

**REKOMBİNANT ANTI-VEGF ÜRETİMİ VE
NANOKONJUGATININ GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Derya KARAARSLAN

Eskişehir 2017

**REKOMBİNANT ANTI-VEGF ÜRETİMİ VE
NANOKONJUGATININ GELİŞTİRİLMESİ**

DERYA KARAARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bölümü
Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Ağustos, 2017**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Derya Karaarslan'ın "Rekombinant Anti-Vegf Üretimi Ve Nanokonjugatının Geliştirilmesi" başlıklı tezi 21/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ
Üye	: Yard. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ
Üye	: Yard. Doç. Dr. Özlem BİÇEN ÜNLÜER

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

REKOMBİNANT ANTI-VEGF ÜRETİLMESİ VE NANOKONJUGATININ GELİŞTİRİLMESİ

Derya KARAARSLAN

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Bölümü
Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağustos, 2017

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin kanser metabolizmasındaki rolü literatürde ortaya konulmuş olup bu çalışmada, insan kanında da bulunan, VEGF'ye bağlanan ve iki zincirden oluşan bloklayıcı Anti-VEGF antikorunun rekombinant olarak üretilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, insan kanından total RNA izole edilmiş, buradan cDNA sentezlenmiş ve Anti-VEGF antikorunun iki zincirinin gen dizisine spesifik primerler kullanılarak PCR reaksiyonları ile anti-VEGF genleri klonlanmıştır. Daha sonra klonlanan genler yine aynı teknikle birleştirilip tek zincir haline getirilmiş ve uygun klonlama, ekspresyon plazmit vektörleri ve konakçılar ile birlikte ekspresyonu sağlanmıştır.

Çalışmanın son aşamasında, konakçı bakteriden, ağır ve hafif zincirinin birbirine bağlı olduğu rekombinant Anti-VEGF antikorunun izolasyonu ve saflaştırması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma nikel afinite kromatografisi kullanılarak sağlanmış ve Western Blot ile proteinin karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra; Anti-VEGF antikorunun, dış ortam koşullarına dayanıklılığını arttırmak için, rutenyum tabanlı aminoasit monomerleri ile fotosensitif çapraz bağlamayı sağlayan ANADOLUCA metodu kullanılarak Nano-Anti-VEGF konjugatı üretilmiştir. Bu VEGF nanobloklayıcının karakterizasyonları Zeta ile boyut analizi, SEM ile yüzey morfolojisi ve CD spektroskopisi ile sekonder yapısı incelenerek ortaya konulmuştur. Nano-Anti-VEGF'nin ilaç sektöründe, tedavi sürecinin nasıl devam ettiğini izleyebilmek amacı ile moleküler görüntüleme teknolojisi sayesinde takip edilebilirliğini sağlamak için akridin, BODIPY ve FITC gibi farklı floresans özellikteki maddeler ile konjugatı sentezlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: VEGF, Anti-VEGF antikoru, rekombinant protein, ANADOLUCA, nanobiyokonjugat

ABSTRACT

PREPARATION OF RECOMBINANT ANTI-VEGF ANTIBODY AND DEVELOPMENT OF IT'S NANOCONJUGATE

Derya KARAARSLAN

**High Technologies Department
Biotechnology Program**

Anadolu University, Graduate School of Science, August, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cancer metabolism has been pointed in literature, within this work, it has been aimed to produce the blocking Anti-VEGF antibody which is bound to VEGF, consisting of two chains and found in human blood as well, as recombinant. In this respect, total RNA has been isolated from human blood, cDNA has been synthesized by that and Anti-VEGF genes have been cloned using specific primers on gene sequence of two chains of the Anti-VEGF antibody. After that, cloned genes have reformed in one chain by the same technique and the expression has been made with the relevant cloning and expression plasmid vectors and hostcells.

In the last phase of the work, the purification and isolation of recombinant Anti-VEGF antibody of which the heavy and light chains are bound to each other have been achieved from the host bacterias. Purification and characterization of the protein have been realized by nickel affinity chromatography and the Western Blot, respectively. Then, in order to increase the durability of the Anti-VEGF antibody against outer environment circumstances, Nano-Anti-VEGF conjugate has been produced by ANADOLUCA metot which ensures photosensitive cross linking with ruthenium-based amino acid monomers. The characterizations of this nano-blocker have been exposed by investigating dimensional analysis, surface morphology and seconder structure by Zeta, SEM and CD spectroscopy, respectively. The conjugate of Nano-Anti-VEGF has been synthesized with different fluorescent substances such as acridine, BODIPY and FITC in order to observe how the course of treatment proceeds via molecular imaging technology to ensure it's traceability in pharmaceutical industry.

Keywords: VEGF, Anti-VEGF Antibody, Recombinant Protein, ANADOLUCA, nanobioconjugate

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sevgisi, deneyimleri, hayat tecrübesi ve sonsuz desteği ile her zaman yanımda olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Arzu Ersöz'e,

Tüm araştırma ve deneysel sürecim boyunca bilgi birikimi ve tecrübeleri ile beni her zaman cesaretlendiren Prof. Dr. Rıdvan Say hocama,

Tezimde çok emeği geçen, her zaman bilgisi ve desteği ile beni yönlendiren manevi danışmanım Yard. Doç. Dr. Cem Öziç'e,

Deneysel çalışmalarım sırasında, hiçbir zaman benden yardımını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Özlem Biçen Ünlüer ve Umut Çelikoğlu'na,

Benim bu güzel ekiple çalışmama aracılık eden Burak Yıldız'a, desteklerini, yardımlarını ve sevgilerini her zaman hissettiğim Halil İbrahim Akbaş, Sercan Güzel ve laboratuvarında çalışan diğer arkadaşlarıma,

Deneyler sırasında beni geri çevirmeyip, her daim bana zaman ayıran ve bilgisini paylaşmaktan asla çekinmeyen, çalışmamda en fazla desteği olan insanlardan biri olan sevgili aradaşım Murat Kaya'ya,

Geçmişte bu güzel ekibin birer parçası olan, gelecekte ise hayatımın birer parçaları olacak canım arkadaşlarım Ayça Bakır, Gözde Yavuz, Berfu Engin, Yasemin Uymaz, Fatma Yediyıldız ve Burcu Yazıcı'ya,

Hayatım boyunca, aldığım her kararda arkamda, attığım her adımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim, bana karşı her zaman fedakar ve özverili olan babam Uğur Karaarslan, annem Vildan Karaarslan, kardeşlerim Deha Karaarslan ve Faik Karaarslan'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Derya KARAARSLAN

21.08.2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

.....
Derya KARAARSLAN

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GÖRSELLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. TEORİK BİLGİ	6
2.1. VEGF ve Kanser Metastazındaki Rolü	6
2.2. Anti-VEGF	8
2.2.1. Anti-VEGF antikorunun yapısı	10
2.2.2. Anti-VEGF'nin fonksiyonu ve önemi.....	11
2.3. Rekombinant Teknolojisi.....	12
2.4. Nanokonjugat Yapılar.....	16
2.4.1. Fotosensitif amino asit monomerleriyle çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi ile biyokonjugasyon	16
2.4.2. Floresans ligandların biyokonjugasyonu	17
2.4.2.1. Akridin.....	18
2.4.2.2. BODIPY	19
2.4.2.3. FITC.....	20
2.4.3. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi	21
2.5. Amaç	21
3. MATERYAL.....	23
3.1. Kullanılan Enzimler ve Kitler	23
3.2. Kullanılan Kimyasallar	23
3.3. Biyolojik Materyaller	24
3.3.1. Kaynak	24

3.3.2. Klonlama ve protein ifade konakçları	24
3.3.3. Vektörler	25
3.4. Tamponlar ve Solüsyonlar	26
3.5. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Sarf Malzemeleri.....	27
4. YÖNTEM.....	29
4.1. Biyoinformatik Analizler	29
4.1.1. Aday genlerin tayini:	29
4.1.2. Nükleotid ve aminoasit dizisi	29
4.1.3. Primer dizilerin tasarımı;.....	30
4.2. Deneysel Yöntem	31
4.2.1. Total RNA izolasyonu.....	31
4.2.2. cDNA sentezi.....	31
4.2.3. Anti-VEGF proteinine ait genin klonlanması	31
4.2.3.1. Genin protein kodlayan bölgelerinin pcDNA3.1 vektörüne klonlanması ve E.coli'ye transformasyonu	32
4.2.4. Anti-VEGF enzimine ait proteininin E. coli'de heterolog protein olarak üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu	33
4.2.4.1. 6X-His takısı eklenen enzimlerin E.coli Rosetta ırkında heterolog üretimi ve Nikel afinite kromatografisi ile saflaştırılmaları	33
4.2.5. Nano-Anti-VEGF sentezlenmesi	34
4.2.6. Karakterizasyon çalışmaları.....	34
4.2.6.1. Boyut analizi.....	34
4.2.6.2. Yüzey morfolojisi	34
4.2.6.3. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi.....	34
4.2.7. Nano-Anti-VEGF'nin farklı floresans moleküllerle etkileştirilmesi.....	35
4.2.7.1. Akridin.....	35
4.2.7.2. BODİPY	35
4.2.7.3. FITC	35
5. BULGULAR	36
5.1. RNA İzolasyonu	36
5.2. Anti-VEGF cDNA Klonlanması	37
5.3. Anti-VEGF'nin Rekombinant Proteininin Ekspresyonu	39
5.4. SDS-Page Sonucunun Western Blot Analizi ile Doğrulanması	39

5.5. Rekombinant Anti-VEGF Proteininin Nanokonjugatının Sentezlenmesi	40
5.1.1. Zeta boyut analizi	40
5.1.2. SEM görüntülemesi	42
5.1.3. CD spektroskopisi.....	43
5.1.3.1. Rekombinant Anti-VEGF	43
5.1.3.3. Rekombinant Nano-Anti-VEGF.....	45
5.1.3.4. Ticari Nano-Anti-VEGF.....	45
5.1.4. Akridin + Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans spektrofotometresi	47
5.1.5. BODIPY + Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans spektrofotometresi	48
5.1.6. FITC + Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans spektrofotometresi	49
6. SONUÇ VE YORUM.....	50
KAYNAKÇA	53
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Bevasizumab biyobenzeri ürünlerin dünyadaki yeri.....	10
Tablo 3.1 Kullanılan enzimler ve kitler.....	23
Tablo 3.2 Kullanılan Kimyasallar.....	23
Tablo 3.3 Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar.....	26
Tablo 3.4 Kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri.....	27
Tablo 4.1 Anti-Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) geninin PCR amplifikasyonunda kullanılacak primer DNA dizileri.....	30
Tablo 4.2 PCR malzemeleri ve miktarları.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1	2012'de dünyada tahmini kanser görülme sıklığı, ölüm oranı yaygınlığı.....	2
Şekil 1.2	Tümör Anjiogenesisi.....	3
Şekil 2.1	VEGF'nin yapısı.....	6
Şekil 2.2	Reseptörlere bağlanmalarına göre VEGF çeşitleri.....	7
Şekil 2.3	VEGF'nin tümörler üzerindeki işlevi.....	8
Şekil 2.4	Antikorun yapısı.....	11
Şekil 2.5	Anti-VEGF'nin fonksiyonu.....	12
Şekil 2.6	Klonlama ve plasmid vektörleri.....	14
Şekil 2.7	bis(2-2'-bipyridyl)(MATyr)2-Ruthenium (II)'nin şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.8	Akridin'in kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.9	BODIPY'ın kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.10	FITC'in kimyasal yapısı.....	20
Şekil 4.1	Anti-VEGF antikoru ağır zincir DNA ve protein dizisi.....	29
Şekil 4.2	Anti-VEGF antikoru hafif zincir DNA ve protein dizisi.....	30
Şekil 5.1	Rekombinant Nano-Anti-VEGF Zeta boyut analizi.....	40
Şekil 5.2	Ticari Nano-Anti-VEGF Zeta boyut analizi.....	41
Şekil 5.3	Rekombinant ve ticari Anti-VEGF'nin CD spektroskopisi.....	44
Şekil 5.4	Rekombinant ve ticari Nano-Anti-VEGF'nin CD spektroskopisi.....	45
Şekil 5.5	Acridin + Rekombinant ve Akridin + Ticari Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği.....	47
Şekil 5.6	BODIPY + Ticari Nano-Anti-VEGF ve BODIPY + Rekombinant Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği.....	48
Şekil 5.7	FITC + Ticari Nano-Anti-VEGF ve FITC + Rekombinant Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği.....	49
Şekil 6.1	Nano-Anti-VEGF'nin şematik gösterimi.....	52

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 5.1 RNA izolasyonu sonucunda agaroz ile kontrolü.....	36
Görsel 5.2 Anti-VEGF cDNA'nın Re-PCR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü.....	37
Görsel 5.3 Anti-VEGF cDNA'nın Re-PCR saflaştırma sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü.....	38
Görsel 5.4 Anti-VEGF cDNA'sını taşıdığı sanılan pGEMTeasy plazmidinin restriksiyon analizinin agaroz jel görüntüsü.....	39
Görsel 5.5 VEGF rekombinant proteininin western blot analizi ile desteklenmesi.....	40
Görsel 5.6 Rekombinant Nano-Anti-VEGF'nin SEM görüntüleri.....	42
Görsel 5.7 Ticari Nano-Anti-VEGF'nin SEM görüntüleri.....	42

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ANADOLUCA	: AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpining Conjugation Approach
APS	: Amonyum Persülfat
Bç	: Baz çifti
CD	: Dairesel Dikroizm
cDNA	: Complementer Deoksiribonükleik Asit
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid
EDC	: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Asit
FITC	: Floresein izotiyosiyanat
HCl	: Hidroklorik Asit
IgG	: İmmüoglobulin G
KCl	: Potasyum Klorür
MgCl	: Magnezyum Klorür
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NaCl	: Sodyum Klorür
NHS	: N-hydroxysuccinimide
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PCR / PCR	: Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
PVA	: Polivinil Alkol
RNA	: Ribonükleik Asit
RT	: Reverse Transcriptase
SDS	: Sodyum N-Dodesil Sülfat
SEM	: Scanning Elektron Mikroskobu
TBE	: Tris-Borik asit- EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-Tetraetilmetilendiamin
Tm	: Temperature of Melting
VEGF	: Vasküler Endotelial Growth Factor

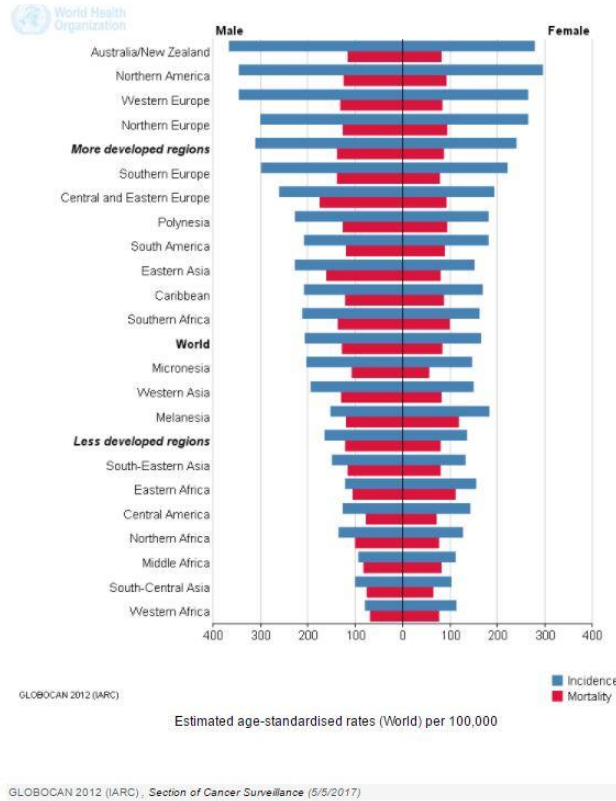
1. GİRİŞ

GLOBOCAN 2012 verileri, kanserin dünyada 14,1 milyon kişide görüldüğünü ve %58,2'sinin ölümlerle sonuçlandığını göstermektedir. Yine aynı yılda en çok görülen kanser türlerinin; akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (9,7) kanserleri iken (De Martel, ve diğerleri, 2012), en çok ölüme sebep olan kanser türlerinin akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mide (%8,8) kanseri olduğu görülmüştür (Torre, ve diğerleri, 2015). Kanser oranlarındaki artış hızı geçmiş yıllara oranla devam ederse 2015 yılında ortalama 19,3 milyona ulaştığı tahmin edilmektedir. Bu kanser hastalıklarının %56,8'inin, kanserin sebebiyet verdiği ölümlerin ise %64,9'nun az gelişmiş ülkelerde olacağı öngörülmüştür (Yeni Dünya Kanser İstatistikleri Yayınlandı, 2016)

Dünyada 2012 yılı verilerine göre 14,1 milyon yeni kanser vakası, 8,2 milyon kanserden kaynaklı ölüm vakası ve 32,6 milyon kanser hastası vardır. Az gelişmiş ülkelerde 8 milyon yeni kanser vakası, 5,3 milyon kanserden kaynaklı ölüm vakası ve 15,6 milyon kanser hastası vardır, (Bray & Müller, 2006).

Şekil 1.1'de görüldüğü gibi bütün yaşlar dikkate alındığında kanser görülme sıklığı %25 oranla erkeklerde kadınlardan daha fazladır. Bu oran erkeklerde yüz binde 205 kadınlarda ise yüz binde 165'dir. Farklı ülkelerde erkeklerde görülme oranı Afrika'da yüz binde 79 iken Avustralya/Yeni Zelanda'da yüz binde 365'e kadar yüksek oranla yaklaşık olarak beş kat değişim göstermektedir. Aynı değişim ise kadınlarda üç katlık bir değişimle daha az değişkenlik göstermektedir (Ferlay, ve diğerleri, 2015).

Ölüm oranı açısından bölgesel farklılıklar daha azdır; az gelişmiş ülkelerde erkekler (%15) kadınlara (%8) göre daha fazla bir orana sahiptir. Erkeklerde oranlar Orta ve Doğu Avrupa'da yüz binde 173 ile en yüksek orana sahipken, Batı Afrika'da yüz binde 63 ile en düşük orana sahiptir. Kadınlarda ise en yüksek orana yüz binde 111 ile Doğu Afrika sahipken en düşük orana yüz binde 65 ile Güney-Orta Asya sahiptir (Fact Sheets by Cancer, 2017).



