilde 1-2 kez pipetaj yapılır.
- Plate dikkatli bir Şekilde cihaza yerleştirilir.
- **Play** tuşuna basılarak deney devam ettirilir. **Message** bölümü kontrol edilir. (Bu aşama 5 dk içinde tamamlanmalıdır!).
- Belirlenen zaman sonunda deney bitecek ve otomatik olarak kaydedilecektir. Daha erken sonlandırılmak isteniyorsa **Pause** tıklanarak deney durdurulur ve manuel olarak kayıt yapılabilir. Her iki durumda da **Message** bölümü kontrol edilmelidir.



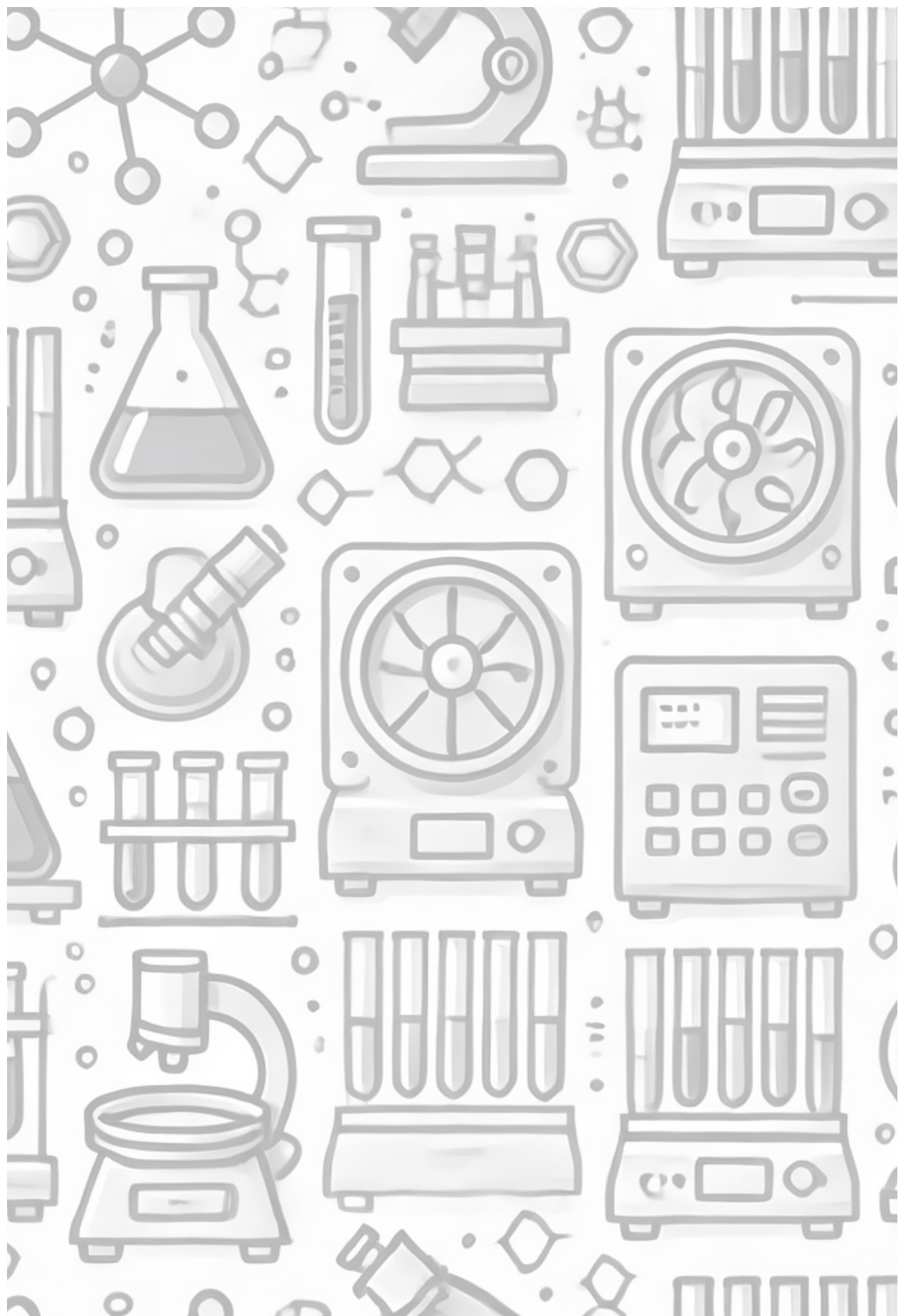
- Deneý tamamlandığında plate cihazdan çıkarılır ve program kapatılır.

Veri analizi

- **Plot:** sekmesi tıklanır. Kuyular seçilir ve **Add** tuşuna basılarak istenen kuyuya ait grafik eklenir. Bu aşamada bütün grafikler seçilerek ortalama (**Average**) alınır ve **STD DEV** standart sapma tıklanarak standart sapmayı gösteren grafik elde edilebilir.
- **Cell index:** sekmesi tıklanır. Time sekmesi tıklanır. Cihazın hangi saatlerde kaç hücre saydığını görebiliriz.

**Hücre proliferasyon ölçümü için en iyi hücre miktarı tayin edilirken; hücrelerin 24 saate en yakın zamanda log fazına geçen miktarı baz alınır. Bu belirlenen hücre miktarı sitotoksisite testi için kuyulara konacak hücre sayısını belirler.

- **Layout:** Bu sekme tıklanarak hangi kuyularda ne olduğunu görebiliriz.
- Data analizi için **Plot** bölümünde tekrar kuyuları ikili olarak incelenir ve sapma olup olmadığı kontrol edilir. Sapan kuyular çıkarılmalıdır. IC₅₀ hesaplanması için kontrol kuyuları da çıkarılmalıdır (ilaç eklenmemiş).
- Analizin yapılacağı kuyuların ortalamasını almak için kuyular seçilir ve **Average** tıklanır.
- Hesaplamadaki farklılıkları ortadan kaldırmak için; sağda bulunan **y axis normalize cell index** seçilir. Grafikte sol üst köşede yer alan siyah çubuk sağa doğru çekilerek ilaç uygulanan saate getirilir. Böylece grafikteki sapmalar düzeltilir.
- **Time** sekmesi tıklanarak saatlik ölçüm alınabilir. En solda grafik üzerinde yer alan kırmızı ok, ölçüm istenilen saate getirilerek ölçüm yapılabilir.
- Analiz için sol alttan **DRC IC₅₀ at a time point US COC** seçilir.
- **Data Analysis** bölümünde sol üst köşedeki tik tıklanır ve seçilen kuyular ve zaman aralığı için IC₅₀ grafiği ve değeri elde edilir.
- **Plot** bölümünden zaman aralığı değiştirilerek **Data Analysis** bölümüne yeni grafikler sol üstteki artı ve eksi tıklanarak eklenebilir.
- Ölçüm sonucunu almak için solda bulunan **Plate** sekmesi tıklanır. **Export Data** seçilir ve istenilen ölçüm sonuçları alınır.