Şekil 1.1. 2012'de dünyada tahmini kanser görülme sıklığı, ölüm oranı ve yaygınlığı (Fact Sheets by Cancer, 2017)

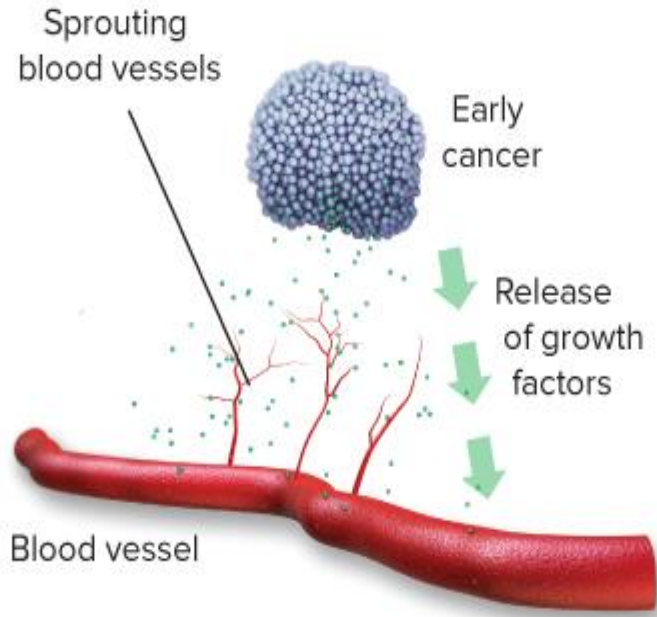
Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda ortalama 500.000'den fazla insan kanserden yaşamını yitirmektedir. Geliştirilen birçok tedavi yöntemi olmasına rağmen, bu ölüm oranlarının yaklaşık olarak yarısı solid tümörden dolayı olmaktadır. Cerrahi müdahalelerle alınamayan ve vücuda yayılmış tümörlerin bölgesel ve sistemik tedavisindeki yetersizlikler ölüm oranlarını daha da arttırmaktadır. Tümör gelişimini sağlayan tümör kan damarlarını inhibe etmeyi hedefleyen antianjiyogenik tedavi yöntemi, hasta popülasyonunda düşüşe fayda sağlayabilecek yenilikçi bir tedavi yöntemidir (Feldman & Libutti, 2000).

Tümör büyümesi ve metastaz için gerekli olan yeni kapiller kan damarlarının büyümesi veya anjiyogenez kanserin ilerlemesindeki önemli kontrol noktasıdır (Folkman & Kalluri, 2000). Bu nedenle son yıllarda tümör anjiyogenezi, kapsamlı kanser araştırmalarının odağı haline ve inhibisyonu kanser tedavisi için yenilikçi ve değerli bir rasyonel yaklaşım haline gelmiştir (Folkman, 2001).

Geliştirilmiş antianjiyogenik terapiler tümör anjiyogenezinde rol alan faktörleri hedef alır ve bu terapilerin tamamı kılcal oluşumunun ilk basamağında gerçekleşen endotel hücre proliferasyonunu inhibe eder ve tümör yatağına nüfuz ederler. Antianjiyogenik ajanlar, kanser

hücrelerini doğrudan hedef alan radyasyon, kemoterapi, monoklonal antikor tedavisi gibi yöntemlerin etkinliğini arttırdığı için bu tedavilere kombine olarak tedavinin etkinliğini arttırdılar (Folkman, 2002).

Anjiyogenesis ve metastaz yani damarlaşmanın artması ile tümör büyümesinin artması yüzyıl önce yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur (Ferrara, 2002). Fakat tümör büyümesine sebebiyet veren kan damarı büyümesinin uyarıcı bir faktör olduğunu ilk defa 1939'da Ide ve çalışma arkadaşları öne sürmüştür (Ide, Baker, & Warren, 1939). Ardından 1939'da Algire ve arkadaşları tümörün hızlı gelişiminin Şekil 1.2'de görüldüğü gibi zengin bir damar oluşumunun gelişimi ile doğru orantılı olduğu fikrini ortaya atmışlardır (Algire, Chalkley, Legallais, & Park, 1945). 1960'larda Greenblatt ve Shubik (Greenblatt & Shubick, 1968) ile Ehrmann ve Knoth (Ehrmann & Knoth, 1968) tümör hücresi tarafından üretilen difüze olabilen faktörlerin aracılığı sayesinde tümör damarlaşmasının meydana geldiğini yaptıkları çalışmalar ile ortaya çıkarmışlardır.



Şekil 1.2. Tümör Anjiyogenesisi (Saville, 2014)

İlk defa 1971'de damarlaşmayı engellemenin, kanseri engellemede etkili bir yöntem olabileceğini Folkman ileri sürmüştür (Folkman, 1971). Folkman ve laboratuvar arkadaşları 1970'lerin başlarında, ilk defa insan ve hayvan tümörlerinin damarlaşma faktörlerini izole etmeyi amaçlamışlardır (Folkman, Merler, Abernathy, & Williams, 1971). 1978'de Guillino,

damarlaşmayı bloklamanın kanseri önleyeceğini ileri sürmüştür (Gullino, 1978). Epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), tümör nekrozis faktör (TNF) ve anjiyogenin gibi faktörlerin anjiyojenik etkileri olduğu tanımlanmıştır (Folkman & Klagsbrun, Angiogenic factors, 1987), fakat yapılan birçok çalışma, bu faktörlerin damarlaşmayı engellediğini göstermesine rağmen, hiçbiri fizyolojik fonksiyonlarını göstermemiştir (Klagsbrun & D'Amone, 1991), (Ferrara, Hillan, Gerber, & Novotny, 2004).

Vasküler bir destek olmadan, oksijenden ve besinden yoksun bir şekilde bir tümör sadece 1-2 mm kadar büyüyebilir. Folkman'a (1971) göre tümör kan damarı, tümör anjiyojenik faktöre (TAF) bağımlı olarak şekillenir ve anjiyogenesis sürecine kadar tümörün etrafını kuşatarak savunmasız olduğu dönemde onu korur. Bu durum tümör büyümesini kısıtlayabilir. İlk defa vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), 1989 yılında Ferrara ve arkadaşları (Ferrara & Henzel, 1989) tarafından, TAF moleküllerinin en etkilisi olarak tanımlanmıştır (Carmeliet, 2005).

Tümörlerin, endotel hücrelerinin düşük mutajenik potansiyeline atfedilebilecek antianjiyogenik ajanların etkilerine karşı direnç geliştirmediğine dair bir takım kanıtlar bulunmuştur (Holmgren, O'Reilly, & Folkman, 1995). Anjiyogenez inhibitörlerinin çoğu, tümör hücrelerine karşı sitotoksik olduğu gibi sağlıklı hücrelere karşı da sitotoksik özellik göstermesi ve klinikte uzun süre bekletilebileceğine dair herhangi bir klinik bulguya rastlanılmadığından dolayı, antiangiogenik tedavinin, kronik bir hastalık için uygulanabilirliği kesin değildir (Feldman & Libutti, 2000). Buna ek olarak, endostatin gibi ajanların in vitro istikrarsızlığı ve yüksek terapötik dozları, rekombinant formda geniş çapta klinik kullanımlarına yönelik imalat ve ekonomik kısıtlamalar getirmektedir (O'Reilly, ve diğerleri, 1997). Dahası, rekombinant proteinlerin kapsül tekniği ile uygulanmasından kaynaklanan anti-anjiyojenik ajan seviyelerini koruyan dağıtma sistemlerine kıyasla, tümör neovaskülatürü üzerindeki antianjiyojenik etki için optimal olmayabilir. (Hahnfeldt, Panigrahy, Folkman, & Hlatky, 1999)

Tümörlerin anjiyojenik fenotipi, proanjiyojenik ve antianjiyojenik faktörlerin aktivitelerinde lokal denge ile düzenlenir. Neovaskülarize olmuş tümörler, genellikle VEGF ve diğerleri gibi artmış proanjiyojenik protein seviyelerini ifade eder. Proanjiyojenik proteinlerin ekspresyonu hipoksi, onkojenlerin aktivasyonu veya tümör süpresör genlerin inaktivasyonu da dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından indüklenebilir. Proanjiyojenik matriks

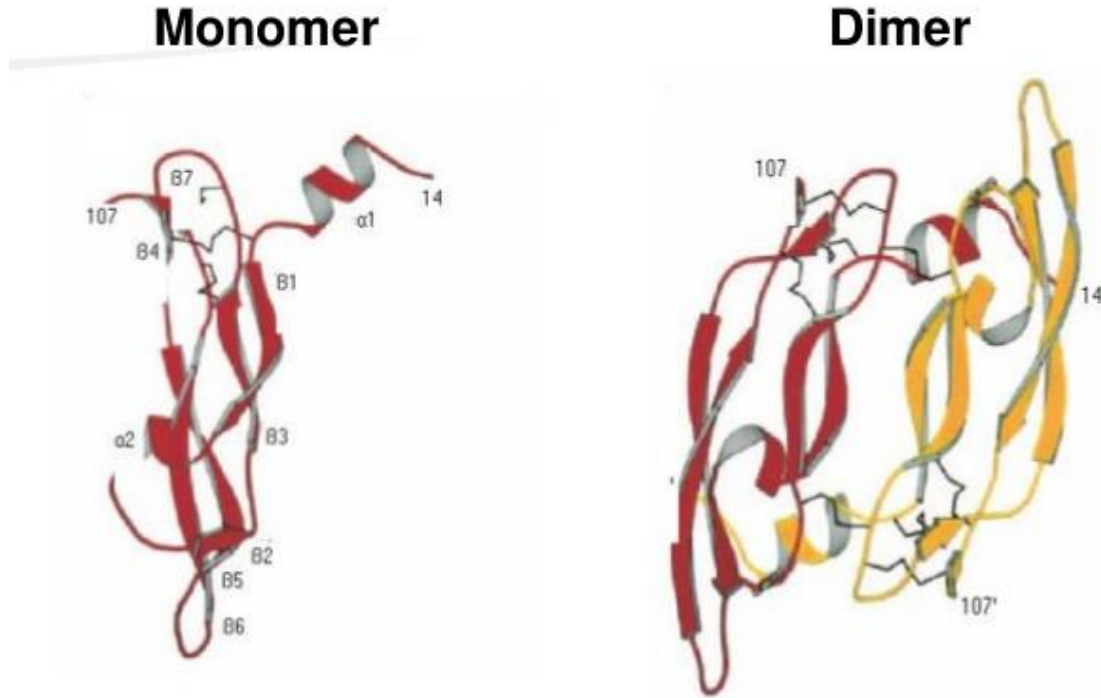
metalloproteinazların aktivitesi vasküler tümörlerde sıklıkla artar. Diğer tümörlerde, anjiyogenez, antianjiogenik faktörün aşağı regülasyonunun bir sonucudur (Folkman, 2002).

Bu çalışmada, insana ait kandan mRNA izole edilip cDNA sentezlendikten sonra Anti-VEGF antikorunun geni spesifik primerlerle klonlanarak konakçı bir organizmada proteinin ekspresyonu sağlanmış, elde edilen antikor proteininden ANADOLUCA metoduna göre Nano-Anti-VEGF antikoru sentezlenerek ortam koşullarına daha dayanıklı nano proteinler elde edilmiştir (U.S. Patent No. 13/203,833, 2009). Elde edilen Nano-Anti-VEGF antikorunun Zeta spektroskopisi ile molekül büyüklüğü ölçülmüş, SEM ile yapısı incelenmiş, CD spektroskopisi ile sekonder yapıları analiz edilmiş ve akridin gibi farklı floresans özellikteki moleküller ile etkileştirilip floresans özellik kazandırılmıştır.

2. TEORİK BİLGİ

2.1. VEGF ve Kanser Metastazındaki Rolü

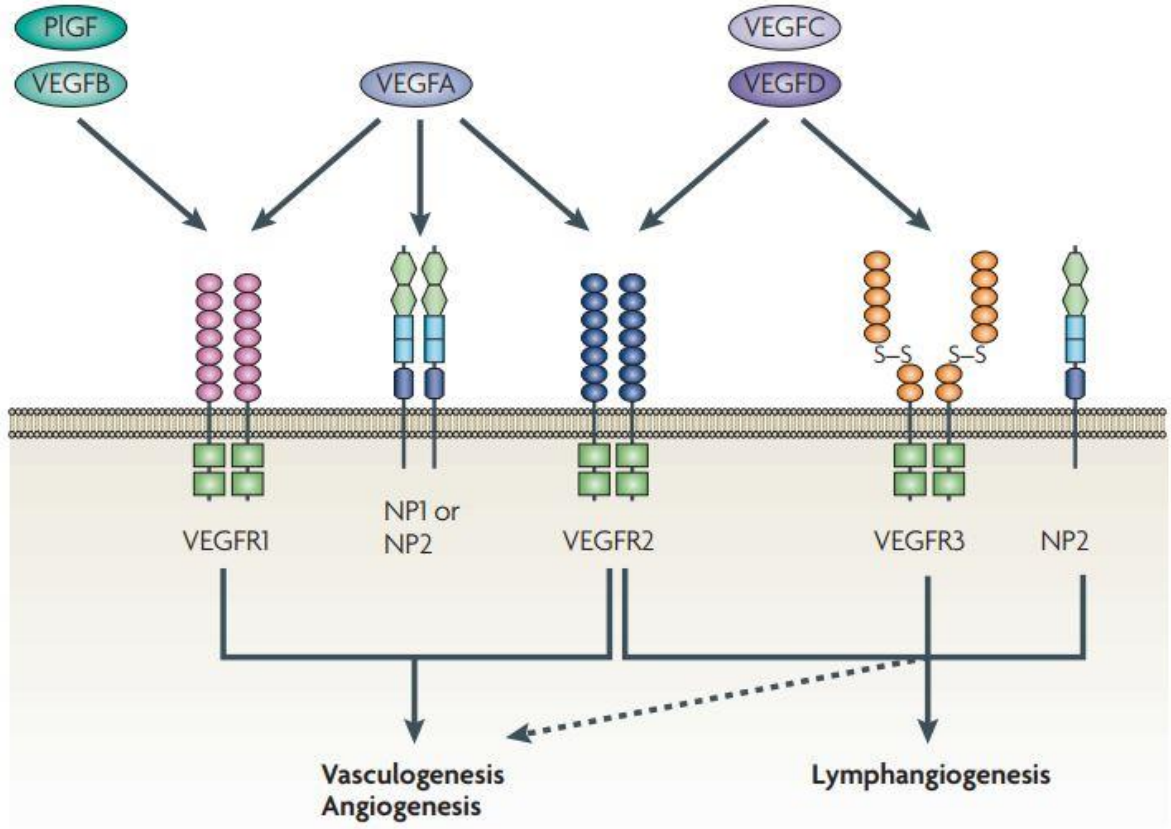
Yaklaşık olarak 36-46 kDa olan VEGF, Şekil 2.1’de gösterildiği gibi homodimerik bir glikoproteindir (Lien & Lowman, 2008). Vasküler endotelial hücrelerden eksprese edilen iki VEGF reseptörüne bağlanır. Sağlıklı bir bireyde, VEGF, embriyonik gelişim sırasında damar oluşumunu sağlar ve yaraların iyileşmesinde önemli bir faktördür. Fakat kanser hücrelerinin beslenebilmeleri ve oksijen ihtiyaçlarını karşılayabilmeleri için gerekli olan kan damarlarının oluşumunda da görev alır (Carmeliet, 2005). VEGF, vasküler endotelial hücrelerin yayılmasını indükler ve tümör anjiyogenesininin oluşmasına neden olur (Keating, 2014).



Şekil 2.1. VEGF'nin yapısı (Elgaddar, 2006)

İnsanlarda 8 ekzon tarafından kontrol edilen VEGF, fizyolojik ve patolojik anjiyogenesisi başlatan endotelial hücre spesifik mitojen olarak tanımlanmış ve izole edilmiştir (Houck, Keith, & et al., 1991). Çeşitli kaynaklarda, damar geçirgenliğinden sorumlu olan faktörün de VEGF ile özdeş olduğu gösterilmiştir. Bu VEGF, VEGFA olarak bilinir ve VEGFB, VEGFC, VEGFD ve plasental büyüme faktörü (PLGF) yi de içeren geniş büyüme faktörü ailesinin bir üyesidir. Bu çeşitli büyüme faktörleri (Şekil 2.2) eksprese edilme şekilleri,

reseptör spesifiklikleri ve biyolojik fonksiyonlarına göre değişiklik gösterir (Goel & Mercurio, 2013).

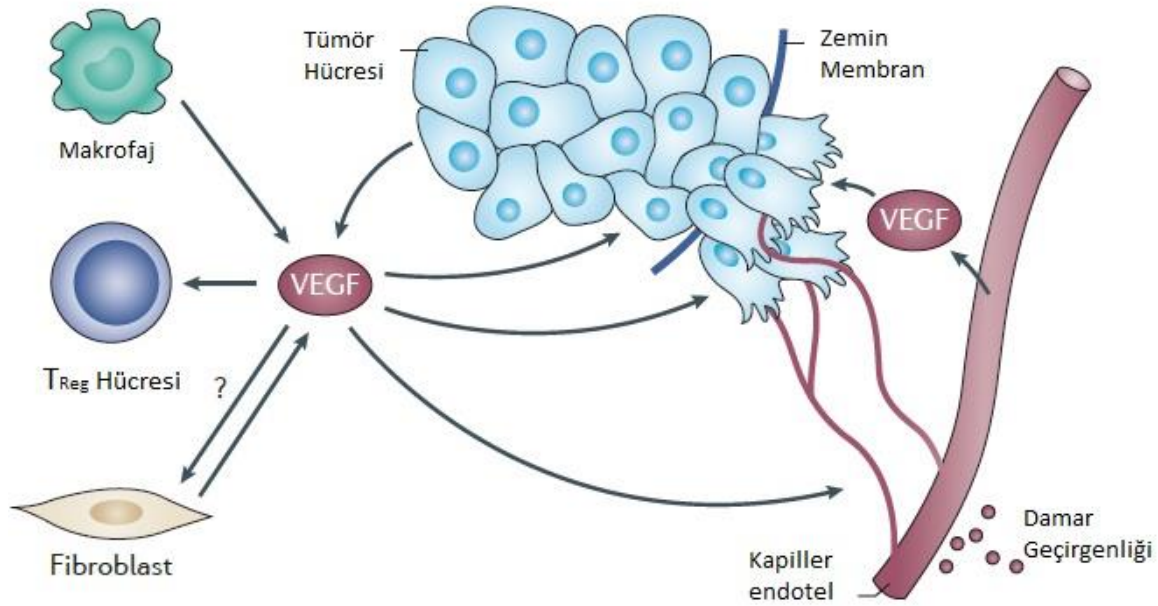


Şekil 2.2. Reseptörlere bağlanmalarına göre VEGF çeşitleri (Ellis & Hicklin, 2008)

VEGF ve reseptörleri yeni doğanda yeni damar oluşumlarının şekillenmesinde, anjiyogenesiste ve çeşitli tümörlerin ileri derecelerindeki damar oluşumlarında görevlidir (Hansen, ve diğerleri, 2012). Tümör hücreleri ile çevrelerindeki endotelial hücreler, immün hücreleri, fibroblastlar gibi mezenşimal hücreler arasında iletişim kurar. Tümör miyofibroblastları, kanser hücresi büyümesini ve metastasisi çeşitli mekanizmalarla etkileyebilir. Tümör etrafındaki büyüme faktörü sinyal yolları tanımlanmış, uykuda olan tümör hücrelerini aktif hale geçiren miyofibroblastlardaki moleküler değişimler gözlenmiştir (Yaqoob, ve diğerleri, 2012).

VEGF makrofajlar, endotelial hücreler ve fibroblastlar ile birlikte tümör veya stroma hücrelerinden salınır (Yagoob & et al., 2012). Tümör mikroortamındaki fibroblastların çeşitli hücre tiplerinden eksprese edilen VEGF'nin birçok görevi vardır. Esas görevi damarlaşmayı

uyarmaktır. Endotel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü sağlayan sinyal yolağını oluşturan en önemli etken VEGF reseptörlerinin uyarılmasıdır. Bu süreç sonucunda anjiyogenez oluşur ve yeni kan damarlarının şekillenmeleri sağlanır. Ayrıca; VEGF desmoplastik stromanın biçimlenmesini indükleyen fibrin matriksin birikmesi sonucunda oluşan damar geçirgenliğini de artırır (Sanger, 2010). Tümör hücrelerinden salınan VEGF otokrin yolla göreve katılır ve dediferansiyasyonu ile tümör hücrelerinin yayılmasını ve hayatta kalabilme kabiliyetini artıran endotel mezenşimal geçiş fenotipini düzenler. Anti-tümör immün yanıtı inhibe eden düzenleyici T hücrelerini kemoatraktant olarak toplama görevi görür (Hansen, ve diğerleri, 2012). Tümör fibroblastları aynı zamanda VEGF'yi salgılama özelliğindedir. Tümör fibroblastlarından eksprese olan nörofilin1, çekirdekleşen fibronektin fibril yapısı ile tümör büyümesine katkıda bulunur fakat bu işleme VEGF'nin dahil olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Şekil 2.3.'deki oklar tümördeki VEGF'nin hedeflerini ve kaynağını işaret etmektedir (Goel & Mercurio, 2013).



Şekil 2.3. VEGF'nin tümörler üzerindeki işlevi (Goel & Mercurio, 2013)

2.2. Anti-VEGF

Patolojik durumlarda anjiyogenezin temel düzenleyicisi olarak VEGF'nin bilinmesi, VEGF aktivitelerini bloke etmek için sayısız çabaya neden olmuştur. Anti-VEGF reseptör

antikorları, çözünebilir reseptör yapıları, antisens stratejileri, VEGF'ye karşı RNA aptamerleri ve düşük molekül ağırlıklı VEGF reseptör tirozin kinaz (RTK) inhibitörlerinin hepsinin, VEGF sinyallemesine müdahale etmek için kullanılması önerilmiştir (Siemeister, Martiny-Baron, & Marmé, 1998). Nitekim, Anti-VEGF nötrleştirici antikörlerin, farelerde çeşitli insan tümör hücre hatlarının büyümesini baskıladığı (Kim, ve diğerleri, 1993) (Warren, Yuan, Matli, Gillett, & Ferrara, 1995) ve iskemik retinal bozuklukların modellerinde göz içi anjiyogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir (Adamis, ve diğerleri, 1996). Bu nedenle, Anti-VEGF monoklonal antikörleri ve VEGF'nin diğer inhibitörleri, solid tümörlerin ve çeşitli intraoküler neovasküler hastalıkların tedavisinde umut vadeden adaylardır (Washington, DC: U.S. Patent No. 6,884,879., 2005). VEGF molekülü tümör hücrelerinde, reseptörleri ise tümörün sızdığı vasküler endotel hücrelerinde çok salgılansa da, anjiyogenez ile ilişkili olmayan normal hücrelerde VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonu çok daha azdır (Washington, DC: U.S. Patent No. 8,975,381., 2015).

Kanser tedavisinde anjiyogenesisin engellenmesi ilk defa 1970'de Folkman (Folkman, 1971) tarafından önerilmiş ve o zamandan beri bunun geliştirilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. 1989'da sırayla gelen Leung ve Keck'in arkadaşları ile yapmış olduğu çalışmalarda antianjiyogenik tedaviler başlamıştır (Leung, David, & et al., 1989) (Keck, Pamela, & et al., 1989). Anti-VEGF olarak tedavi amaçlı üretilen ilk ilaç insanlaştırılmış monoklonal antikor olan Avastin (Bevasizumab) 1997 yılında, Genentech (Güney San Francisco, CA) tarafından toksisitesi düşük olarak belirlenmiş ve piyasaya sürülmüştür (Gordon & et al., 2001). Bu ilaç 26 Şubat 2004'te kolon kanseri tedavilerinde bir kemoterapi ilacı olarak FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından kabul edilmiştir (Kim, Leo, & Patricia, 2012).

Avastin veya bevasizumab bir Anti-VEGF antikoru çeşitidir. Avastin patentlerinin Avrupa'da 2022'de, Amerika'da 2019'da dolacağı öngörülmektedir. 15 civarı bevasizumab biyobenzeri ürün geliştirileceği tahmin edilmektedir. Bunlardan bir kaçı Tablo 2.1'de sunulmaktadır.

Tablo 2.1. *Bevasizumab biyobenzeri ürünlerin dünyadaki yeri (Home - GaBI Online - Generics and Biosimilars Initiative, 2017)*

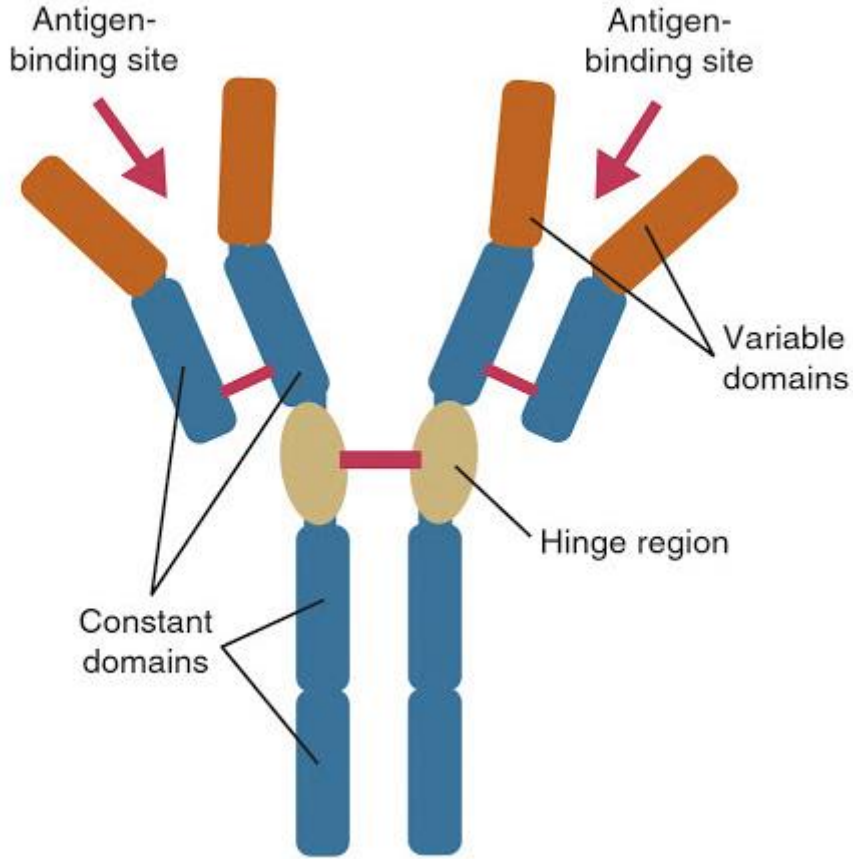
Firma Adı	Ürün Adı	Gelişim evresi
Amgen/Allergan, Amerika	ABP 215	Faz III denemesi Eylül 2015'te tamamlanmıştır
AstraZeneca/Fujifilm Kyowa Kirin Biologics, Amerika/Japonya	FKB238	Ağustos 2015'te ½50- ½50 iş ortaklığı kurulmuştur. Faz I denemesi Kasım 2014'te başlamıştır.
Biocad, Rusya	BCD-021	Akciğer kanserinde faz III denemeleri Kasım 2015'te tamamlanmıştır. AMD (Age-related macular degeneration) Faz III denemelerinin Şubat 2017'de bitmesi beklenmektedir. Rusya tarafından Aralık 2015'te onaylanmıştır.
BioXpress Therapeutics, İsviçre	-	Biosimilar in pipeline
Boehringer Ingelheim, Almanya	BI 695502	Faz III akciğer kanseri denemelerinin Mart 2019'da tamamlanması beklenmektedir.
Hetero (Lupin), Hindistan	Cizumab	'Benzer biyojik' olarak Temmuz 2016'da Hindistan'da piyasaya sürülmüş.
Oncobiologics/Viropro, Amerika	ONS-1045	6 biyobenzer ürün için Şubat 2016'da iş birliği anlaşması imzalanmıştır. Faz I klinik denemeleri Ekim 2015'te tamamlanmıştır. Faz II denemelerinin 2016'da başlaması beklenmektedir.
Pfizer, Amerika	PF-06439535	Faz III akciğer kanseri denemeleri Şubat 2015'te başlamıştır.
PlantForm, Kanada	-	İnsanda klinik denemelerinin 2014'te başlaması beklenmekteydi. Piyasaya sürülmesi, bir ilaç firması ile ortak olarak 2016'da beklenmektedir
Reliance Life Sciences, Hindistan	Bevacirel	'Benzer biyojik' olarak Temmuz 2016'da Hindistan'da piyasaya sürülmüş.
Samsung Bioepis, Güney Kore	SB8	Faz III akciğer kanseri denemeleri Nisan 2016'dan beri devam etmektedir.

2.2.1. Anti-VEGF antikorunun yapısı

Bir antikor olan Anti-VEGF molekülü immünoglobülin G (IgG) yapısındadır (Şekil 2.4). (Tolatanova, ve diğerleri, 2009). IgG'ler iki özdeş hafif (L) zincir ve iki aynı ağır (H) zincirden oluşan yaklaşık 150.000 daltonluk heterotetramerik glikoproteinlerdir (Gerber, 2008).

Her hafif zincir, bir kovalent disülfür bağı ile bir ağır zincire bağlanırken, disülfür bağlarının sayısı, farklı immünoglobülin izotiplerinin ağır zincirleri arasında değişir. Her ağır

ve hafif zincirde düzenli aralıklarla zincir boyunca disülfür köprüleri bulunur. Her ağır zincirin bir ucunda değişken alan (VH) ve bunu takiben birkaç sabit alan bulunur. Her hafif zincir bir uçta (VL) değişken bir alana ve diğer ucunda sabit bir alana sahiptir. Hafif zincirin sabit alanı, ağır zincirin birinci sabit alanı ile hizalanır ve hafif zincirli değişken alan, ağır zincirin değişken alanı ile hizalanır (Washington, DC: U.S. Patent No. 7,060,269., 2006).



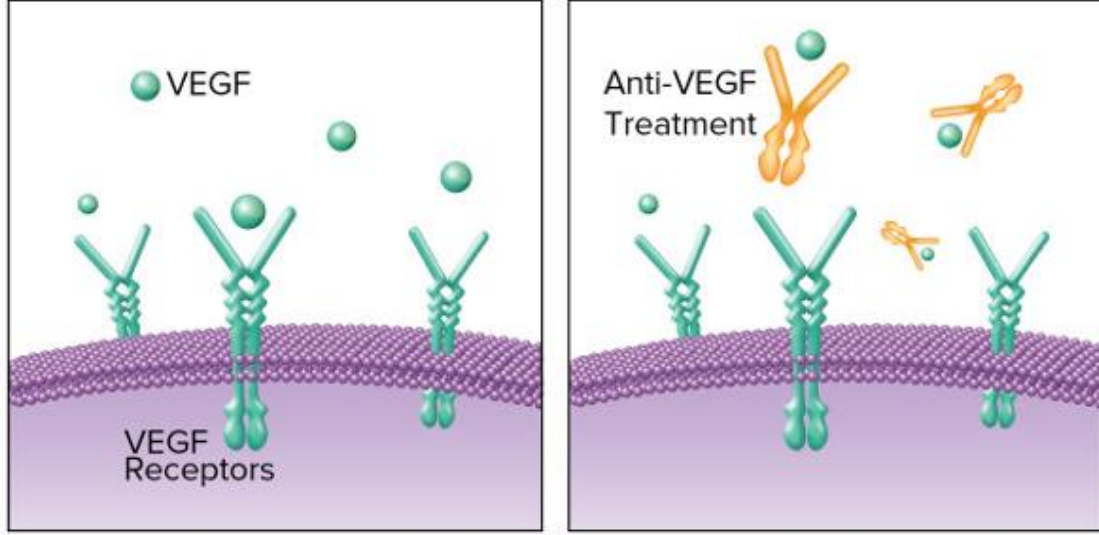
Şekil 2.4. Antikörün yapısı (Tizard, 2013), (Schroeder & Cavacini, 2010)

2.2.2. Anti-VEGF'nin fonksiyonu ve önemi

VEGF'nin reseptörleri ile etkileşimi endotel hücrelerin çoğalmasına ve kan damarlarının oluşmasına öncülük eder. Anti-VEGF, VEGF'ye bağlanır ve VEGF'nin endotel hücrelerin yüzeyindeki reseptörleri ile etkileşime geçmesini engeller.

Anti-VEGF, VEGF'nin bir veya daha fazla biyolojik aktivitesini, örneğin mitojenik veya anjiyojenik aktivitesini inhibe edebilen Anti-VEGF antagonistik antikörleri sağlar. VEGF antagonistleri, Şekil 2.5'de görüldüğü gibi VEGF'nin bir hücre reseptörüne bağlanmasını

engelledikten sonra VEGF ile aktive olmuş hücreleri etkisiz hale getirerek veya öldürerek ya da bir hücrese reseptöre VEGF bağlandıktan sonra vasküler endotel hücre aktivasyonuna müdahale ederek hareket eder (Washington, DC: U.S. Patent No. 7,060,269., 2006).



Şekil 2.5. Anti-VEGF'nin fonksiyonu (Treat I Science Of RVO)

2.3. Rekombinant Teknolojisi

İnsanlarda, bağışıklık sistemi, binlerce farklı antijene uygun binlerce farklı antikor oluşturabilir. Bilim adamları, rekombinant yaklaşımlar kullanarak immüoglobülin tabanlı bağlanma bölgeleri oluşturmak için yıllarca araştırmalar yapmıştır (Winter & Milstein, 1991). İlk buluşlardan biri, 1989'da, antikor genlerinin klonlanmasını sağlayan ve böylece antikor üreten bir lenfositin bir tümör hücresi ile füzyonuyla elde edilen monoklonal antikorların geleneksel üretim yöntemleri olan hibridomaları geri planda bırakan yenilikçi bir teknoloji ile gelmiştir (Orlandi, Güssow, Jones, & Winter, 1989). Yeni yöntemde, antikor genleri doğrudan aşılansız hayvanların lenfositlerinden klonlanmış ve antikor ağır veya hafif zincirin değişken bölgelerinin tek bölgesi bir kütüphanesi olarak veya bakterideki antijen bağlama fragmanının (Fab) kısımlarından oluşmuş bir kombinatoriyal kütüphane oluşturulmuştur (Ward, Güssow, Griffiths, Jones, & Winter, 1989). Kombinatoriyal kütüphaneleri görüntülemek için, radyo etiketli antijen ile yavaş ve külfetli bir koloni kaldırma ve filtre bazlı görüntüleme yöntemleri daha sonra milyonlarca klondan gelen kütüphanelerde birkaç antijenle tepkimeye sokulmuş ve antikorun tanımlanması için kullanılmıştır (Huse, ve diğerleri, 1989).