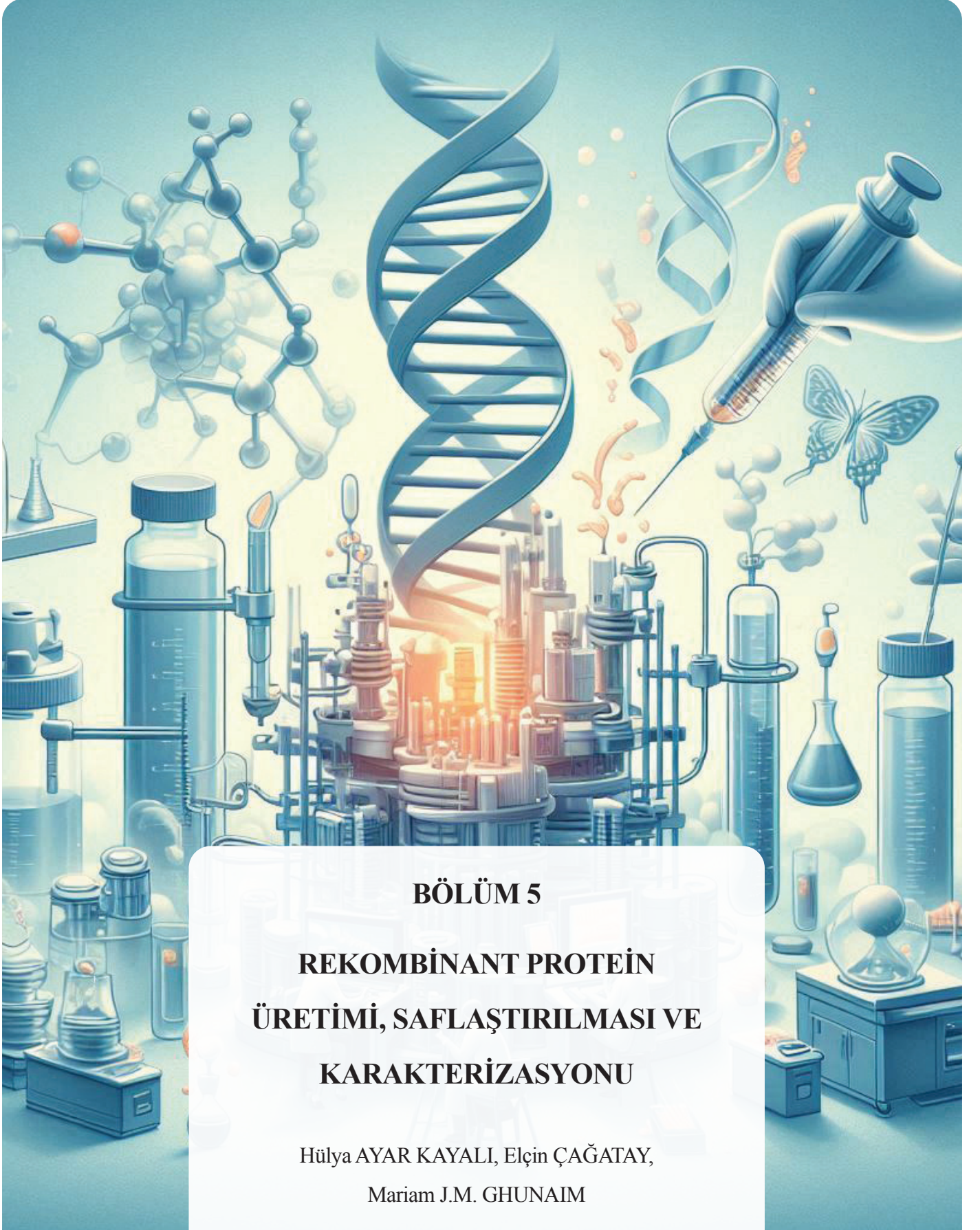
Video için
QR kodu okutunuz.