Tekli klonların antijen bağlama davranışına dayanarak kütüphanelerden gelen antikorları çabucak seçmenin bir yolunu sağlayan filamentli fajın yüzeyindeki işlevsel antikor

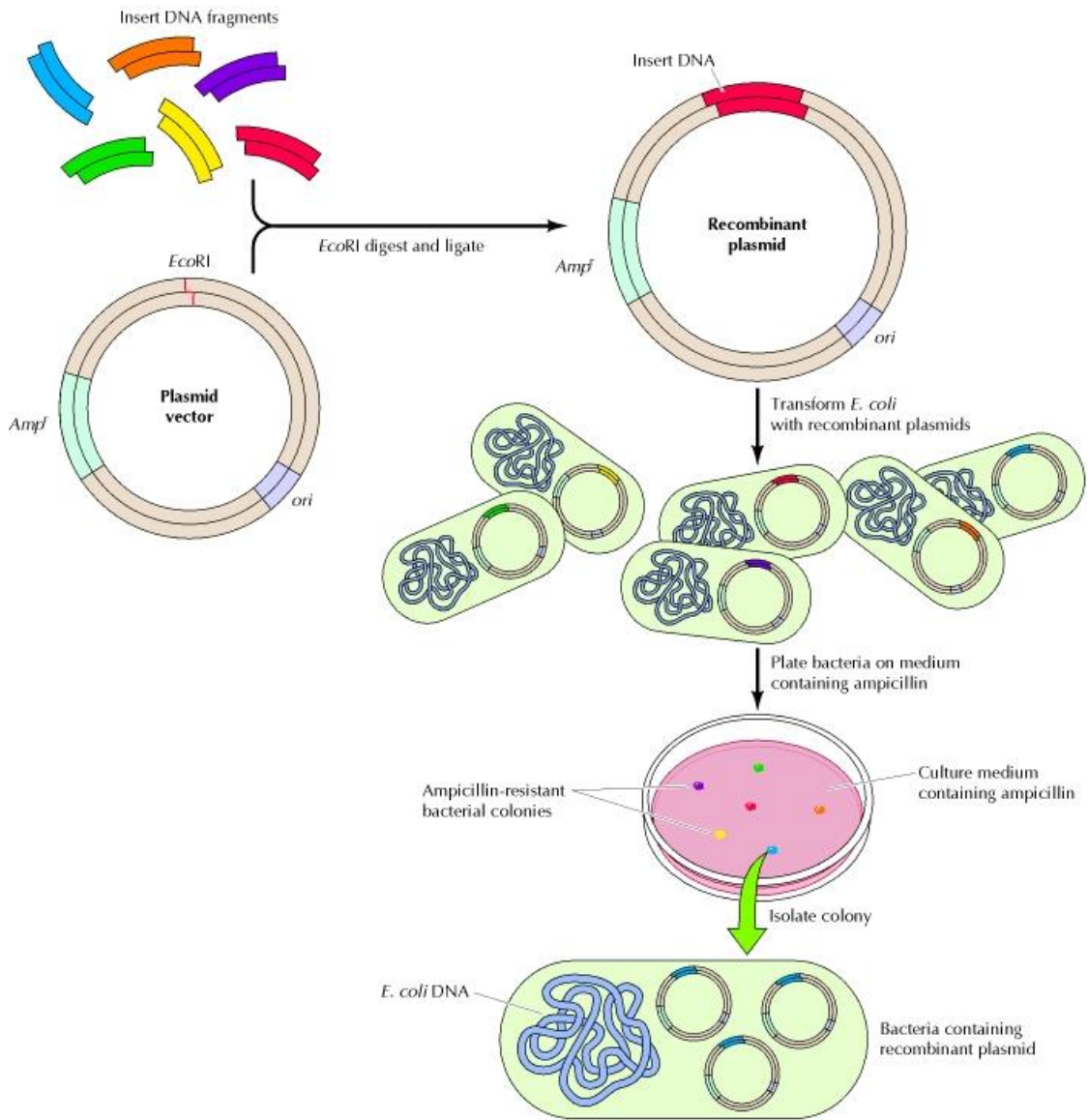
parçalarının ekspresyonuna dayanan bir yöntem McCafferty ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. (McCafferty, Griffiths, Winter, & Chiswell, 1990). Birkaç yıl sonra PCR ile klonlanmış antikorların kombinasyonu ile faj görüntüsü olarak adlandırılan bu teknik, hayvan veya insan B lenfositleri gibi doğal kaynaklardan yapılan rekombinant antikor kütüphanelerinden fare (Clackson & Hoogenboom, 1991) ve insan (Marks, ve diğerleri, 1991) antikorlarını izole etmek için başarılı bir şekilde kullanılmış ve sonunda kütüphaneler tamamen in vitro klonlama teknikleriyle oluşturulmuştur (Hoogenboom, 2005).

Moleküler biyolojide klasik deneyler, genlerin doğası ve ifadesi ile ilgili temel kavramlarımızı geliştirmede çarpıcı bir şekilde başarılıdır. Bu çalışmalar; öncelikle genetik analiz temel alındığından, başarıları büyük oranda basit, hızlı çoğaltan organizmaların (bakteri ve virüs gibi) model olarak seçilmesine bağlıdır. Bunun sebebi, ökaryotik hücrelerin karmaşıklıklarının moleküler seviyede anlaşılması zor olduğu için bu temel ilkelerin nasıl genişletilebileceğinin açık olmamasıdır, çünkü ökaryotik hücrelerin çoğunun genomları (örn., İnsan genomu) prokaryotlardan bin kat daha karmaşıktır. 1970'lerin başında moleküler düzeyde bu tür genomların E. coli. üzerinden incelenmesi ihtimali göz korkutucu olarak gözükmemektedir. Özellikle, bireysel genlerin izole edilemeyeceği ve üzerinde çalışılmayacağı hiçbir şekilde öngörülememektedir (Watson, The DNA story: a documentary history of gene cloning. , 1981).

Moleküler biyolojinin ilerlemesindeki bu engel, bilim adamlarına herhangi bir hücrenin türevli bireysel genleri izole etme, dizileme ve manipüle etme yeteneği sağlayan rekombinant Deoksiribonükleik Asit (DNA) teknolojisinin geliştirilmesi ile aşılmıştır. Rekombinant DNA'nın uygulanması ökaryotik genlerin yapısı ve işlevi hakkında ayrıntılı moleküler çalışmalara izin vermiş ve böylece hücre biyolojisi konusundaki anlayış, devrim yaratmıştır (Watson, Gilman, Witkowski, & Zoller, 1992).

Rekombinant DNA teknolojisi günümüzde oldukça gelişmiştir. Moleküler biyologlar çeşitli DNA dizilerini bazı tesislerle bir araya getirerek, transgenik mikroplar ve hücre kültürlerinde bol miktarda eksojen protein ürünü üretebilen yeni DNA ürünleri yaratabilmektedirler. Genel anlam ve yöntemler, çeşitli küt uçlu veya "yapışkan" uçlu DNA fragmentlerinin in vitro ligasyonunu kapsamaktadır; bu da belirli organizmaları dönüştürmede, kullanışlı güçlü ifade vektörleri üretmekte ve dolayısıyla bunların arzu edilen ürününün etkili sentezini yönlendirmektedir. Bununla birlikte, tek tek ürün bazında üretim yapmak oldukça karmaşık bir süreçtir (Cooper & Sunderland, 2000).

Şekil 2.6’da görüldüğü gibi, bir replikasyonun orijininin bir veya daha fazla fenotipik seleksiyon özellikleri, bir ekspresyon promotörü, heterolog gen inserti ve vektörün DNA rekombinasyonu kullanılarak genellikle konakçı hücre dışında gerçekleştirilir. Ortaya çıkan rekombinant kopyalanabilir ifade vektörü veya plazmid, transformasyon yoluyla hücrelere sokulur ve transformantın büyütülmesi suretiyle büyük miktarlarda rekombinant hücre elde edilir (Ausubel, ve diğerleri, 2003). Genin kodlandığı DNA dizisinin, transkripsiyonu ve translasyonu düzenleyecek olan kısımların arasına doğru bir şekilde yerleştirildiğinde, ortaya çıkan yapıya ekspresyon vektörü denir. Ekspresyon, insert edilmiş gen kodlarının bulunduğu polipeptit sekansının üretilmesi sürecidir. Nihai ürün, gerektiğinde, konakçı hücrenin lizisiyle ve diğer proteinlerden uygun saflaştırmalarla ürünün geri kazanılmasıyla elde edilebilir (Drlica, 1992).



Şekil 2.6. Klonlama ve plazmid vektörleri (Recombinant DNA, 2017)

Vektör, bir replikasyon orijini (ori), ampisiline direnç kazandıran bir gen (Ampr) ve yabancı DNA'yı eklemek için kullanılabilen bir kesim bölgelerini (örneğin, EcoRI) içeren küçük, dairesel bir moleküldür. İncert DNA vektöre bağlanır ve rekombinant plazmidler E. coli'yi transgenik yapmak için kullanılır. Bakterilerin ekimi amfisilin içeren besi yerine yapılır, böylece ampisiline dirençli bakteriler plazmid DNA'ları taşıdıkları için koloniler oluşturabilirler. Bundan sonra plazmit içeren bakterilerin bireysel kolonileri izole edilebilir ve rekombinant plasmidlerin izolasyonu için büyük miktarlarda üretilebilir (Recombinant DNA, 2017).

Uygulamada, rekombinant DNA teknolojisinin kullanılması tamamen heterolog polipeptidleri (direkt ekspresyon olarak adlandırılır) veya alternatif olarak bir homolog polipeptidin amino asit dizisinin bir bölümüne kaynaşmış bir heterolog polipeptidi ifade edebilir. İkinci durumlarda, amaçlanan biyoaktif ürün, bazen, ekstraselüler bir ortamda bölünene kadar kaynaşmış, homolog / heterolog polipeptit içerisinde biyoaktif hale getirilir (Washington, DC: U.S. Patent No. 5,169,762, 1992).

Benzer şekilde, genetik ve hücre fizyolojisini incelemek için hücre veya doku kültürü sanatı iyi oluşturulmuştur. İzole edilmiş normal hücrelerden ardışık seri aktarımlarla hazırlanan kalıcı hücre hatlarının korunması için araçlar ve yöntemler kullanılır (Pollack, 1981). Araştırmalarda kullanılmak üzere, bu tür hücre hatları sıvı ortamda katı bir destek üzerinde veya destek besinleri içeren süspansiyon içinde büyütülür (Watt, 1991).

Aynı şekilde, protein biyokimyası, biyoteknolojide yararlı, gerçekten gerekli olan yardımcı bir unsurdur. Arzulanan proteini üreten hücreler, bunun yanında yüzlerce başka protein ve hücre metabolizmasının endojen ürünleri de üretirler. Bu kirlenici proteinlerin yanı sıra diğer bileşikler de arzulanan proteinden uzaklaştırılmazsa, bir hayvana veya insana o proteinin terapötik tedavisi sırasında toksik etki gösterebilir. Dolayısıyla, protein biyokimyası teknikleri göz önüne alındığında, belirli sistem için uygun ayırma prosedürleri ile amaçlanan kullanım için güvenli homojen bir ürün ortaya çıkmaktadır. Protein biyokimyası arzulanan ürünün kimliğini de kanıtlar, onu karakterize eder ve hücrelerin herhangi bir değişiklik veya mutasyon olmadan sadakatle üretilmesini sağlar. Bu bilim dalı, başarılı klinik araştırmalar ve pazarlama yapılmadan önce uygulanması için gerekli olan biyoassaylar, kararlılık çalışmaları ve diğer prosedürlerin tasarımında da yer almaktadır (Marks & Smith, 2004).

2.4. Nanokonjugat Yapılar

2.4.1. Fotosensitif amino asit monomerleriyle çapraz bağlama ve ANADOLUCA yöntemi ile biyokonjugasyon

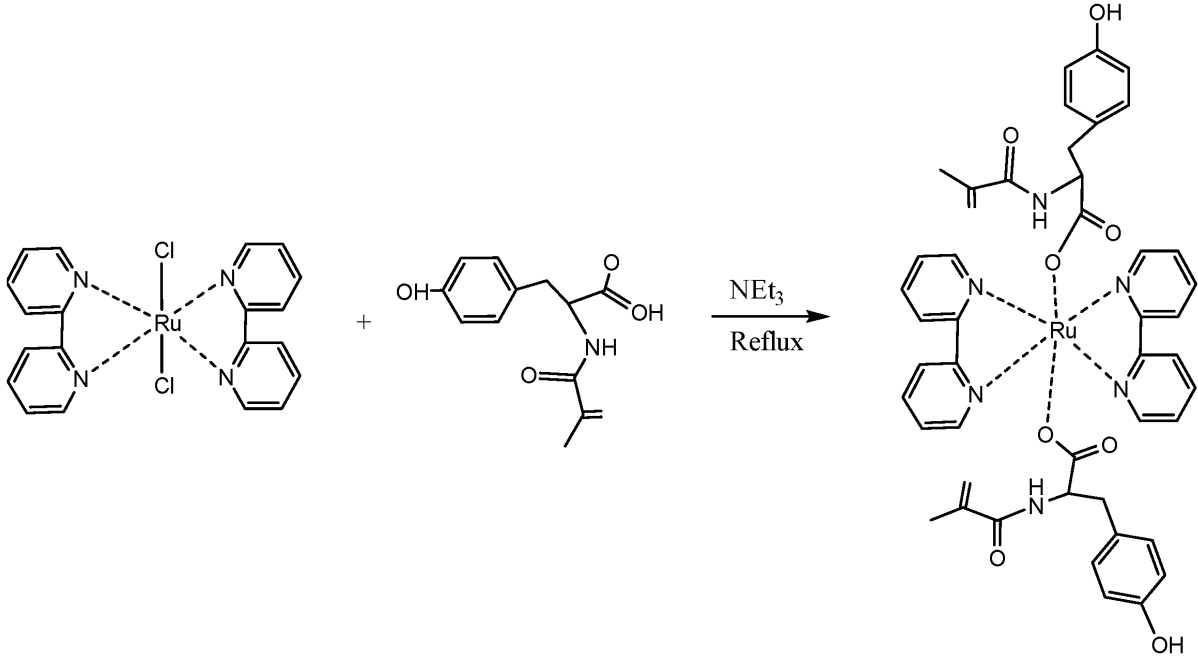
Yaşam bilimleri ve biyoteknolojide kullanılmak üzere geliştiren ANADOLUCA metodu (ANADOLUCA-AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach), fotosensitif (ışığa duyarlı), amino asit monomer ve oligomerleri kullanılarak protein konjugasyonu ve çapraz bağlanması için kullanılan bir yöntem olup farklı hücre tiplerini, dokuları ve diğer hedefleri algılamak için adapte edilebilir. Protokol, monomer bağlayıcı yapıdaki birçok protein temelindeki rutenyum şelat [bis(2-20-bipyridyl)bis(MATyr)-ruthenium(II) fotosensitif monomer] tarafından gün ışığıyla başlatılan ve protein yapılarında bulunan aminoasitlere atkılanan çapraz bağlar üretilmesine dayanır (Şekil 2.7) (U.S. Patent No. 13/203,833, 2009). Bu metotta, fotosensitif monomer, kovalent ve çapraz bağlayıcı ile konjugasyon baz alınarak, hazırlanmış amino asit ve rutenyum şelat monomerleri doğru antikor oryantasyonu için yönlendirme sağlamakta ve bağlandıktan sonra denatürasyonu engellemektedir.

Metot, silika materyaller, süperparamanyetik partiküller, kuantum dot (QD)'lar, karbon nanotüp (CNT)'ler, Ag/Au nanopartiküller ve Au yüzeyleri ve polimerik yapıların hazırlanmasında ve yapımında uygulanabilir. Fotosensitif (ışığa duyarlı) amino asit monomer bağlayıcılar sayesinde ışık yoluyla elektron aktarımı sağlanarak, tek adımlı çapraz bağlama reaksiyonuyla biyouyumlu, çok sayıda farklı mikro ve nano yüzeyli proteinler oluşturulabilir ve biyomoleküllerde bulunan tirozin, sistein ve triptofana kovalent bağlanarak konjugasyon gerçekleşebilir (Say, Biçen Ünlüer, Ersöz, Öziç, & Kılıç, 2015).

ANADOLUCA, yeniden ayrılabilir katı faz sistemleri, teranostikler (aynı anda tanı ve tedavi=therapi+diagnostik), nanoprotein taşıyıcılar, reseptör hedefli nanokargolar, biyosensörler, biyokataliz uygulamaları, yönetilebilir görüntüleme ve algılama teknolojileri gibi alanlarda kullanılacak yeni nesil nanobiyokonjugatların geliştirilmesine zemin oluşturan bir yöntemdir (Say, ve diğerleri, 2014).

Bu yöntem ile multifonksiyonel, biyouyumlu, stabil ve spesifik mikro ve nano biyokonjugatlar oluşturulabilir. Yöntem, kataliz ve determinasyonda kullanılır, birçok materyale uygundur, proteinlerin fonksiyonu ve konformasyonundan etkilenmez, pH ve sıcaklıktan bağımsızdır (Say, ve diğerleri, 2011).

ANADOLUCA yöntemine göre Nano-Anti-VEGF antikorunu sentezi, mikroemülsiyon yöntemi ile yapılmıştır. MATyr-Ru(bipyridyl)₂-MATyr ile karıştırılan Anti-VEGF antikorunu polivinil alkol (PVA) dispersiyonu içerisinde senteze bırakılır ve amonyum persülfat (APS) ilavesi ile Nano-Anti-VEGF antikorunu sentezi gerçekleştirilir (Ünlüer, Ersöz, Say, Tomsuk, & Sivas, 2013).



Şekil 2.7. bis(2-2'-bipyridyl)(MATyr)₂-Ruthenium (II)'nin şematik gösterimi (Köse, Say, & Ersöz, 2016)

2.4.2. Floresans ligandların biyokonjugasyonu

Görüntüleme bilimleri, son otuz yıl boyunca katlanarak büyümüş ve manyetik rezonans görüntüleme, nükleer tomografi görüntüleme ve X-ışını bilgisayarlı tomografisi gibi birçok teknik, klinik kullanımda vazgeçilmez bir hale gelmiştir. Görüntüleme teknolojilerindeki ilerlemeler ve insanlar ve küçük hayvanlar için görüntüleme problemleri, ilaç keşfi ile geliştirilerek genişletmekte ve süreci önemli ölçüde hızlandıracak bir potansiyele sahip olmaktadır (Rudin & Weissleder, 2003).

Hücrel moleküler görüntüleme, karmaşık bir yapı olan biyolojiyi ilaç keşfi ile birleştiren önemli bir teknolojidir. Hücrel görüntüleme geniş çapta betimleme bilimidir ve küçük ölçekli deneysel örneklerin kullanımına uygundur. Tipik olarak bir defada 10-1000

arasında hücrel veri toplayabilme kapasitesindedir. Hücrel görüntüleme, hedef bulma, hücre temelli tahlillerdeki uyuşturucu tarama, erken güvenlik değerlendirmesi, mod-of-action çalışmaları ve hücrenin yaşamsal sürecini izlemek için yapılan in vivo çalışmalar dahil olmak üzere, hücrelerin incelenmesini içeren hedef bazlı ilaç keşfi bunların tüm aşamalarında kullanılabilir (Lang, Yeow, Nichols, & Scheer, 2006).

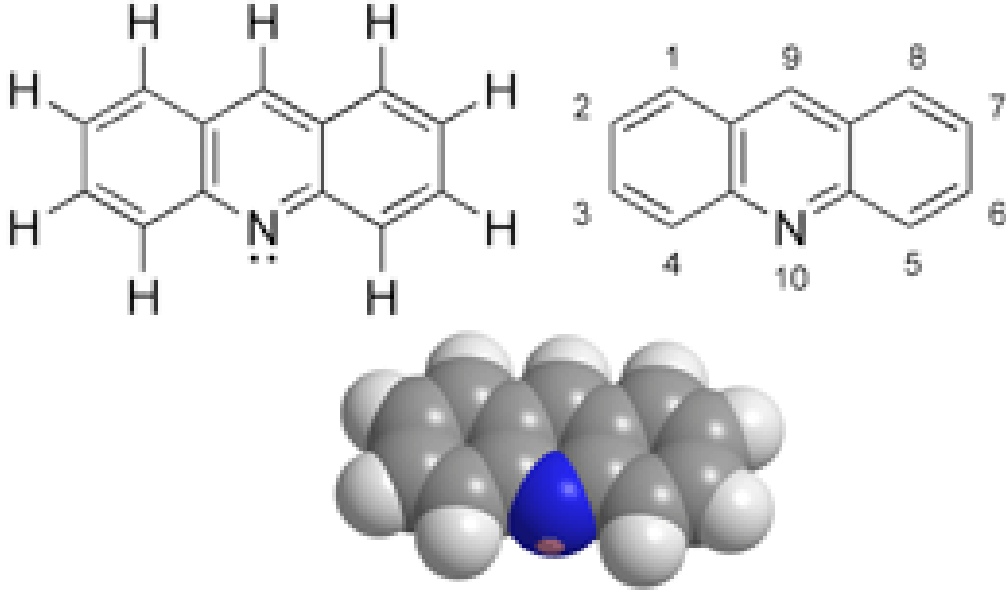
Bu yaklaşımda, bir görüntüleme probu doğrudan hedeflerle etkileşir. Örneğin, yapılan bir çalışmada tümör anjiyogenezinde rol oynayan bir vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörüne (VEGFR) karşı geliştirilen bir ilaç, görüntüleme probu olarak seçilen Cu'nun doğrudan VEGFR'ye bağlanması ile PET cihazında görüntülenmiştir. (Leyton & et al., 2005)

2.4.2.1. Akridin

Acridin Orange, yıllar önce zayıf bazik bir boya olarak kömür katranından izole edilmiştir. Çeşitli biyolojik aktiviteleri arasında, DNA ve RNA için spesifik olup, pH indikatörü, fotosensitör, antitümör ve antimalarya ilaçlarında kullanılabilir. Aynı zamanda bakterilerin, parazitlerin, apoptozun ve sperm hareketliliğinin incelenmesinde faydalı bir floresans boyadır (Kusuzaki, ve diğerleri, 2007).

Floresans görüntülemelerde kullanılan Acridin Orange, boyanın derişimi, pH, iyon dengesi, boyama süresi, fiksasyon vb. gibi faktörlere ve ayrıca incelenen dokuların özelliklerine bağlı olarak geniş bir varyasyon göstermektedir (von Bertalanffy, 1963). Metakromatik bir özellik olarak derişime bağlı olarak yeşil veya kırmızı olarak ışımaya yapabilir (Strugger, 1949).

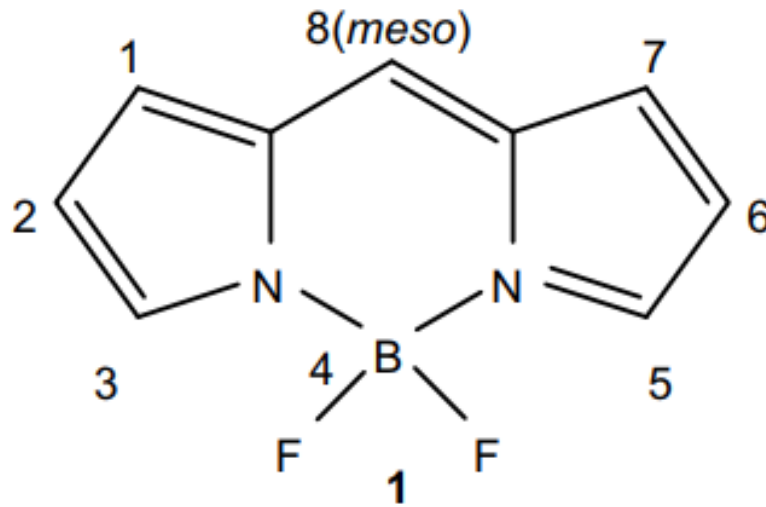
Akridin'in kimyasal molekülü (Şekil 2.8), $C_{13}H_9N$ olup molekül ağırlığı $179,22 \text{ g.mol}^{-1}$ 'dir. Molekül ağırlığı düşük olduğu için hücrelerin sitoplazmasında hızlı bir şekilde yayılarak DNA, RNA, lizozom ve diğer asidik veziküllere bağlanır (Kusuzaki, ve diğerleri, 1999). Uluslararası Kanser Araştırmaları (IARC), bu maddenin insanlar için kanserojen olmadığını belirtmiştir (International Agency for Research on Cancer., 1978).



Şekil 2.8. Akridin'in kimyasal yapısı (Favre & Powell, 2013)

2.4.2.2. BODIPY

4,4-Difloro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, ilk olarak 1968'de rapor edilen bir borondifluorid dipirrinato kompleksidir. Birçok BODIPY türevi yoğun floresans özelliği gösterir (Treibs & Kreuzer, 1968). PH ve polarite değişimlerine karşı nispeten duyarsızdırlar ve birçok biyolojik koşul altında kararlıdırlar (Monsma, ve diğerleri, 1989). Bu nedenle Şekil 2.9'da görülen BODIPY analogları protein ve nükleik asitlerin etiketlenmesinde faydalı uygulamalarda kullanılmışlardır (Yee, Fas, Stohlmeyer, Wandless, & Cimprich, 2005).



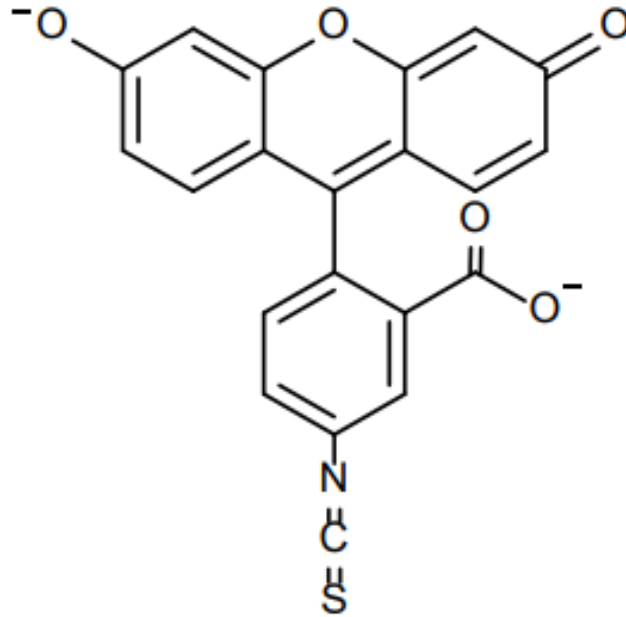
Şekil 2.9. BODIPY'in kimyasal yapısı (Tram, Yan, Jenkins, Vassiliev, & Bruce, 2009)

2.4.2.3. FITC

Floresein izotiyosiyanat (FITC), akış sitometrisi de dahil olmak üzere geniş kapsamlı uygulamalarda kullanılan bir floresein türevidir. Şekil 2.10'da görülen FITC, yapısının alt halkasındaki bir hidrojen atomunun yerine, bir izotiyosiyanat reaktif grubu (-N = C = S) ile işlevselleştirilen orijinal floresan molekülüdür. Molekül formülü $C_{21}H_{11}NO_5S$ olup molekül ağırlığı $389.38 \text{ g.mol}^{-1}$ 'dir. Bu türev, proteinler üzerindeki amin ve sülfhidril gruplarını içeren nükleofillere karşı reaktiftir.

"NHS-floresein" oluşturan floresein çekirdeğine eklenen bir süksinimidil ester fonksiyonel grubu, diğer nükleofiller varlığında primer aminlere karşı çok daha fazla spesifikliğe sahip başka bir amin reaktif türevi oluşturur.

FITC'nin uyarma ve emisyon spektrumu tepe dalga boyları yaklaşık $495 \text{ nm} / 519 \text{ nm}$ olup yeşil bir renk verir. Çoğu florokrom gibi, fotobloklama eğilimi gösterir (fluorophores.org, 2017).



Şekil 2.10. FITC'in kimyasal yapısı (Barbero, Barolo, & Viscardi, 2016)

2.4.3. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi

Dairesel Dikroizm (CD) Spektroskopisi, moleküllere ait daireysel spektrumları belirli dalga boylarında ölçen spektroskopik bir yöntemdir. CD, daireysel polarize ışığın sola doğru olan absorpsiyonu ile sağa doğru olan absorpsiyonu arasındaki farkı ölçer.

$$\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_{\text{sol yönlü polarize ışık}} - A(\lambda)_{\text{sağ yönlü polarize ışık}}$$

(λ = Dalga boyu)

CD spektroskopisi, proteinlerin sekonder yapılarının sıcaklık, pH değişimleri, ortam koşullarına bağlı olarak değişimleri ve diğer moleküllerle etkileşimini incelemek amacıyla geliştirilmiş olup, makro moleküllerin yapısal, kinetik ve termodinamik özellikleri hakkında bilgi vermektedir. Spektrofotometrik ölçümler, elektronik geçişlerin gözlemlendiği elektromanyetik spektrumun görünür ve UV bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Ölçümler, proteinlerin ikincil yapılarına ait α -heliks, β -katlanmaları ve düzensiz sarmal yapılarının yanı sıra, tersiyer yapılarındaki aromatik grupların da varlığını gösteren bilgiler vermektedir.

CD spektroskopisinin genellikle biyomoleküllere uygulanmasının nedeni, moleküllerin sağa ve sola çevirici kiralitelerinden ileri gelmektedir. Proteinlerin konformasyon değişikliklerinin ifade edilmesinde CD spektroskopisi oldukça önem taşımaktadır. Örneğin, sıcaklık, denatüre edici ajanlar ya da bu ajanların derişimleriyle proteinlerin ikincil yapılarındaki değişiklikleri incelemek amacıyla kullanımı yaygındır (Siligardi & Hussain, 2015).

2.5. Amaç

Bu çalışmanın öncelikli amacı, daha önce çeşitli isimlerle monoklonal antikor olarak üretilmiş Anti-VEGF antikorunu rekombinant teknoloji ile üreterek daha kolay, daha yüksek saflıkta, maliyeti daha düşük, hayvan deneyleri gerekmeksizin, ekspresyonu kontrol edilebilir ürün elde etmektir. Bu amaç doğrultusunda; Anti-VEGF antikorunun dizilerinden elde edilen veriler kullanılarak uygun primerler tasarlanması, bu primerlerle klonlanan gen için uygun klonlama ve ifade konakçıları ile uygun plazmit vektörlerin seçilerek transformasyonunun ve ekspresyonunun sağlanması, eksprese edilen 6X histidin takılmış proteinin nikel afinite kromatografisi ile saflaştırılması ve gerekli karakterizasyonların tamamlanması hedeflenmiştir.

Çalışmanın ikinci hedefi olarak; immunoglobulin yapıda olan Anti-VEGF antikorunun sadece VEGF'ye spesifik olarak bağlanan iki zincirinin rekombinant tekniklerle birbirine bağlı olarak üretilmesi ve bu sayede tek bir molekül halinde elde edilebilmesi amaçlanmıştır.

Son olarak; tek bir zincir halinde rekombinant olarak ifadesi sağlanan Anti-VEGF antikorunun dış ortam koşullarına daha dayanıklı olması ve uzun soluklu kullanılabilirliğinin ve görüntülenmesinin sağlanması için ANADOLUCA metodu ile çapraz bağlanması yoluyla Nano-Anti-VEGF haline getirilmesi ve karakterizasyonu hedeflenmiştir. Nano-Anti-VEGF'nin ilaç sektöründe, tedavi sürecinin nasıl devam ettiğini izleyebilmek amacı ile moleküler görüntüleme teknolojisi sayesinde takip edilebilirliğini sağlamak için akridin, BODIPY ve FITC gibi farklı floresans özellikteki maddeler ile konjugatının yapılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL

3.1. Kullanılan Enzimler ve Kitler

Deneysel işlemlerde kullanılan enzimler ve kitler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. *Kullanılan enzimler ve kitler*

cDNA Sentez Kiti	İnvitrogen, Amerika
Hybrid-R Total RNA izolasyon kiti	GeneAll, Güney Kore
QIAquick Jelden İzolasyon Kiti	Qiagen, Almanya
Taq Polimeraz	Sigma, Amerika
Ticari Anti-VEGF Antikor	Sigma, Amerika
RNaseOUT Rekombinant RNase	Thermo, Amerika
SuperScript III Reverse Transcriptase	İnvitrogen, Amerika

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Deneysel işlemlerde kullanılan kimyasallar Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. *Kullanılan Kimyasallar*

6X DNA Jel Yükleme Boyası (R1151)	Thermo Scientific, Amerika
Agaroz (A5093)	Sigma, Amerika
Akrilamid (A8887)	Sigma, Amerika
Ampisilin (A1593)	Sigma, Amerika
Borik Asit (423485000)	Acros, Amerika
dNTP (10297018)	Fermentas, Amerika
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (1001345108)	Sigma, Amerika
Ethanol (1310861214)	Panreac, İspanya

Tablo 3.2. (Devam) Kullanılan Kimyasallar

HCl (H1758)	Sigma, Amerika
İsopropanol (563935)	Sigma, Amerika
Kloroform (52,873-0)	Sigma Aldrich, Amerika
MgCl (S5573033 306)	Merck, Amerika
NaCl (141659.1211)	Panreac, İspanya
NaOH (06203)	Sigma, Amerika
Polivinil Alkol (PVA) (363170)	Sigma, Amerika
SYBER Green (S9430)	Sigma-Aldrich, Amerika
Tetramethylethylenediamine (TEMED) (T9281)	Sigma, Amerika
Triptofan (T2610000)	Sigma, Amerika
Trizma Base(T1503)	Sigma, Amerika
Yeast Ekstrakt (7184A)	Acumedia, Amerika
MaTyr-Ru(Bipyr)2-MaTyr	ANADOLUCA
DNA/EcoRI+HindIII Marker (SM0193)	Fermentas, Amerika
Asetik Asit (71251)	Sigma, Amerika
Tris (K41623287 118/500G)	Merck, Amerika

3.3. Biyolojik Materyaller

3.3.1. Kaynak

Bu çalışmada kullanılan insan kanında Anti-VEGF antikoru bol miktarda bulunur.

3.3.2. Klonlama ve protein ifade konakçıları

Çalışma kapsamında; Anti-VEGF geninin klonlanması ve rekombinant protein ifadesi amacıyla iki farklı *E. coli* ırkı kullanılmıştır. Genlerin klonlanmasında *E. coli* DH5- α (genotipi: F⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44

λ -*thi-1 gyrA96 relA1*) ırkı kullanılacaktır. *E. coli* DH5- α rutin klonlama çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve yüksek transformasyon etkinliği sağlayan bir ırktır. Irka ait rekombinasyon (*recA*) ve endonükleaz (*endA*) aktivitelerini yerine getirecek enzim sistemleri baskılanmıştır. Bu da plazmite klonlanan parçanın bozunmadan kararlı olarak taşınmasını sağlamakta ve plazmit saflaştırılmasında plazmit kalitesini arttırmaktadır. Ayrıca *E. coli* DH5- α ırkı uygun plazmitler ile pozitif kolonilerin seçilmesi için mavi/beyaz tarama yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Mavi beyaz seçimde plazmitin çoklu klonlama bölgesi kromojenik bir substrat olan XGal'i parçalayabilen (parçalanma ürünü olarak mavi renk oluşumu gözlenir) *lacZ* geninin içerisine yerleştirilmiştir. Eğer klonlanmak istenen DNA fragmenti çoklu klonlama bölgesine ligasyon ile aktarılabilirse *lacZ* geninin bütünlüğü bozulduğundan aktif bir protein oluşturulamayacak ve dolayısıyla XGal ortamda parçalanmadan kalacaktır (Parçalanma gerçekleşmediğinde hücreler beyaz, aksi durumda mavi renkli gözlenirler). Bu sayede klonlama verimi ve pozitif klon sayısına rahatça ulaşılabilir. Bu sayede klonlama verimi ve pozitif klon sayısına rahatça ulaşılabilir.

Rekombinant enzimlerin heterolog ifadesinde ise *E.coli Rosetta* (*F_{ompT} hsdS_B(τ _B⁻ m_B) gal dcm* (DE3) pRARE (Cam^R)) ırkları kullanılacaktır. Belirtilen ırk protein ifadesi için özelleşmiş olup, *E. coli*'de nadir olarak sentezlenen 6 adet tRNA'yı (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC ve GGA kodonları için), sahip olduğu pcDNA3.1 plazmiti aracılığıyla ifade ederek rekombinant proteinlerin ifadesini arttırıcı özelliğe sahiptir. Böylece ırk universal bir protein ifadesi sağlamaktadır. Ayrıca ırk kloramfenikole direnç özelliğine de sahiptir.