Rekombinat Protein
Üretimi - 1



Rekombinat Protein
Üretimi - 2



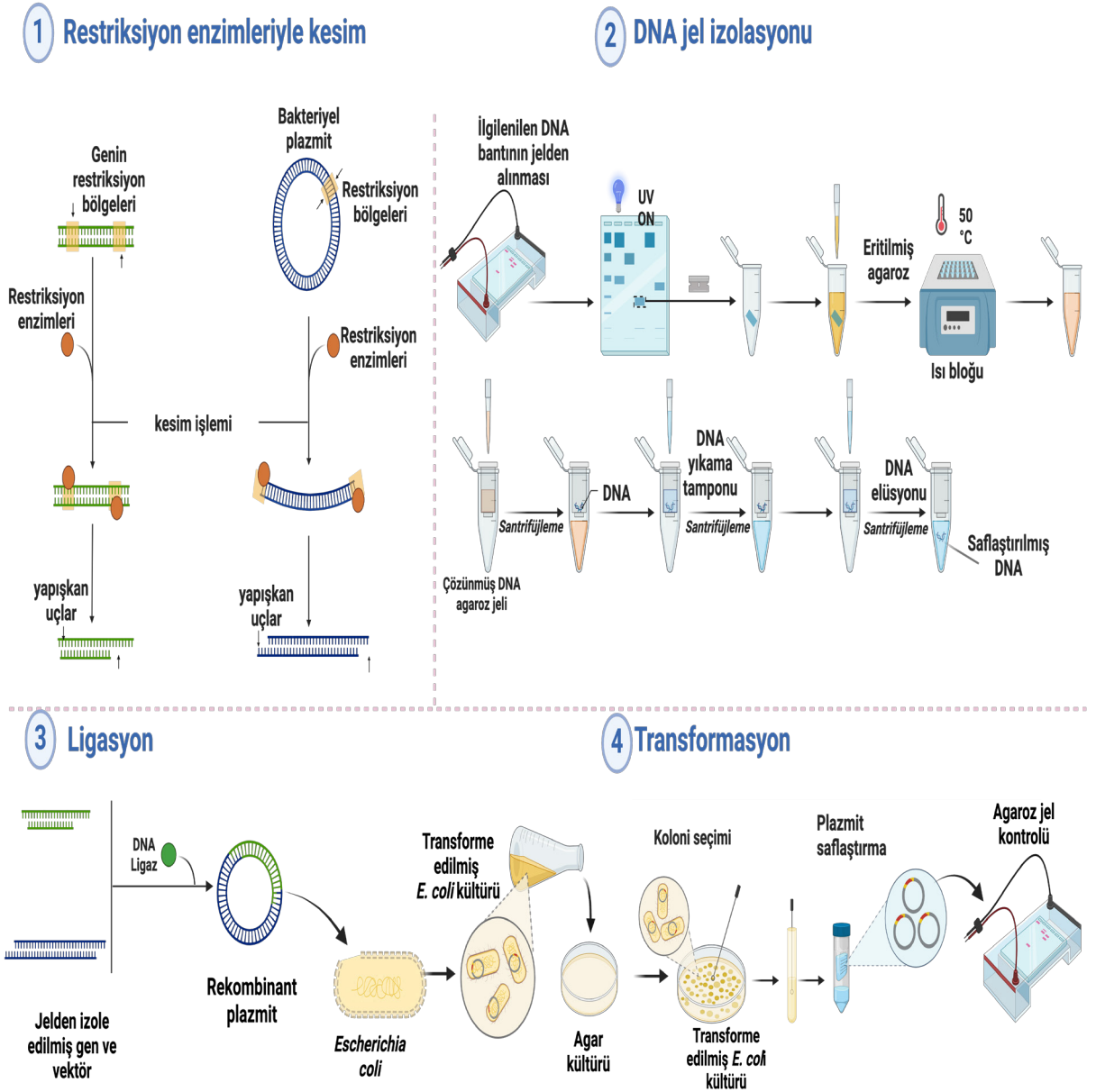
BÖLÜM 5

REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Hülya AYAR KAYALI, Elçin ÇAĞATAY,
Mariam J.M. GHUNAIM

1. KONU

Rekombinant protein üretim prosedürleri, istenen genin uygun bir vektöre klonlanması, ardından konak hücreye dönüştürülmesi ve dönüştürülmüş hücre kolonisinin seçilmesi dahil olmak üzere birden fazla adımı içerir (Şekil 1). Ek olarak, rekombinant proteinin karakterizasyonu için western blot analizi kullanılır (Şekil 2).



Şekil 1. Rekombinant protein üretim aşamaları: klonlama ve transformasyon



2. AMAÇ

İlaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında rekombinant protein üretim yöntemleri hakkında detaylı bilgi sunmak amaçlanmıştır.

3. UYGULAMA

REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİM YÖNTEMİ

Klonlama

1. Uygun miktardaki gen ilgili restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra boş vektöre aktarılır. Kesme reaksiyonunu gerçekleştirirken DNA'ların nanodrop değerlerini göz önünde bulundurulur. Kesme koşulları kullanılan enzime bağılı olarak değişir. Bu nedenle inkübasyon süresi ve sıcaklık gibi parametreler seçilen enzimlere göre planlanmalıdır.

2. Kesme reaksiyonu tamamlanmadan yaklaşık yarım saat önce %0,6-1'lik agaroz jel dökülür. 1'lik agaroz jel için 1 g agaroz tartılır ve 100 ml TBE tamponunda çözülür. Küçük bir agaroz tankı kullanılıyorsa, %1'lik bir jel için 0,5 g agaroz tartılabilir ve 50 ml TBE içinde çözülebilir.

a. 500 ml 5X TBE tamponunun hazırlanması: 27 g Tris bazı, 13,75 g borik asit ve 10 ml 0,5M EDTA'yı (pH 8) 450 ml damıtılmış suda çözülür. Çözündükten sonra 500 ml' ye tamamlanır.

3. Kesim reaksiyonu tamamlandıktan sonra kesilmemiş numune ve kesilmiş numunenin tamamı yükleme boyası ile agaroz jele yüklenir.

4. Jel İzolasyonu: İlk olarak, iki ependorf tüpünün ağırlıklarını tartılır ve kaydedilir. Jeli, jel görüntüleme cihazına yerleştirmeden önce UV transillüminatör üzerinde kesilir. Bu aşamada UV maruziyetini en aza indirmek çok önemlidir. Genin uzunluğuna karşılık gelen bant genin yerleştirildiği kuyudan, vektörün uzunluğuna karşılık gelen bant ise vektörün yerleştirildiği kuyudan kesilir. Kesilen bantlar daha sonra önceden tartılmış tüplere yerleştirilir. İsteğe bağılı olarak, kesildikten sonra jelin bir görüntüsü alınabilir. Jel izolasyon kitinin talimatları izlenerek, DNA daha sonra kullanılmak üzere jelden izole edilir. İzole edilen gen ve boş vektör bir nanodrop kullanılarak ölçülür.



5. Ligasyon: Ligasyon reaksiyonu için gen ve vektör uzunluklarının bilinmesi gerekir.

Reaksiyon koşulları enzim ve gene bağımlı değişim gösterir. Reaksiyonun tamamlanmasından sonra elde edilen plazmidin bakteriye transformasyonu gerçekleştirilir ve çoğaltılır.

Transformasyon

1. Hazırlık aşamasında su banyosu 42°C' ye, inkübatörler 37°C' ye ayarlanır.
2. Transformasyon için hazır olan ve -80°C' de saklanan TOP10 bakterileri çıkarılır ve hemen buz üzerine yerleştirilir. 50 µL hücrelere 1 pg ila 100 ng arasında değişen konsantrasyonlarda DNA eklenir, homojen bir ortamın oluşturulması için vortekslenir ve 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilir.
3. Tüp 30 saniye boyunca su banyosunda tutulur, ardından hemen buz üzerine yerleştirilir ve 5 dakika bekletilir.
4. Tüpe tercihen SOB veya LB besiyeri eklenir, 250 rpm'de 37°C'de 1 saat boyunca çalkalanır.
5. Hazırlanan LB-Agar ve seleksiyon antibiyotiği içeren petri kaplarına, isteğe bağlı olarak 1/10 LB içinde seyreltilmiş 50-100 µL bakteri inoküle edilir. Petri kapları gece boyunca 37°C'de inkübe edilir ve daha sonra koloniler seçim işleminde gerçekleştirilir.

Koloni seçimi

Not: Negatif kontrollerde ligasyon petrisinde olduğu kadar çok koloni varsa, transformasyonun tekrarlanması önerilir. Eklenmesi yapılacak DNA' nın olmadığı koşullarda, bazen çok az sayıda koloni ortaya çıkabilir. Bu durumda koloni seçimine devam edilebilir.