3.3.3. Vektörler

Bu çalışmada; Anti-VEGF geninin klonlanması ve protein ifadesi amacıyla iki farklı plazmit DNA kullanılmıştır. Anti-VEGF geninin klonlanması için pGEMT-Easy vektörü (Promega), rekombinant protein ifadesi için ise pcDNA3.1 vektörü (Qiagen) kullanılmıştır. **pGEMT-Easy** plazmitinin klonlama bölgesine sarkık timin bazları yerleştirilmiş ve plazmit üzerinde bulunan 3' uçların fosfat grupları çıkarılmıştır. Bu sayede; plazmitin ligasyon esnasında halkasal yapı oluşturması engellenerek klonlama etkinliği artırılmıştır. Klonlama bölgesi plazmit üzerinde β -galaktosidaz enzimini üreten *lac-Z* geni içerisine yerleştirilmiştir. Bu sayede; pozitif klonların taranması kolonilerdeki renk farklılığına göre yapılabilir. Rekombinant proteinlerin ifadesi amacıyla kullanılacak olan pcDNA3.1 vektörü, *E. coli*'de yüksek miktarda protein ifadesi için oluşturulmuş bir vektördür.

Ayrıca çalışma kapsamında rekombinant DNA tekniklerinin uygulanması amacıyla DNA Polimeraz, DNA Ligaz, Restriksiyon Endonükleaz gibi çeşitli enzimler kullanılmıştır.

3.4. Tamponlar ve Solüsyonlar

Deneylerde kullanılan tamponlar ve solüsyonlar Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. *Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar*

Solüsyon / Tampon	İçerik
Akrilamid-Bis Çözeltisi (A çözeltisi)	29,2 g Akrilamid 0,8 g Bis H ₂ O (100 mL’ye tamamlanır.)
%10 Amonyum Persülfat (E çözeltisi)	0,5 g Amonyum persülfat H ₂ O (5 mL’ye tamamlanır)
%10 Sodyumdodesil sülfat (SDS) çözeltisi (D çözeltisi)	10 g SDS H ₂ O (100 mL’ye tamamlanır)
4X SDS Ayırma Jeli Tamponu (B çözeltisi)	18,15 g Tris (1,5 M) 3 N HCl (pH 8,8’e ayarlanır) H ₂ O (100 mL’ye tamamlanır.)
4X SDS Yükleme Jeli Tamponu (C çözeltisi)	3 g Tris 5 N HCl (pH 6,8’e ayarlanır) H ₂ O (50 mL’ye tamamlanır)
5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE)	54 g Tris-base 27,5 g Borik Asit 900 mL H ₂ O 20 mL 0,5M EDTA
Ampisilin Stok	1 g Sodyum Ampisilin Otoklavlanmış Distile Su (10 mL’ye tamamlanır.)
LB Besiyeri	10g Triptofan 5g Yeast Ekstrakt 10g NaCl Otoklavlanmış Distile Su (1 lt’ye tamamlanır.)
Aktarım Tamponu (Towbin Tamponu)	6 g Tris-base 28,8 g Glisin 2 g SDS 1,5 lt H ₂ O 400 mL Metanol
2X SDS örnek uygulama tamponu	2,5 mL Tris (C çözeltisi) 4 mL SDS (D çözeltisi) 2 mL Gliserol 1 mL 2-Merkaptoetanol 0,02 g Bromofenol Mavisi H ₂ O (100 mL’ye tamamlanır)
5X Tank Tamponu	15 g Tris 72 g Glisin 5 g SDS H ₂ O (1 lt’ye tamamla)
SDS Boyama Çözeltisi	500 mL Metanol 1 g Coomassie Brilliant Blue 100 mL Asetik Asit (glasiyel) H ₂ O (1 lt’ye tamamla)
SDS Yıkama Çözeltisi	125 mL Metanol 175 mL Asetik Asit (glasiyel) 2200 mL H ₂ O
SDS Fiksatif Çözeltisi	500 mL Metanol 100 mL Asetik Asit 400 mL H ₂ O

3.5. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Sarf Malzemeleri

Deneylerde kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. *Kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri*

+4 Buzdolabı	Liebherr, Medline, Almanya
-20 Buzdolabı	Liebherr, Medline, Almanya
Agaroz Jel Elektroforezi	Cleaver, Scientific Ltd., İngiltere
Büyük Santrifüj	Sigma, Amerika
CD Spektrofotometre	Chirascan plus, Applied Photophysics, İngiltere
Elektroforez	Thermo Scientific, Amerika
ELİSA Reader	BioTek Synergy H1, Amerika
Etüv	Innovens, Jouan, Amerika
Floresans	Varian, Amerika
Floresans Küvet	Hellma Analytics, Almanya
Hassas Terazı	Ohaus, Pioneer, Amerika
Jel Görüntüleme	Cleaver, Scientific Ltd., İngiltere
Küçük Santrifüj	Hettich, Almanya
Liyofilizatör	Labconco, FreeZone, Amerika
Manyetik Karıştırıcı	Jeio Tech, Lab Companion, Amerika
Mikro Santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya

Tablo 3.4. (Devam) Kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri

Mikropipet uçları	Isolab, Almanya
Mikrosantrifüj	Isolab, Almanya
Mikroskop	Leica, Almanya
Plimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	Bioneer, Kore
PCR tüpleri	Isolab, Almanya
pH metre	Hanna H1 2211 pH/ORP, Amerika
Pipetör	Brand, Transferpette, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Zeiss Ultra Plus, Almanya
Shaker	Thermo, Amerika
Steril Kabin	Nükleon, Türkiye
Su Banyosu	Clifton, İngiltere
Ultrasonik Su Banyosu	Lab Companion, Amerika
Vortex	Stuart, İngiltere
Western Blot	Biorad, Elektrobloiting, Amerika
Zeta	Malvern, İngiltere

4. YÖNTEM

4.1. Biyoinformatik Analizler

Çalışma kapsamında klonlanarak rekombinant protein olarak üretilecek Anti-VEGF geninin *insan* genomunda belirlenmesi, belirlenen aday genlerin diğer organizmalardaki genler ile benzerliklerinin ortaya konması, *E. Coli*'de heterolog protein ekspresyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla yapılacak klonlama çalışmalarında kullanılacak primer DNA dizilerinin belirlenebilmesi için NCBI Genbank gibi veri tabanları ile BLAST, ClustalW, WebCutter gibi çeşitli temel biyoinformatik araçlardan yararlanılmıştır.

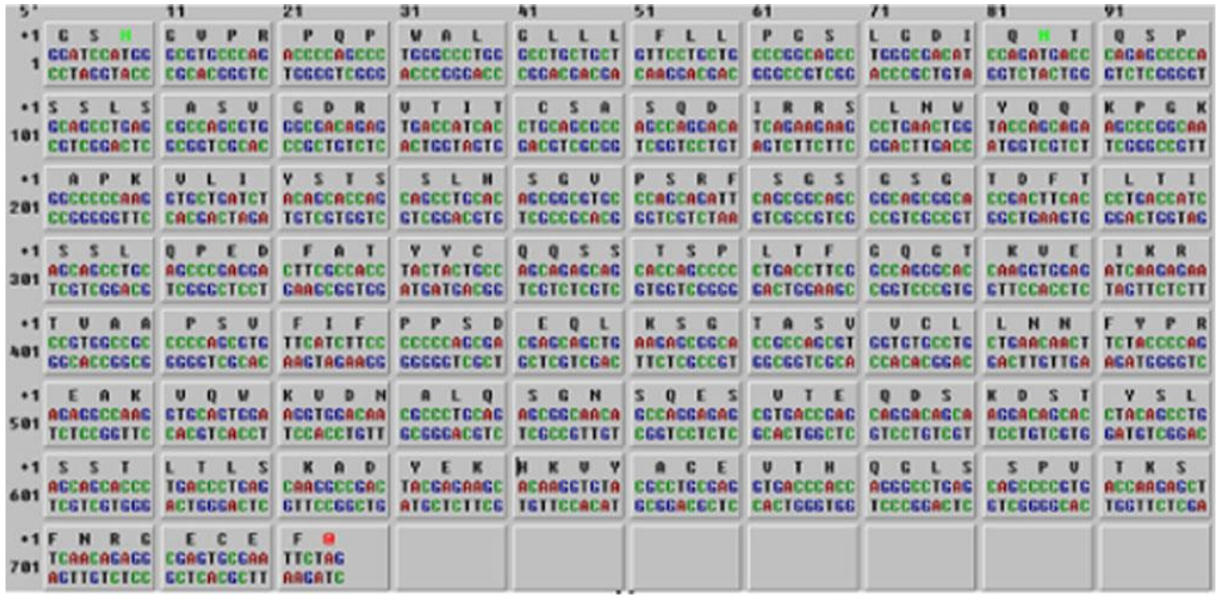
4.1.1. Aday genlerin tayini:

Çalışma kapsamında Anti-VEGF enziminin rekombinant olarak üretilebilmesi amacıyla, *insan* seçilmiştir. Organizmanın genomunda yer alan Anti-VEGF enzimini kodlayan protein ve DNA dizilerine NCBI veri tabanlarından ulaşılmıştır. Anti-VEGF geni DNA ve protein dizileri Şekil 4.1'de ve Şekil 4.2'de verilmiştir.

4.1.2. Nükleotid ve aminoasit dizisi

1	GATCTCCAGC	AACCGGCCCC	ACTCCAGTCC	CGAGAGAGCC	CACATCCACCA	ACACCTCCCC	GAGCACCTAC	TCCACCTCC	ATTATTCGA	CGCCAGACC
-1	D L E E	K G P S	L S L	S K Q	T Y H H	H L A	E H H	U S C S	F U N	G Q Q
101	CATCTCTCT	TCGCCAGGT	CACCTTCCG	TACAGGACA	ACCTGCCCTC	GCTCTCCAGC	ACGGGGGGC	TGGCTTCTA	CTTCTCTCC	CGCTCCCGT
-1	U R S K	D U T	L K S	V L F F	T E G R G G G	C G C A G G T C	T G C C C C C C	A C C A G A C T	C A A C A A G C	C G C C G G C A
201	TCTCTCCCA	GTCCAGCCC	ATCTCCCTG	GGTAGAGCC	ETTCACAGG	CAGCTCAGC	TCACCTGTT	CTTGGTCATC	TCCTCTCTC	TGGGGCCAG
-1	S E W	E U A	I D S P	V F G	C E A T E T T C C	G A A G T G G C	A C T G C A C C A	G A A C A G T A G	A G G G A G C	A C C C C C G T C
301	CCCTACAGC	CCGGCTCTC	TGGGCTGGC	CTTGGCTTC	CTATGGTCT	TCTCATGGC	GGGGGGGAG	CCCTCTCTC	TCACCTTCA	CTTCTACTC
-1	T Y U	G P E H	P Q G	K A K	S I T K	E I P	A P L	A K H S	U K C	K V E
401	TTCCTTCA	CCCAGCTC	ATCCAGCAC	ATCCAGCAC	TCCACACTC	GTAGGTCTC	TTTACTGCT	CCCTCTGGC	CTTGGTCTC	CCCTTCTCA
-1	K E N L	U D Q	H L U	T L U S	V U R	V T S	N V Q E	E R P	K T K	A N H U
501	CCCTCCAGC	GTCCAGTAC	CACCTCACT	TCACCTGGC	CTCCCTGGC	CTCAGCTCA	CCACACGCA	GGTCACTCC	GGGGTCTCC	TCATCATAC
-1	E U G	D U V	M H F K	U E P	D E H	S U D U	U U G	T U E	F T H S	I A L
601	CCCTCTCTC	CCGATCCGC	CCACAGGAA	CACCTGGCC	CCCGGCTGT	CGAGGGGGC	CCGCTCCGC	CCCTCCACA	GGTCTTCTC	CCACCTTTC
-1	I D K	P R P P	F L F	U S P	E R L L	E P A	P C P	P C T H	T K D	C S K
701	CCCTCCAGC	TCTTCTCAC	ATCCAGTAC	ATCCAGTAC	CTTGGCTTC	CTTGGCTTC	CTTGGCTTC	CCAGCTCTC	CTTGGCTTC	CTTGGCTTC
-1	P E U K	K D U	K T N	S P K H	N U H	E I Y	C A G A C C A C	L S S	S P U	T U S
801	TCTCCAGCT	GTACAGCCC	CTTCTCTCA	CTTCTCTCA	CTTCTCTCA	CTTCTCTCA	CTTCTCTCA	CTTCTCTCA	CTTCTCTCA	CTTCTCTCA
-1	S L S	V L G	S S Q L	U A P	F T H	U G S T	L A G	S H M	S U T U	P E P
901	AACTACTCC	TTACAGGCG	ATCCAGGCG	ATCCAGGCG	ATCCAGGCG	ATCCAGGCG	ATCCAGGCG	ATCCAGGCG	ATCCAGGCG	ATCCAGGCG
-1	F Y D	A T G L C	G L R	A T G	G S T	K S S	P A L	P F U S	P G K	T S A
1001	CTCTCCAGC	TCACAGGCT	CCCTCCAGC	CACACCTCA	ACTACAGTA	CCCTCCAGC	AAACAGTAA	CCCTCCAGC	CTTGGCTTC	AGCTTCTCA
-1	S U T	U L T	G Q G	M U D F	V W V	P L F	F U V U	A T D	E A H	L S H
1101	TCTCCAGCT	CCCTCCAGC	TTCTCTCTC	CCACCTCA	CCCTCCAGC	CTTCTCTCA	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC
-1	Q L V	A T S	K S T D	L S F	T F R	R K F D	A R Y	I P E	E D P	T I G
1201	CCCTCCAGC	TCACAGGCT	ATCCAGGCT	ATCCAGGCT	ATCCAGGCT	ATCCAGGCT	ATCCAGGCT	ATCCAGGCT	ATCCAGGCT	ATCCAGGCT
-1	G U M	E L G K	G P A	Q R U	M H I E	M V G	F T V	G S A A	G S L	A G A C C C A C
1301	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC	CCCTCCAGC
-1	E E P Q	U L G	E G S	E U L Q	W F E	L S E	P L L I	L L L	E L A	M P Q P
1401	CTCTCCAGC	CCCTCCAGC	TT	AA						
-1	R P U	G L L	K							

Şekil 4.1. Anti-VEGF antikorunun ağır zincir DNA ve protein dizisi (Hajirezaei, Darbouy, & Kazemi, 2014)



Şekil 4.2. Anti-VEGF antikorunun hafif zincir DNA ve protein dizisi (Hajirezaei, Darbouy, & Kazemi, 2014)

4.1.3. Primer dizilerin tasarımı; Belirlenen aday genlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması amacıyla kullanılacak primer DNA'larının tasarımı için;

- i) İlk olarak aday gen dizileri ClustalW ile restriksiyon kesim analizine alınmış ve gen bölgesini kesmeyen restriksiyon enzimleri belirlenmiştir,
- ii) Sonrasında bu enzimlerden pcDNA3.1 vektörünün çoklu klonlama bölgesinde bulunanların kesim dizileri, primer dizilere eklenerek primer dizilerin tasarımı gerçekleştirilmiştir,
- iii) Tasarlanan primerler BLAST ile analiz edilmişlerdir. PCR reaksiyonlarında kullanılacak primer DNA dizileri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Anti-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) geninin PCR amplifikasyonunda kullanılacak primer DNA dizileri (Hajirezaei, Darbouy, & Kazemi, 2014)

Gen	Primer Adı	Primer DNA dizisi	Restriksiyon Enzimi	Bç. Uzunluğu	Tm
Anti-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	F-VEGF	5'- CGGCCGCCACTGTGCTGGATATGGGCG TGCCAGACCCCA-3'	SaI	40	77°C
	R-VEGF	5'- GTGTGGTGAATTCTGCAGATTGCCGG GGCTCAGGCTCAGG-3'	HindIII	41	74°C

4.2. Deneysel Yöntem

4.2.1. Total RNA izolasyonu

Hybrid-R total RNA izolasyon kitine göre EDTA'lı tüpe alınan kan örneği 1er mL mini santrifüj tüplerine alınmış ve her 1×10^7 hücre sayısı için 1 mL RiboEx solüsyonu ile muamele edilerek homojenizasyonu sağlanmıştır. 12000 g'de 10 dak 4°C'de santrifüj edilerek hücre kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Kullanılan her 1 mL'lik RiboEx solüsyonu için 200 µL kloroform eklenerek karıştırılmıştır. 15 dak 12000 g'de 4°C'de santrifüjden sonra üstteki sıvı faz temiz bir tüpe alınmıştır. Tüpteki miktar kadar RBI solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Tüpteki karışımdan 700 µL alınarak mini spin kolonuna aktararak 10000 g'de 30 sn oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir ve kolondan geçen kısım ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlem tüm karışımlar bitene kadar tekrarlanmıştır ve mini spin kolonda RNA'ların tutunması beklenmiştir. 500 mL SWI tamponu eklenip 10000 g'de ardından RNW tamponu eklenip tekrar 10000 g'de 30'ar sn oda sıcaklığında santrifüj edilmiş ve her seferinde kolondan geçen kısım uzaklaştırılmıştır. Yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 1 dak 10000 g'de santrifüj yapılmış ve kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. 50-100 µL nükleaz free su eklenerek kolonda kalan RNA'lar 10000 g'de 1 dak'lık santrifüjle elüe edilmiş ve nanodrop ile miktarı ve saflığı ölçülerek daha sonradan kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

4.2.2. cDNA sentez

20 µL'lik her bir reaksiyon için daha önceden izole edilen total RNA'dan 5 µL, 1 µL oligo(dT)₂₀ ve 1 µL 10 mM dNTP nükleaz free mikrosantrifüj tüplerine konularak üzeri steril, distile su ile 13 µL'ye tamamlanmıştır. 5 dk 65°C'de inkübe edilmiş ve en az 1 dk buz içinde bekletilmiştir. Ardından 4 µL 5X First-Strand Buffer, 1 µL 0.1 M DTT, 1 µL RNaseOUT Rekombinant RNase İnhibitor ve 1 µL SuperScript III RT eklenerek hafifçe pipetleme yapılarak karıştırılmıştır. Daha sonra, 50°C'de 60 dk inkübe edilerek ve reaksiyonun aktivasyonunu durdurmak için 15 dk 70°C'de ısıtılmıştır.