1. Seleksiyon antibiyotiği 1:1000 oranında LB Broth'a eklenir. İzole edilen tek kolonilerden 2-3 koloni seçilerek bir pipet ucuyla alınır ve hazırlanan besiyerine eklenir.
2. Gece boyunca 37°C ve 225 rpm'de inkübe edilir (veya duruma bağlı olarak en az 6 saat).
3. Plazmiden belirlenen sayıda gliserol stoğu elde edildikten sonra bakteriler çöktürülür ve DNA miniprep kitinin talimatlarına göre izole edilir. Safılaştırılan genetik materyal agaroz jel ile kontrol edilir.



Agaroz jel kontrolü: Klonlama aşamasında kullanılan kesim enzimleri kullanılarak plazmid için bir kesim reaksiyonu ayarlanır. Kesilen ve kesilmeyen plazmidler agaroz jelde sabit voltajda yürütülür. Görüntüleme cihazından elde edilen jel görüntüsünde genin varlığı teyit edilir. Tercih edilen koloni ile büyük ölçekli DNA üretimine geçilebilir.

Rekombinant protein üretimi

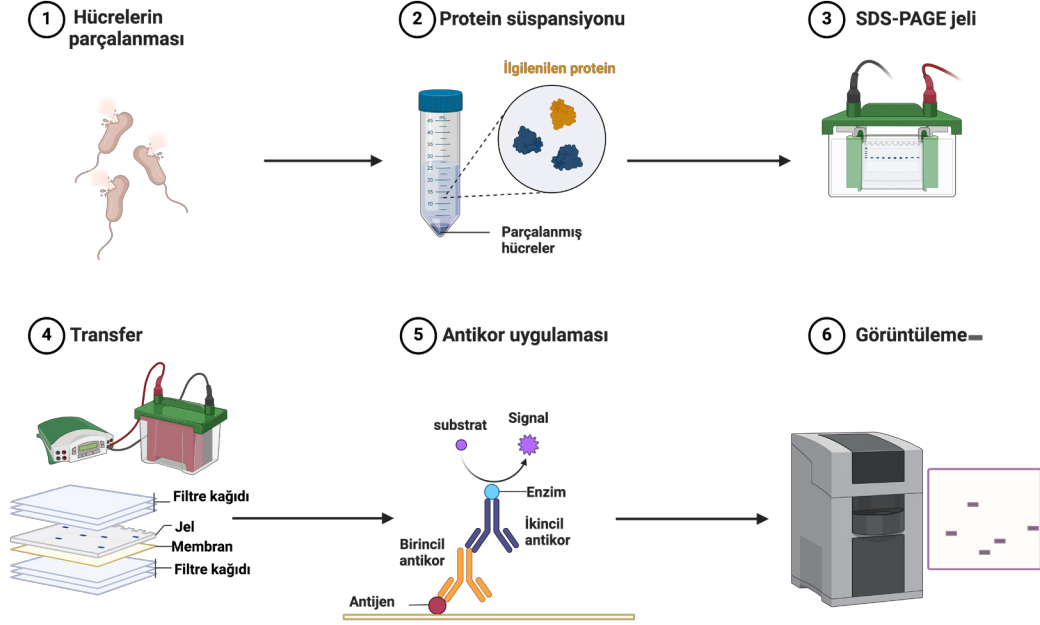
1. Hücre kültürünün hazırlanması: Rekombinant plazmid içeren *E. coli* hücreleri uygun bir kültür ortamında (örneğin LB broth) 37°C'de 180-250 rpm'de çalkalanarak büyütülmelidir.
2. Optik yoğunluk (OD) 600' deki hücre yoğunluğu 0,6 - 0,8'e ulaştığında, indüksiyon, konak sistemin özel gereksinimlerine bağlı olarak 0,1-1 mM nihai konsantrasyonda izopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid (IPTG) gibi bir indükleyicinin eklenmesiyle başlatılır.
3. Daha sonra indüklenmesi gerçekleştirilen hücreler, protein verimini en üst düzeye çıkarmak için belirli bir süre (18-24 saat), çalkalama (180-250 rpm) ve sıcaklıkta (20 - 37 °C) inkübe edilir.

Protein ekstraksiyonu ve saflaştırma

Protein üretiminin ardından, hücre parçalanması ve protein ekstraksiyonu yapılmalıdır.

1. Biyokütleyi elde etmek için öncelikle hücreler toplanır ve oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 3000 x g'de santrifüjlenir. Santrifüj koşulları, konak hücre tipine ve üretilen protein türlerine bağlı olarak optimize edilebilir.
2. Hücreleri parçalamak ve hücre proteinlerini serbest bırakmak için sonikasyon, lizozim aracılığı ile gerçekleştirilen enzimatik parçalama veya mekanik parçalama gibi uygun bir parçalama tekniği kullanılmalıdır. Örneğin, hasat edilen hücre peleti uygun bir lizis tamponunda yeniden süspanse edilip, ardından 3-5 tekrar sonikasyon uygulamasına tabi tutulur. Sonikasyon uygulaması, 30 saniyelik sonikasyonun ardından numunenin soğumasına izin vermek için 30 saniyelik bir dinlenme döngülerinden oluşmaktadır.
3. Daha sonra, meydana gelen protein karışımından istenen proteinin saflaştırılması, afinite kromatografisi, iyon değişimi ve boyut dışlama kromatografisi gibi kromatografi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Western blot



Şekil 2. Western blot analizi

Homojenizasyon

Ana tüpten 10 µl protein alınır ve 40 µl PBS ile seyreltilir. Seyreltilmiş protein 50 µl RIPA karışımı ile karıştırılır:

RIPA çözeltisi

10 µl PMSF

10 µl Sodyum Ortovanodat

10-20µl RIPA hazırlamak için 1X RIPA Lizis tamponunun ml'si başına Proteaz İnhibitörü kokteyli eklenir.

% 80 amplitütte, proteinler 1 dakika açma / kapama döngüsü, toplam 5 döngü için sonike edilir ve 20 dakika buz üzerinde inkübe edilir. Homojenize edilen örnek 10.000 g' de 20 dakika santrifüj edilir. Protein miktarı BCA kullanılarak ölçülür.



SDS-PAGE

%10 Jel	Toplayıcı Jel	Yürütme Tamponu (1x)
%40 Akrilamid	%40 Akrilamid	
1.5 M Tris HCl pH 8.8	0.5 M Tris HCl pH 8.8	25 mM Tris
%20 SDS	%20 SDS	192 mM Glisin
%10 APS and TEMED	%10 APS and TEMED	%0.1 SDS (w/v) çözeltisi

- %10' luk SDS jeli hazırlanır.
- Örnekler 4X yükleme boyası ile karıştırılır, 90°C' de 10 dakika inkübe edilir ve jele yüklenir.
- Jel, toplayıcı jelini geçene kadar sabit voltajda elektrik akımı uygulanır, ardından protein bantları birbirinden net bir şekilde ayrılanaya kadar voltaj yükseltılarak jelin yürütülmesine devam edilir.

Transfer

Transfer Çözeltisi (1L)	PorcEAU S: Stok çözelti	Blocking solution
48 mM Tris-5,8 g 39 mM glycine -2,92 g %20 methanol (w/v)-200 ml dH ₂ O-500ml Adjust to 1L	%30 TCA %2 PorcEAU S, %30 sulfosalisilik asit içerisinde çözünür.	TBST içinde %5 Yağısız Süt taze hazırlanmalı, en az 20 dakika karıştırılmalıdır.



- Çalıştırma aşamasından sonra proteinler PVDF membranlara aktarılır.
- Protein transferi için 1X Transfer Tamponu hazırlanmış ve sandviç yönteminde kullanılan tüm malzemeler transfer tamponu ile etkileştirilir.
- Protein transferi için sandviç yöntemi şu şekilde açıklanabilir; transfer için kaset açılır ve kasetin siyah yüzeyi alt kısma yerleştirilir. Transfer tamponu ile etkileştirilmiş süngerler siyah yüzeyin üzerine serilmiş ve kurutma kağıtları da süngerin üzerine yerleştirilir. SDS-PAGE jeli çalışma tankından alınarak transfer kasetinin üzerine kurutma kağıtlarının üzerine yerleştirilir. Ardından jelin üzerine PVDF membran yerleştirilir ve daha önce belirtildiği gibi kurutma kağıtları ve sünger sırasıyla yerleştirilir, kaset kapatılır ve transfer tankına yerleştirilir. Kasetin siyah yüzeyine jel, diğer yüzeyine membran gelecek şekilde yerleştirme yapılır.

Not: Süngerler ve filtre membranı transfer tamponuyla, PVDF membran MeOH ile aktive edilmelidir.

- Transfer tamponu ile doldurmuş olan transfer tankı ve tank +4 °C buzdolabındaki manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilir. Manyetik balık ve buz aküsü tankın içine yerleştirilir. Sistem 250 mA'de 2 saat ya da 20V gece boyunca çalıştırılır.
- Opsiyonel: Antikorları uygulamadan önce protein bantlarını görmek için membran Ponceau S ile boyanabilir.

Bloklama – Primer – Sekonder antikor uygulaması

- Membranlar TBST içinde hazırlanan %5 yağsız süt tozu ile 1 saat süreyle oda sıcaklığında rotatörde bloke edilir.

Not: Yağsız süt taze olarak hazırlanmalıdır.

- Antikor uygulamasından önce her bir kuyunun çizgileri dikey olarak kesilir.
- Primer antikorlarla 1 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayarak inkübe edilir. Gece boyunca +4°C' de inkübe edilir. Antikorlar %5 yağsız süt tozu içinde kullanıma uygun konsantrasyonlarda seyreltilir.
- 1X TBST ile 3 kez yıkama yapılır.
- İkincil antikorlar kullanıma uygun konsantrasyonlarda seyreltilir ve membranlara eklenir ve bu antikorların bağlanması için membran ile inkübe edilir.



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

- 1X TBST ile 3 kez yıkanır yapılır.
- Bantlar Görüntüleme Cihazında görüntülenir.



1. KONU

Omiklerle ilgili veritabanlarına nasıl erişileceğini ve kullanılacağı uygulamalı olarak gösterilecektir. UniProt'tan veri almaya odaklanılacaktır. Bu doküman öğretici, jupyter notebook ortamlarında çalıştırılmak üzere tasarlanmıştır ve Python kodunu çalıştırmayı içeren alıştırmalar içermektedir. 🐍💻

Not defterinin etkileşimli bulut sürümüne buradan erişebilirsiniz.

(https://colab.research.google.com/github/nunososorio/bhs/blob/main/NSO_PracticalClass__II.i.pynb).

2. AMAÇ

Omik verinin pratik keşfine ve ilaç geliştirmedeki önemli rolü belirlenecektir.

Omik kimyasallar 🧬

Omik, biyolojide genomik, proteomik ve metabolomik gibi disiplinleri kapsayan bütünleştirici bir çalışma alanıdır. Omiklerin amacı, bir organizmanın yapısı, işlevi ve dinamikleri hakkında bütünsel bir görünüm sağlayarak biyolojik molekül havuzlarını toplu olarak karakterize etmek ve nicelleştirmektir.

İlaç geliştirmede 🏠 omik

İlaç geliştirmede, omik teknolojileri hastalıkların moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu moleküler düzeydeki anlayış, potansiyel ilaç hedeflerinin belirlenmesine ve etkili terapötik ajanların geliştirilmesine yardımcı olur.

Omik araştırmalarında 📁 veritabanları

Biyoinformatik veri tabanları, omik araştırmalarında temel kaynaklardır. [Ensembl](#) veya [UniProt](#) gibi bu veritabanları ve diğerleri çok sayıda omik veri depolar. Bu verilere erişmek ve analiz etmek, ilaç keşfi ve geliştirilmesinde kritik bir adımdır.

Veritabanlarına programlı erişim 🖥️

Büyük ölçekli ve tekrarlanabilir analizler için, bu veritabanlarına programlı erişim genellikle web arayüzleri aracılığıyla manuel veri alımından daha verimlidir. Python, popüler bir dil olarak başlıca ilaç araştırmalarında kullanılır. Biyoinformatik, bu amaca yardımcı olmak için çeşitli



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

yollar sunar. 🐍

Eğitimin ilerleyen b6l6mlerinde, UniProt'a erişmek ve verileri analiz etmek için Python'un nasıl kullanılacağını daha derinlemesine inceleyeceğiz.



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

3. UYGULAMA

Bu eğitimin sonraki b6l6mlerinde, UniProt'a erişmek ve verileri analiz etmek için Python'un nasıl kullanılacağını daha derinlemesine inceleyeceğiz.

UniProt web aray6z6

Zarif ve işlevsel bir tasarıma sahip olan [UniProt web sitesini](#) ziyaret ederek başlayın.

"CFTR" için bir arama başlatın ve g6r6nen ilk sonucu seçin. Bu proteinin UniProt ID'sinin **P13569** olduğunu g6receksiniz.

Sayfayı aşağı kaydırdıka, protein hakkında birkaç değerli bilgi katmanıyla karşılaşacaksınız. Mevcut 6zellikleri keşfetmek için zaman ayırın. Sayfanın sonuna ulaştığınızda, protein dizisini ve FASTA formatında indirmek için bir d6đme bulacaksınız.

FATA, biyoinformatikte diziler için yaygın olarak kullanılan bir formattır ve geniş bir analiz yelpazesine hizmet eder.