4.2.3. Anti-VEGF proteinine ait genin klonlanması

Bu aşamada yukarıda belirlenmiş olan genlerin genomik kopyalarının PCR ile elde edilmesi, elde edilen PCR ampikonlarının taşıyıcı vektörlere ve ardından *E. coli*'ye aktarılması hedeflenmiştir. Bu işlemde kullanılan PCR malzemeleri ve miktarları Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2. PCR malzemeleri ve miktarları

PCR malzemeleri	Miktarı
PCR tamponu [200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]	2,5 µL
MgCl	0,75 µL
dNTP	0,5 µL
İleri primer	0,5 µL
Geri primer	0,5 µL
Kalıp cDNA	0,2 µL
Taq Polimeraz	1 µL
Su (otoklavlanmış distile su)	19,05 µL
Toplam	25 µL

4.2.3.1. Genin protein kodlayan bölgelerinin pcDNA3.1 vektörüne klonlanması ve *E.coli*'ye transformasyonu

İnsan kan serumundan Anti-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) geninin genomik kopyalarının üretilmeleri amacıyla genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. gDNA izolasyonu “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” kitabı temel alınarak oluşturulan protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Sambrook & Russell, 2001). Elde edilen gDNA, kalıp olarak kullanılarak aday genlerin amplifikasyonu tasarlanacak primer DNA'lar yardımıyla gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunda kaynak DNA olarak *insan* genomik DNA'sı kullanılmıştır. PCR reaksiyonu GSTz spesifik (F ve R) primerlerle kurulmuştur; 2.5 µL 10X tampon, 2.5 µL 25 mM MgCl₂, 2 µL 2.5 µM dNTP karışımı, 2.5 µL F, 2.5 µL R, 0.5 µL genomik DNA (1.220 ng/µL), 0.2 µL Taq DNA Polimeraz enzimi (5UµL⁻¹) üzerine son hacmi 25 µL olacak biçimde 12.3µL ddH₂O eklenmiştir. Sonrasında PCR reaksiyonu %1'lik agaroz jelde analiz edilmiş ve ilgili genlere ait istenen büyüklükteki DNA bantları jelden kesilip saflaştırılmıştır.

Elde edilen amplikonlar TA klonlama ile **pGEMT-Easy** vektörüne ve ardından *E.coli* **DH5-α** konakçısına ısı şoku ile aktarılmıştır. Pozitif klonların belirlenmesi için öncelikle “Klonlama ve Protein İfade Konakçıları” kısmında anlatıldığı prensiple Mavi-Beyaz seçim yapılarak, sonrasında elde edilen beyaz klonlar koloni PCR ile taranmıştır. Koloni PCR işleminden sonra istenen büyüklüğe ait klonlardan saflaştırılan plazmitlerde yer alan insert DNA fragmentleri kendilerini iç bölgeden tanıyarak kesen restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Bu koloni PCR ve restriksiyon kesim analizi, dizi analizi ile kontrol edilmiş ve

rekombinant plazmit sayısını minimuma indirmek için yapılmıştır. Koloni PCR ve restriksiyon analizi sonucunda belirlenen plazmit DNAlar dizi analizi ile kontrol edilmiş ve pozitif klonlar belirlenmiştir. Dizi analizi işlemi hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Belirlenen pozitif klonlardan saflaştırılan plazmit DNAlar Tablo 4.1.'de belirtilen ve primer DNAlar üzerinde tanıma dizileri bulunan uygun restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonuna alınmış ve saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürün aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş olan pcDNA3.1 vektörüne aktararak **6X-His** kuyruğu eklenmiştir. Oluşturulan rekombinant plazmitler yukarıda belirtildiği şekilde koloni PCR, restriksiyon kesim analizi ve DNA dizi analizi ile teyit edilmiş ve sonrasında *E.coli Rosetta* ırkına ısı şoku kullanılarak aktarılmıştır.

4.2.4. Anti-VEGF enzimine ait proteininin E. coli'de heterolog protein olarak üretilmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu

Belirtilen deneylerde, elde edilen pozitif klonlarda enzimlerin üretilmesi, saflaştırılmaları ve enzimatik karakterizasyonlarının yapılması hedeflenmiştir.

4.2.4.1. 6X-His takısı eklenen enzimlerin E.coli Rosetta ırkında heterolog üretimi ve Nikel afinite kromatografisi ile saflaştırılmaları

Moleküler klonlama işlemleri sonucunda elde edilen pozitif klonlardan enzimlerin saflaştırılması için klonlar amfisilin ($0,1 \text{ mgmL}^{-1}$) içeren LB ortamında $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de, OD_{600} değeri $0,6-0,8$ değerine gelinceye kadar inkübe edilmiş ve ardından IPTG ile indüklenerek (yaklaşık 6 sa) proteinin aşırı şekilde ifade edilmesi sağlanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerden toplam protein izolasyonu ve bunu takiben de Nikel afinitesi ile 6X-His takısına sahip rekombinant proteinlerin saflaştırılması gerçekleştirilir. Histidin takısına sahip rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında yüksek miktarda ve yüksek saflıkta ürün elde edilebildiği için Nikel afinitesi ile saflaştırma tercih edilmiştir (Steinert, Artz, Fabis, & Ribbe, 1996).

Saflaştırma sonrasında elde edilen proteinlerin başarılı bir şekilde ifade edilip edilmedikleri ve saflaştırılan proteinin moleküler ağırlığı Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile analiz edilmiştir. Ayrıca Western blot tekniği kullanılarak saflaştırılan proteinin histidin takısına sahip olup olmadığı Anti-His antikoru ile teyit edilmiştir.

Heterolog ekspresyon sonucu elde edilen proteinlerin doğal formlarının molekül kütlelerinin belirlenmesi için Jel filtrasyon kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan protein miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir.

4.2.5. Nano-Anti-VEGF sentezlenmesi

Nanoprotein yapılar, R.Say ve arkadaşlarının geliştirdiği “aminoasit monomer dekore edilmiş rutenyum şelatlarının ışık etkili konjugasyon” (AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach-ANADOLUCA) metodu kullanılarak, monomerlerin mikroemülsiyon tekniği ile sentezlenip, herhangi bir deformasyona uğramadan tekrar tekrar kullanılabilirliği sağlanmıştır. PVA deiyonize suda dispers edilerek oluşturulan mikroemülsiyon ortamına, nano hale getirilmek istenen protein gibi biyomolekül ile rutenyum-şelat temelli fotosensitif çapraz bağlayıcı etkileştirilerek eklenmiştir. Reaksiyon 48 sa, oda sıcaklığında, inert bir ortamda (azot gazı altında) gerçekleştirilmiştir. Santrifüjle reaksiyon ortamından uzaklaştırılan nanoprotein yapılar yıkama işleminden sonra +4°C’de saklanmıştır. Elde edilen ürünün güçlü asidik ve bazik ortamlara, yüksek ısıya daha dayanıklı olup, daha uzun ömürlü ve tekrar tekrar kullanılabilir olduğu gözlenmiştir.

4.2.6. Karakterizasyon çalışmaları

Rekombinant olarak üretilen ve kontrol için kullanılan ticari Anti-VEGF’lerin nanoprotein yapıların karakterizasyonları için Zeta ile boyut analizi ve SEM ile yüzey morfolojileri incelenmiştir.

4.2.6.1. Boyut analizi

Ticari Anti-VEGF’den sentezlenen Nano-Anti-VEGF ve rekombinant olarak üretilen Anti-VEGF’den sentezlenen Nano-Anti-VEGF çözeltileri liyafilize edildikten sonra 10.000 ppm lik stoklar halinde hazırlanmışlardır. Zeta boyut analizi için 1000 ppm olarak seyreltilmiş ve ultrasonik su banyosunda dispers edildikten hemen sonra analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.2.6.2. Yüzey morfolojisi

Ticari Nano-Anti-VEGF ve Rekombinant Nano-Anti-VEGF çözeltileri lamel üzerine 2şer µL damlatılarak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra SEM cihazının örnek haznesine yerleştirilmiş ve vakum altında altın tabakası ile kaplanmıştır. Ardından SEM ile moleküllerin yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

4.2.6.3. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi

2000 ppm olarak hazırlanan ticari Anti-VEGF ile rekombinant Anti-VEGF’nin CD spektroskopisine bakılmış daha sonra nanobiyokonjugat olarak sentezlenen Ticari Nano-Anti-

VEGF ile Rekombinant Nano-Anti-VEGF'nin CD spektroskopileri ile karşılaştırılmıştır. Analiz edilen örneklerin sekonder yapıları incelenmiştir.

4.2.7. Nano-Anti-VEGF'nin farklı floresans moleküllerle etkileştirilmesi

Nano-Anti-VEGF farklı floresans maddeler ile etkileştirilip floresans spektrofotometresi ile ölçümleri yapılmıştır.

4.2.7.1. Akridin

Akridin çözeltisi 5 ppm olarak DMSO'da hazırlanmış ve Nano-Anti-VEGF ile 9:1 oranında 10 dak karıştırılmıştır. ELISA cihazının floresans ölçüm platformunda 400 nm emisyon değeri ile floresans tabakada ölçüm yapılmıştır.

4.2.7.2. BODİPY

1000 ppm BODİPY floresans boyası DMSO ile 5 ppb'ye seyreltilip Nano-Anti-VEGF ile 4:1 oranında 5 dak oda sıcaklığında karıştırılmıştır. ELISA cihazının floresans ölçüm platformunda 400 nm emisyon değeri ile floresans tabakada ölçüm yapılmıştır.

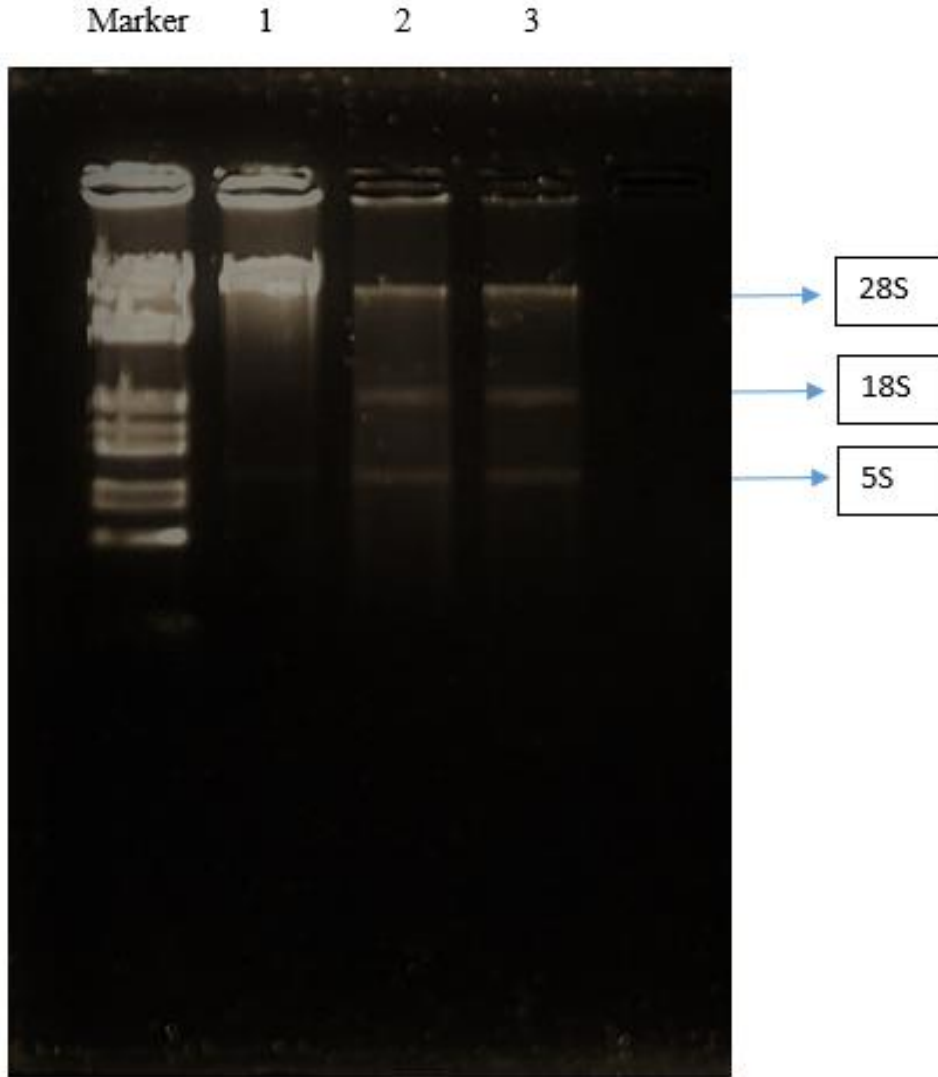
4.2.7.3. FITC

Nano-Anti-VEGF proteini, 1 ml aktivasyon tamponu [0,1 M MES (2-(morphalino)ethanesulfonic acid) + 0,15 M NaCl] içerisinde 10 mg eklenip oda sıcaklığında 20 dak karıştırılmıştır. Son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde EDC eklenip 15 dak oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde NHS eklenerek oda sıcaklığında 1 saat karıştırılmaya bırakılmıştır. Protein ile eşit miktarda FITC eklenerek 30 dak daha karıştırılmıştır. Daha sonra 10.000 daltonluk por büyüklüğüne sahip ultrafiltrasyon santrifüj tüplerine alınarak 4000 rpm'de birkaç defa yıkanarak konjuge olmamış kısımlar ortamdan uzaklaştırılmıştır.

5. BULGULAR

5.1. RNA İzolasyonu

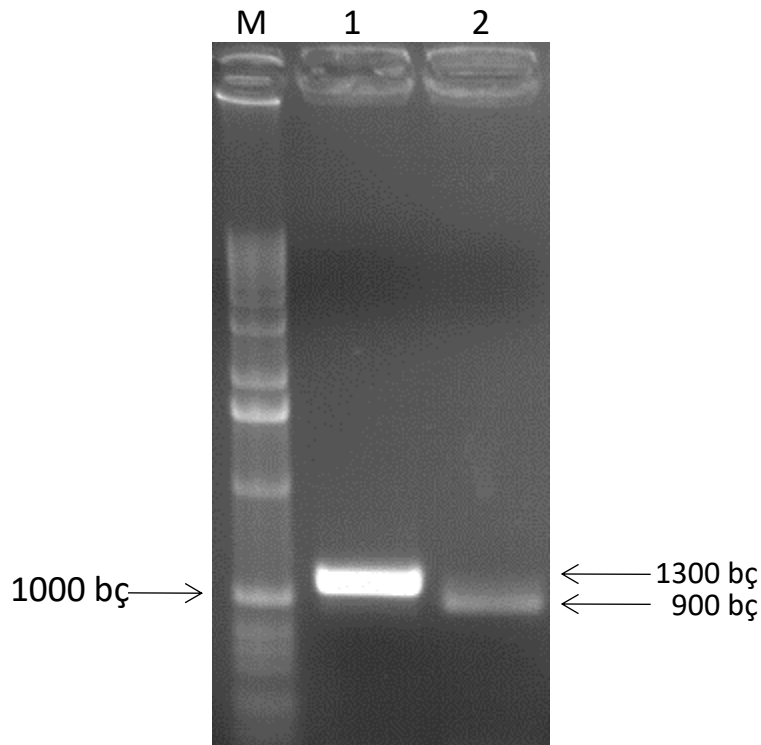
Agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilen analiz sonucunda her numunede, RNA' nın yapısal bileşenleri olan 28S, 18S ve 5S bantları Görsel 5.1'deki gibi gözlenmiştir; bu sayede, izolasyon sırasında herhangi bir bozunmanın olmadığı kesinleşmiştir.



Görsel 5.1. *RNA izolasyonu sonucunda agaroz ile kontrolü*

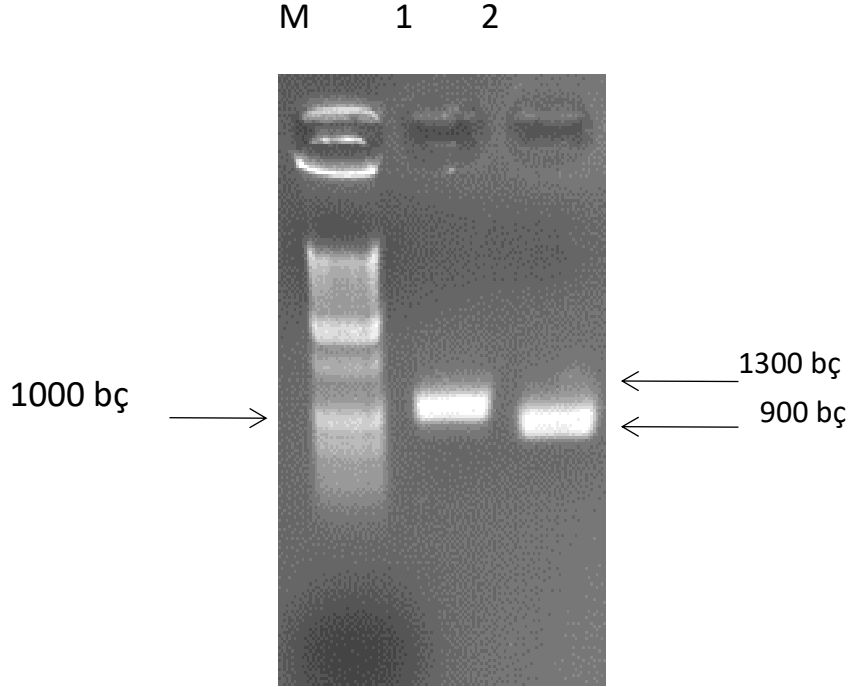
5.2. Anti-VEGF cDNA Klonlanması

Kandan sırasıyla total RNA izolasyonu, total RNA'ya DNaz uygulanması ve RT deneyleri belirtilen protokollerde değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. TRI reagent kullanılarak elde edilen total RNA izolasyon ürünlerinin spektrofotometrik ölçümleri yapıldığında örneğin yoğunluğu $1213 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ ve saflığı 1,9 olarak belirlenmiştir. Yapılan RNA izolasyonu sonucunda, DNA kontaminasyonu olabileceği düşünülerek DNaz uygulanmıştır. Kalite ve saflığını belirlemek için spektrofotometrik analizi yapılmıştır. cDNA eldesi için kullanılan toplam RNA yoğunluğunun $5 \mu\text{g}$ olması için gerekli RNA miktarı hesaplanmış ve RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit (#1622) kullanılarak cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'nın klonlanması için yoğun olması gereklidir. Bunun için; cDNA kalıbı kullanılarak tekrar PCR (Re-PCR) yapılmıştır. Görsel 5.2'de görüldüğü üzere beklenen büyüklükte olan 1300 bç ve 900bç olan ağır ve hafif zincir bantlar elde edilmiştir.