Python kullanarak UniProt'a erişme

Protein dizilerini bir web tarayıcısı ve aray6z6 aracılığıyla almak zaman alıcı olabilir ve 6zellikle birden fazla proteinle uğraşırken tekrarlanabilirlikten yoksun olabilir.

Python, BioPython'un SeqIO'su gibi k6t6phanelerle birlikte bu s6reci kolaylaştırmak için kullanılabilir.

İlk adımlar, gerekli kitaplıkları kurmayı, bunları komut dosyanıza aktarmayı ve protein dizilerini getirmek için bir işlev tanımlamayı içerir.



!pip install biopython içe aktarma
istekleri

Bio import SeqIO'dan

from tempfile import NamedTemporaryFile import os

Def sequence_for_uniprot_id(uniprot_id):

```
r = requests.get(f"https://www.uniprot.org/uniprot/{uniprot_id}.fasta") r.raise_for_status()
```

```
NamedTemporaryFile(suffix=".fasta", mode="w", delete=False) ile tmp olarak: tmp.write(r.text)
```

```
sequence = SeqIO.read(tmp.name, format = "fasta")  
os.remove(tmp.name)
```

Dönüş sırası

```
# Artık UniProt ID'leri ile herhangi bir protein listesinin dizisini alabilirsiniz uniprot_ids =  
["P13569","Q2IBA1","P35071","Q07DX5","Q2IBE4"]
```

uniprot_ids'daki uniprot_id için:

```
sequence = sequence_for_uniprot_id(uniprot_id) print(f"UniProt ID:  
{uniprot_id}") print(f"Açıklama: {sequence.description}")  
print(f"Sequence: {sequence.seq}\n")
```

Vaka bazlı egzersiz: Protein dizisi karşılaştırması

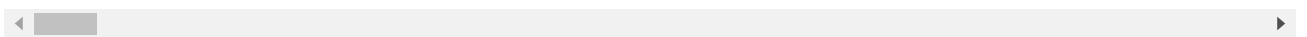
Bu alıştırmada, iki kistik fibroz hastasının protein dizilerini karşılaştıracaksınız. Bu hastalardan alınan klinik örnekler dizilendi ve CFTR proteininin protein dizileri elde edildi.

Hasta Detayları

- **Hasta 1:** 3 yaşında kistik fibrozis tanısı alan 28 yaşında bir erkek.

>p1_CFTR

MQRSPLEKASVVS KLFFSWTRPILRKG YRQRLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLERKWDRELAS
KKNPKLINALR

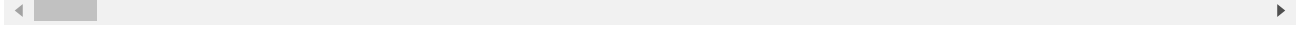


- **Hasta 2:** Geç ergenlik döneminde kistik fibroz tanısı alan 32 yaşında bir kadın.



>p2_CFTR

MQRSPLEKASVVS KLFFSWTRPILRKG YRQRLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDRELAS
KKNPKLINALR



Görev:

1. CFTR proteininin (UniProt ID P13569) "referans" FASTA dizisini alın.
2. P13569'lu hastalardan alınan CFTR proteinlerinin iki dizisini karşılaştırmak için ikili hizalamalar yapın.
3. Hizalama sonuçlarına dayanarak, Ivacaftor'un hangi hastada CFTR'nin işlevini iyileştirme olasılığının daha yüksek olup olmadığı konusunda spekülasyon yapın?

Ivacaftor'un aşağıdaki amino asit ikameleri ile kullanım için onaylandığını düşünün:

E56K	G178R	S549R	K1060T	G1244E
P67L	E193K	G551D	A1067T	S1251N
R74W	L206W	G551S	G1069R	S1255P
D110E	R347H	D579G	R1070Q	D1270N
D110H	R352Q	S945L	R1070W	G1349D
R117C	A455E	S977F	F1074L	
R117H	S549N	F1052V	D1152H	

Daha fazla bilgi için [buraya tıklayın](#)

Lütfen kodunuzu aşağıdaki hücreye yazınız.

Yasal Uyarı: Lütfen bunun yalnızca eğitim amaçlı tasarlanmış bir öğretim alıştırması olduğunu unutmayın. Bu alıştırmadan elde edilen sonuçlar ve yorumlar, gerçek dünyadaki klinik karar verme veya tanı için kullanılmamalıdır.

İçe Aktarma İstekleri

Bio import SeqIO

tempfile import NamedTemporaryFile importos

Bio import pairwise2

Bio.pairwise2 import format_alignment



```
def sequence_for_uniprot_id(uniprot_id):
```

```
    r = requests.get(f"https://www.uniprot.org/uniprot/{uniprot_id}.fasta") r.raise_for_status()
```

```
    NamedTemporaryFile(suffix=".fasta", mode="w", delete=False) ile tmp olarak: tmp.write(r.text)
```

```
    sequence = SeqIO.read(tmp.name, format = "fasta")  
    os.remove(tmp.name)
```

```
    dönüş sırası #
```

```
    Dizileri al
```

```
seq0 = sequence_for_uniprot_id("P13569")
```

```
seq1 =
```

```
"MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKG YRQRLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLERKWDRELASKKN  
PKLINAL
```

```
seq2 =
```

```
"MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKG YRQRLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDRELASKKN  
PKLINAL
```

```
# İkili hizalamalar gerçekleştirin
```

```
hizalamalar1 = pairwise2.align.globalxx(seq0.seq, seq1) alignments2 =  
pairwise2.align.globalxx(seq0.seq, seq2)
```

```
# İlgilenilen amino asit pozisyonlarının listesi
```

```
positions_of_interest = [56, 178, 549, 1060, 1244, 67, 193, 551, 1067, 1251, 74,
```

```
# Listeyi sıralayın positions_of_interest.sort()
```

```
# İlgilenilen amino asitleri yazdırma işlevi
```

```
def print_amino_acids_of_interest(hizalama, positions_of_interest): for i in  
    range(len(alignment[0])):
```

```
        positions_of_interest:
```

```
            print(f"Position: {i}, Ref: {alignment[0][i]}, Hasta: {alignment[1]
```



```
# Hasta 1'den sekans için hizalamada ilgilenilen pozisyonları yazdırın  
print_amino_acids_of_interest(alignments1[0], positions_of_interest)
```

```
# Hasta 2'den sekans için hizalamada ilgilenilen pozisyonları yazdırın  
print_amino_acids_of_interest(alignments2[0], positions_of_interest)
```

```
# Hasta 1 hizalamalarından1 dizi için tüm aligmentleri inceleyin.
```

Sonuç

Eğitimi tamamladığınız için tebrikler! 🎉 Python kullanarak UniProt veritabanına nasıl erişeceğinizi öğrendiniz. Ayrıca biyoinformatik ve farmakogenomik ile ilgili basit bir aminoasit dizi analizi yaptınız.

Bu konuları pratik yapmaya ve keşfetmeye devam edin. Keşfedilmeyi bekleyen çok sayıda bilgi var ! 🚀

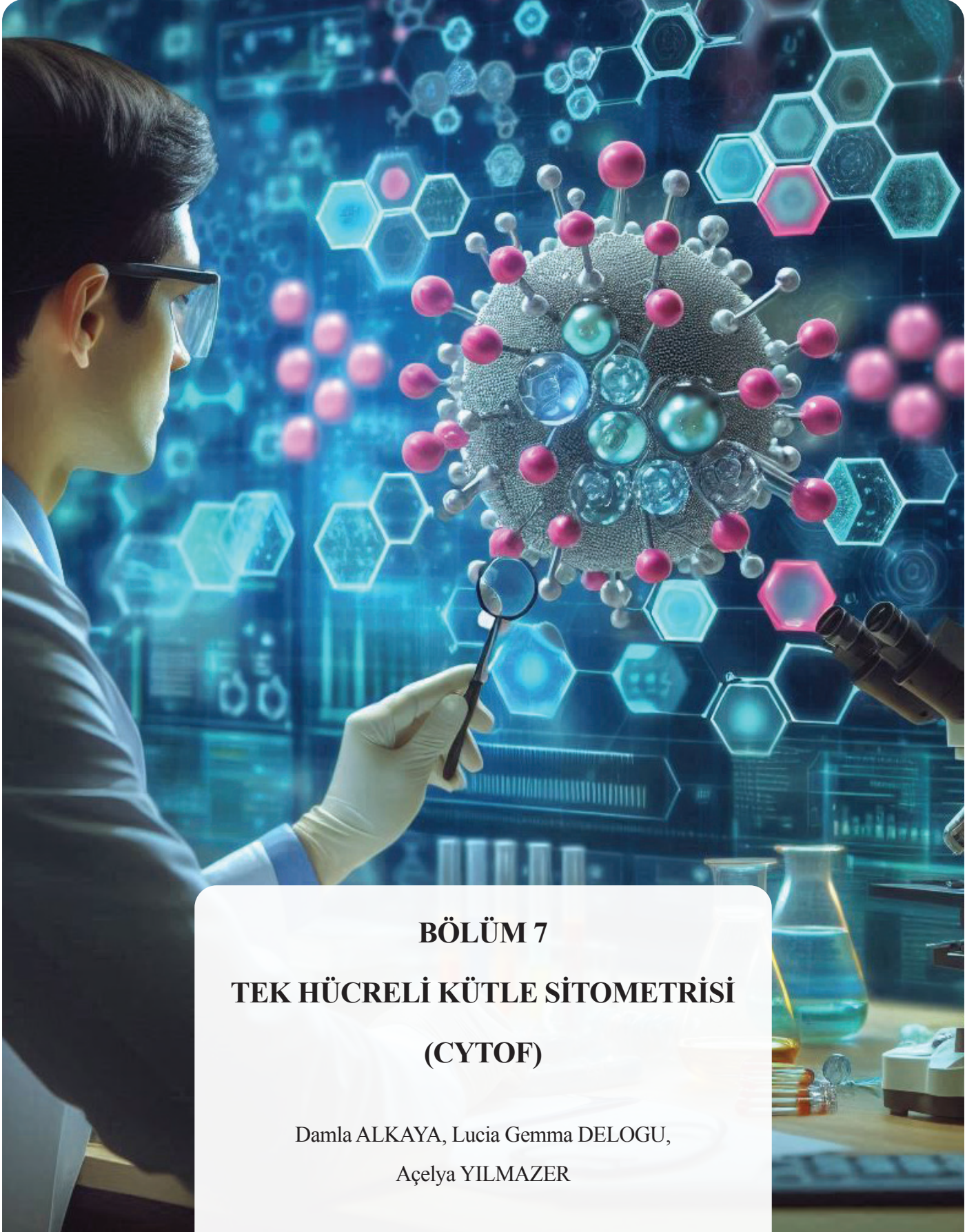
📁 Ödül

1. Ivacaftor'un etki mekanizması ve kistik fibrozun moleküler temeli nedir?
2. Hasta 2 de Ivacaftor'dan yararlanabilir mi? Eğer öyleyse, hangi koşullar altında? Hastalığının en olası genetik temeli ne olurdu?
3. Hastalardan gelen dizileri araştırmak için başka hangi gelişmiş hizalama araçlarını kullanabilirsiniz?
4. UniProt'tan hangi yararlı bilgileri alabilirsiniz?
5. Tanı yaşı her iki hastada da hastalığın ilerlemesini ve tedavisini potansiyel olarak nasıl etkiler?
6. Genomik ve genetik mühendisliğindeki gelecekteki gelişmeler nasıl etkileyebilir?

Video için
QR kodu okutunuz.



CytoF



BÖLÜM 7
TEK HÜCRELİ KÜTLE SİTOMETRİSİ
(CYTOF)

Damla ALKAYA, Lucia Gemma DELOGU,
Açelya YILMAZER



1. KONU

İlaç araştırma gelişme çalışmalarında yenilikçi yöntemlerden biri olan, Tek hücreli kütle sitometrisi (CyTOF), CyTOF analizi yapmak için kullanabileceğimiz protokol konuları hakkında bilgi verilecek olup ImmuneNano-Lab'da CyTOF ile uygulama örneği sunulacaktır.

2. AMAÇ

Tek hücreli Kütle sitometrisi, antikorların florokromlar yerine ağır metal iyon etiketleri ile etiketlendiği bir akış sitometrisi varyasyonudur. Kütle sitometrisinin akış sitometrisine kıyasla temel avantajı, her metal izotopunun ayrı bir algılama zirvesine sahip olması ve diğer metal izotoplarıyla örtüşmemesi nedeniyle neredeyse hiç arka plan gürültüsü olmamasıdır. Bu gürültü eksikliği nedeniyle, tek bir hücreden aynı anda 40'tan fazla işaretleyiciyi tespit edilebilir. Dahası,

Cihazda, metal etiketli antikorlarla boyanan hücreler, tek hücreli damlacıklara nebulize edilir ve kütle spektrometresinde tam iyonizasyon için hazırlanır.

Elde edilen iyon bulutu, bir dörtlü kutup kullanılarak ağır metal iyonları için zenginleştirilir.

Bunlar daha sonra bir **uçuş süresi** odasında/spektrometresinde kütle-yük oranlarına göre ayrılır ve tespit edilir.

Her izotop için iyon sayıları, karşılık gelen hedeflerinin ifadesini doğrudan yansıtır.

Bu kapsamda bu bölüm CyTOF uygulama ve analiz hakkında bilgi sunmayı amaçlamaktadır.

3. UYGULAMA

Bir CyTOF deneyinin tipik bir iş akışında sekiz temel adım vardır:

Örnek hazırlama

İlk adım, numune hazırlamayı içerir. İlgilenilen hücreler, dokulardan ve hücre kültürlerinden dikkatlice toplanır veya periferik kan mononükleer hücreleri söz konusu olduğunda periferik kandan izole edilir.



Canlı ölü boyama

Mükemmel bir tek hücreli süspansiyon elde etmek, hücre canlılığını koruduğu ve topaklanmayı önlediği için çok önemlidir. Hücre canlılığını değerlendirmek için sisplatin ile bir ilk boyama adımı kullanılır ve sonraki analizde canlı ve ölü hücreler arasındaki ayrımı sağlar.

Barkodlama

Birden fazla örnek içeren deneyler için araştırmacılar barkodlamayı tercih edebilir. Bu, hücrelerin benzersiz metal izotop kombinasyonları ile etiketlenmesinden oluşur ve aynı anda analiz için numunelerin bir araya getirilmesini sağlar. Barkodlama, örneklem değişkenliğini azaltmak ve deneysel verimliliği artırmak için özellikle avantajlıdır.

Yüzey boyama

Daha sonra, bu hücreler, her biri belirli hücre yüzeyini veya hücre içi belirteçleri hedeflemek için tasarlanmış izotopik olarak saf metal etiketli antikorlarla etiketlenir. Antikor konsantrasyonlarının ve inkübasyon sürelerinin optimizasyonu, sağlam ve spesifik bağlanmayı garanti etmek için çok önemlidir.

Fiksasyon ve geçirgenlik

Etiketlemeyi takiben, örneğin paraformaldehit kullanılarak, hücrelerin doğal durumunu koruyarak ve metal etiketli antikorları hareketsiz hale getirerek fiksasyon gerçekleştirilir. Uygun bir deterjan ile sağlanan geçirgenlik, metal izotopların hücre içi bölmelere girişini kolaylaştırır.

Hücre içi boyama

Hücresel dinamiklerin kapsamlı bir şekilde anlaşılması için, hücre içi belirteçlerin saptanmasını sağlamak için hücrelerin geçirgenliğinden sonra hücre içi boyama dahil edilebilir.

DNA interkalatör boyama

Bir DNA interkalatör boyama adımının dahil edilmesi, tek tek hücrelerin enkazdan, agregalardan ve diğer tek hücreli olmayan varlıklardan ayırt edilmesinde büyük önem taşır. Öte yandan, kütle sitometrisi veri analizinde, hücreleri tanımlamak için ileri saçılma ve yan saçılma kullanılır.



Yıkama, yeniden süspansiyon ve hücre sayımı

Çeşitli boyama ve yıkama adımlarından sonra, uygun şekilde seyreltilmiş bir süspansiyon elde etmek için hücre sayımı yapılır.

Numuneler hazırlandıktan sonra CyTOF cihazı devreye girer. Etiketli ve sabit hücre süspansiyonu, indüktif olarak eşleştirilmiş plazmanın metal etiketli antikorları iyonize ettiği cihaza sokulur. Uçuş süresi kütle spektrometresi daha sonra iyonların kütle-yük oranını ölçmek için kullanılır ve tek tek hücrelerin kesin olarak tanımlanmasını ve niceliklerinin belirlenmesini kolaylaştırır. Sonraki veri toplama aşaması çok önemlidir ve her hücre için yüksek boyutlu verileri yakalar. Metal izotoplarının yoğunluğu kaydedilir ve aşağı akış yüksek boyutlu analizler için temel oluşturan kapsamlı bir profil oluşturulur.

CYTOF uygulama örneği

Geçiş metali karbürleri, nitrürler ve karbonitrürler, MXenes, biyomedikal uygulamalar için umut verici iki boyutlu malzemelerdir. Bununla birlikte, tek numunelerden yüksek derecede bilgi araştırırken, tek hücreler ve dokular içindeki 2D materyalleri tespit etmek ve görüntülemek için karşılanmamış kritik bir ihtiyaç vardır.

Burada, uçuş süresine göre tek hücreli kütle sitometrisine (CyTOF) ve uçuş süresine göre iyon ışını görüntülemeye (MIBI-TOF) dayanan, lebelsiz tek hücreli bir tespit stratejisi olan LINKED'i önerilmektedir.

LINKED'de, tek hücre düzeyinde kütle sitometrisi ve görüntüleme ile doğrudan tanımlanabilen spesifik geçiş metalleri içeren MXenes tasarlandı. Bu tasarım, malzemelerin ek kimyasal işlevselleştirilmesi ihtiyacını ortadan kaldırır ve böylece yaygın görüntüleme yaklaşımlarının birçok sınırlamasının üstesinden gelmektedir. Ayrıca, ticari kütle sitometrisi etiketleri için daha önce keşfedilmemiş yeni kanallar kullanıldı.

İlk olarak, MXenes'i 15 birincil insan bağışıklık hücresi alt popülasyonunda aynı anda test edildi ve CyTOF ve görüntüleme kütle sitometrisi ile materyal alımını ve tek hücreli etkileşimleri başarıyla belirlendi.

Daha sonra, MXene hücre etkileşimi ile hücre canlılığı üzerindeki etki arasındaki olası korelasyonu değerlendirildi ve etkileşimin boyutundan bağımsız olarak materyallerin yüksek immün uyumluluğunu ortaya çıkarıldı.



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

MXenes'in sitokin ve kemokin üretimi açısından biyouyumluluğunu ve RNA dizilemesi ile tüm genom tüm genom ekspresyonu üzerindeki etkileri doğrulandı.

Farelerde MXenes karışımı kullanılarak yapılan in vivo biyodağıtım deneyleri, tespit stratejimizin çok yönlülüğünü doğruladı ve farklı organlarda ve göreceli bağışıklık hücresi alt tiplerinde MXene birikimini ortaya çıkardı. Son olarak, farklı organlardaki MXenes'i tespit etmek için MIBI-TOF uygulandı.

Sonuç olarak, biyotıpta heyecan verici yeni fırsatlar sunması beklenen nanomalzeme tespitini ve çoklu hücre ve doku özelliklerinin eşzamanlı ölçümünü sağlayan, akış süresine göre tek hücreli kütle sitometrisine ve akış süresine göre iyon ışını görüntülemeye dayanan yeni bir etiketsiz tek hücreli tespit stratejisi olan LINKED önerilmektedir.