Görsel 5.2. *Anti-VEGF cDNA'nın Re-PCR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü. M Marker 1 ve 2) Anti-VEGF cDNA'nın Re-PCR sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü (%0.8'lik agaroz jele marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).*

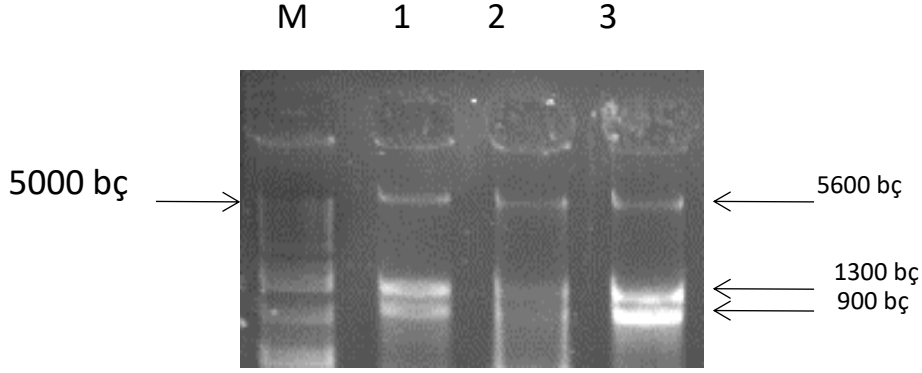
Re-PCR sonucunda elde edilen bantların saflaştırılması işlemi yapılmıştır. Saflaştırma sonucunda Görsel 5.3’de görüldüğü gibi beklenen büyüklükte bant elde edilmiş ve saflaştırmanın başarılı olduğu görülmüştür.



Görsel 5.3. *Anti-VEGF cDNA'nın Re-PCR saflaştırma sonuçlarının agaroz jelden görüntüsü. M) Marker 1)Anti-VEGF cDNA'nın saflaştırılmış Re-PCR sonucu (% 0.8'lik agaroz jel'e marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür).*

Saflaştırılan cDNA'nın A ekleme reaksiyonu yapılmış, cDNA'dan ligasyon için gerekli olan miktarın 5 µL olduğu belirlenmiş ve transformasyonu yapılmıştır.

Transformasyon kontrolü için yapılan ekimlerde; inkübasyon sonrasında LB mediumlarda büyümenin olduğu gözlenmiştir. Büyüme gözlenen LB Mediumlardan ise plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan pGEMT easy plazmitinin *Anti-VEGF* cDNA'sını taşıyıp taşımadığını anlamak için, biyoinformatik analizler sonucunda belirtildiği gibi EcoRI ile kesimi yapılmıştır. Görsel 5.4'den anlaşılacağı gibi EcoRI ile kesimi sonucunda beklenen büyüklükler olan 1300 bç ve 900 bç'lik ürünlerin elde edildiği görülmüştür. Böylece *Anti-VEGF* cDNA'sının klonlama işlemi başarılı bir biçimde gerçekleştirilmiştir



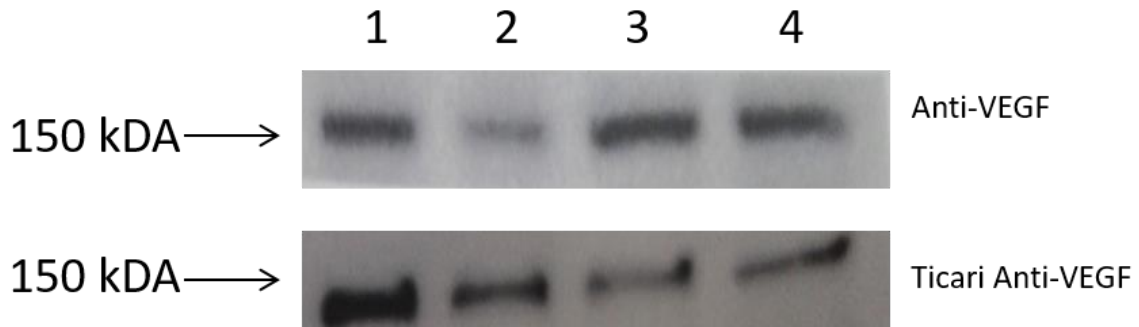
Görsel 5.4. *Anti-VEGF cDNA'sını taşıdığı sanılan pGEMTeasy plazmidinin restriksiyon analizinin agaroz jel görüntüsü. M) Marker, 1) Anti-VEGF cDNA'sını taşıdığı sanılan pGEMT easy plazmidinin kesim ürünleri (%0,8'lik agaroz jel'e marker ile birlikte yüklenmiş ve 90 V'de 50dk. yürütülmüştür)*

5.3. Anti-VEGF'nin Rekombinant Proteininin Ekspresyonu

Protein ekspresyonu için pcDNA3.1 kullanılmıştır. *Anti-VEGF* bu vektöre yerleştirilmiş, klonlanmış ve protein izolasyonu yapılmıştır. İki farklı koloniden gelen protein izolatları His afinitesi gösteren Ni-NTA agaroz ile saflaştırılmıştır. Ni-NTA ile saflaştırılan proteinlerin SDS jel elektroforezi yöntemi ile görünür hale getirilmiştir.

5.4. SDS-Page Sonucunun Western Blot Analizi ile Doğrulanması

Görsel 5.5'da anti-His antikoru ile yapılan Western Blot analizi sonucunda saflaştırılan proteinin VEGF olduğu teyit edilmiştir. Böylece ekspresyonun başarılı olduğu görülmüştür.

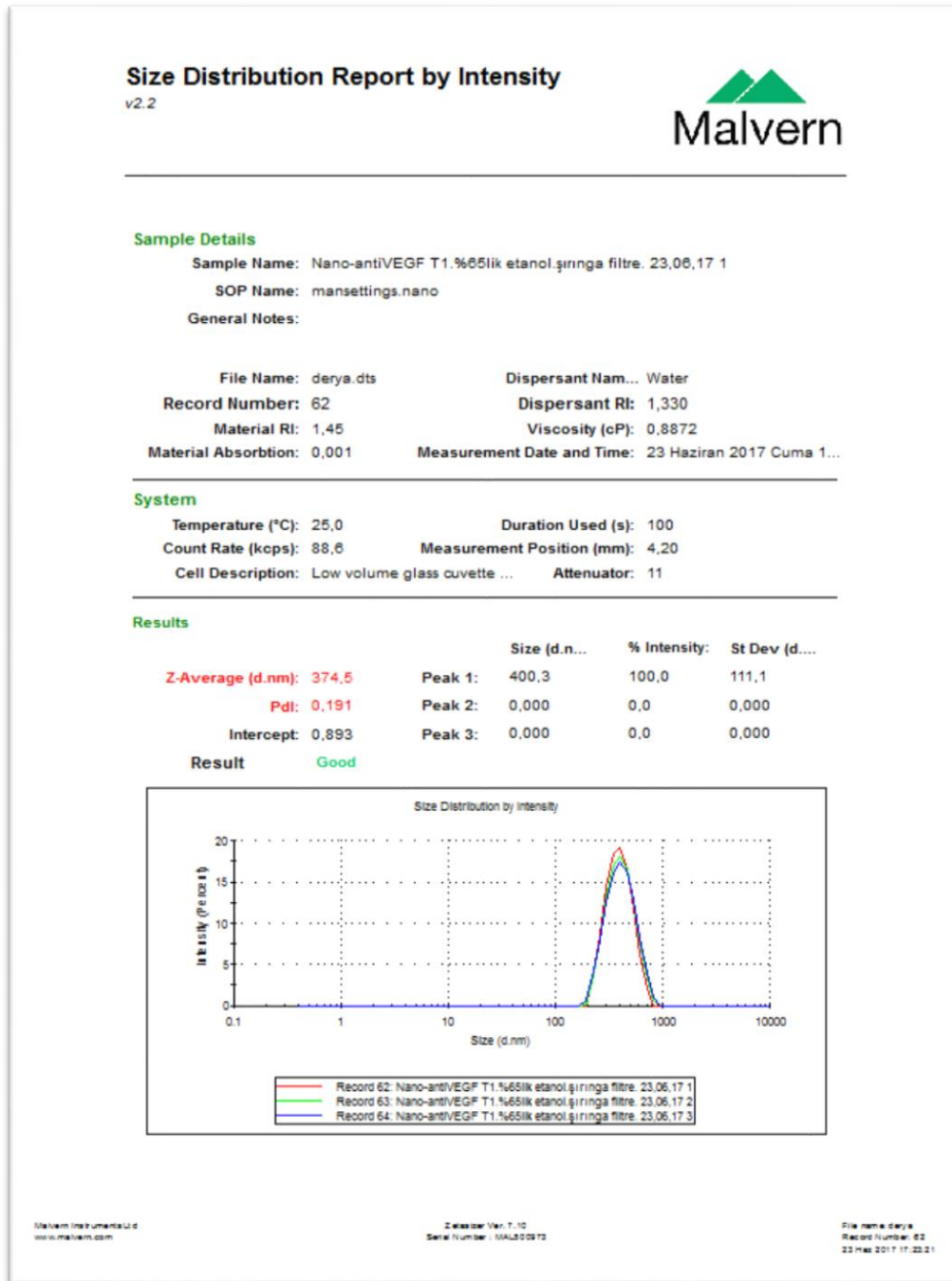


Görsel 5.5. *VEGF rekombinant proteininin western blot analizi ile desteklenmesi. A) 1. Anti-histidin ve ikincil antikor kullanılarak yapılan analiz sonucu. 2. İkincil antikor kullanılarak yapılan analiz sonucunun görüntüsü (M: Kaleidoscope retained Standards BIO-RAD)*

5.5. Rekombinant Anti-VEGF Proteininin Nanokonjugatının Sentezlenmesi

5.5.1. Zeta boyut analizi

1000 ppm olarak hazırlanan Ticari Nano-Anti-VEGF (Şekil 5.1) ve Rekombinant Nano-Anti-VEGF (Şekil 5.2) ultrasonik su banyosunda dispers edildikten sonra Zeta cihazında boyut analizi yapılmıştır. Şekil 5.1’de ve Şekil 5.2’de görüldüğü gibi boyutları sırası ile ortalama 400,3 nm ve 422,6 nm olarak ölçülmüştür.



Şekil 5.1. Ticari Nano-Anti-VEGF Zeta boyut analizi

Size Distribution Report by Intensity

v2.2



Sample Details

Sample Name: Nano-antiVEGF R1.%65lik etanol.kagıt filtre. 23,06,17 3

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: derya.dts	Dispersant Nam... Water
Record Number: 61	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,45	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,001	Measurement Date and Time: 23 Haziran 2017 Cuma 1...

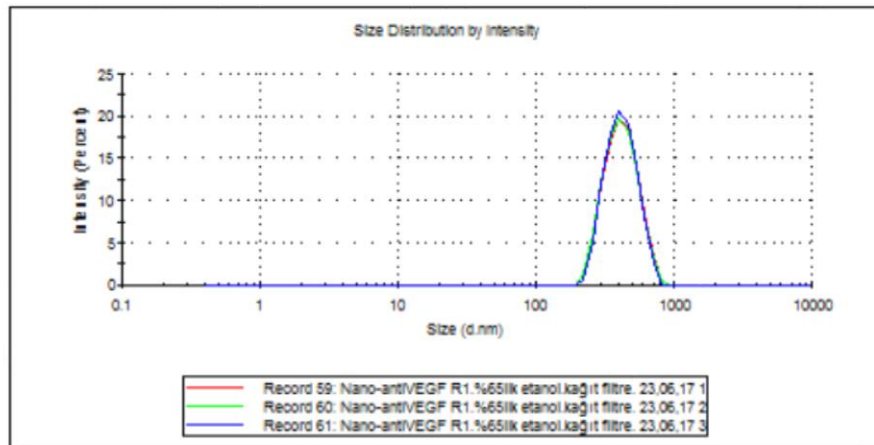
System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 232,7	Measurement Position (mm): 4,20
Cell Description: Low volume glass cuvette ...	Attenuator: 10

Results

	Size (d.n...	% Intensity:	St Dev (d....
Z-Average (d.nm): 424,2	Peak 1: 422,6	100,0	109,7
Pdl: 0,154	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,926	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

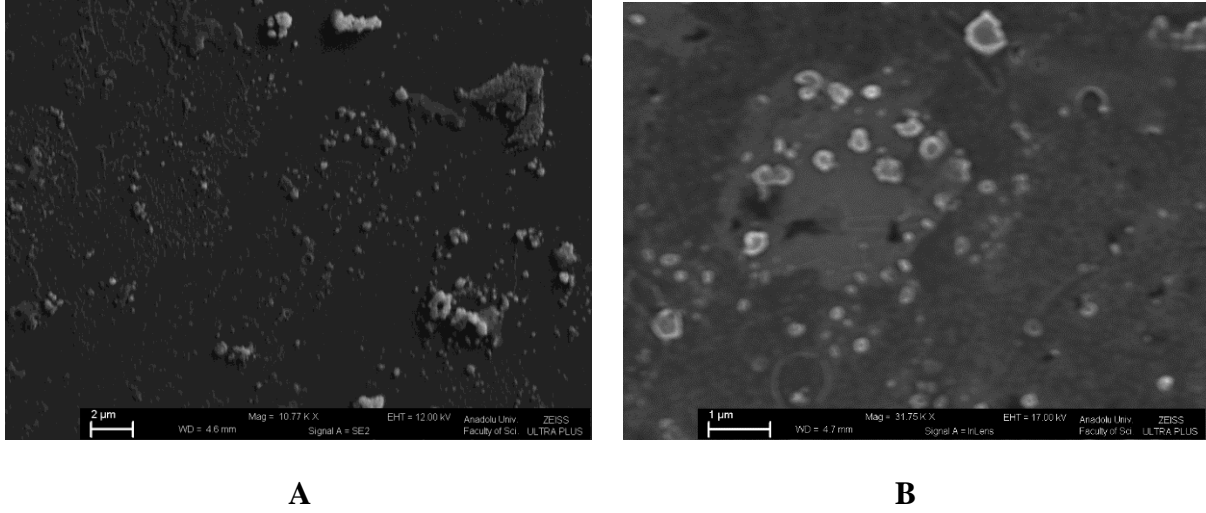
Result **Good**



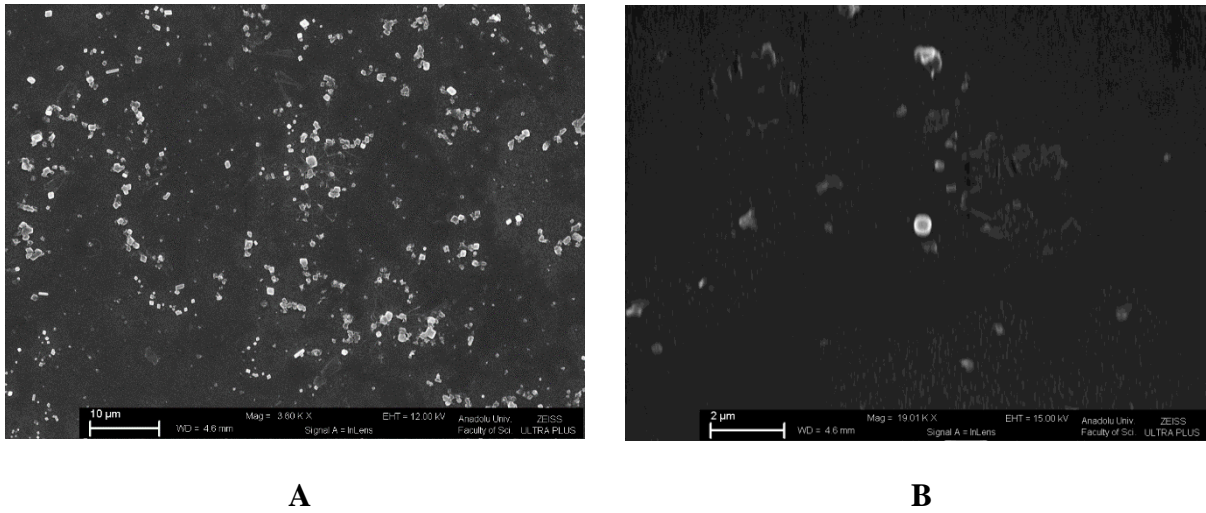
Şekil 5.2. Rekombinant Nano-Anti-VEGF Zeta boyut analizi

5.5.2. SEM görüntülemesi

Rekombinant ve Ticari Nano-Anti-VEGF moleküllerinin yüzey morfolojisi SEM cihazı kullanılarak incelenmiştir. Görsel 5.6 ve Görsel 5.7’de görülen SEM görüntülerinde nano boyuttaki taneciklerin boyutları sırası ile ortalama 420 nm ve 400 nm olup Zeta boyut analizini doğrular bir şekilde gözlenmektedir.



Görsel 5.6. *Rekombinant Nano-Anti-VEGF'nin SEM görüntüleri (A, 10,77 K X büyütme oranı, B, 31,75 K X büyütme oranı)*



Görsel 5.7. *Ticari Nano-Anti-VEGF'nin SEM görüntüleri (A, 3,60 K X büyütme oranı, B, 19,01 K X büyütme oranı)*

5.5.3. CD spektroskopisi

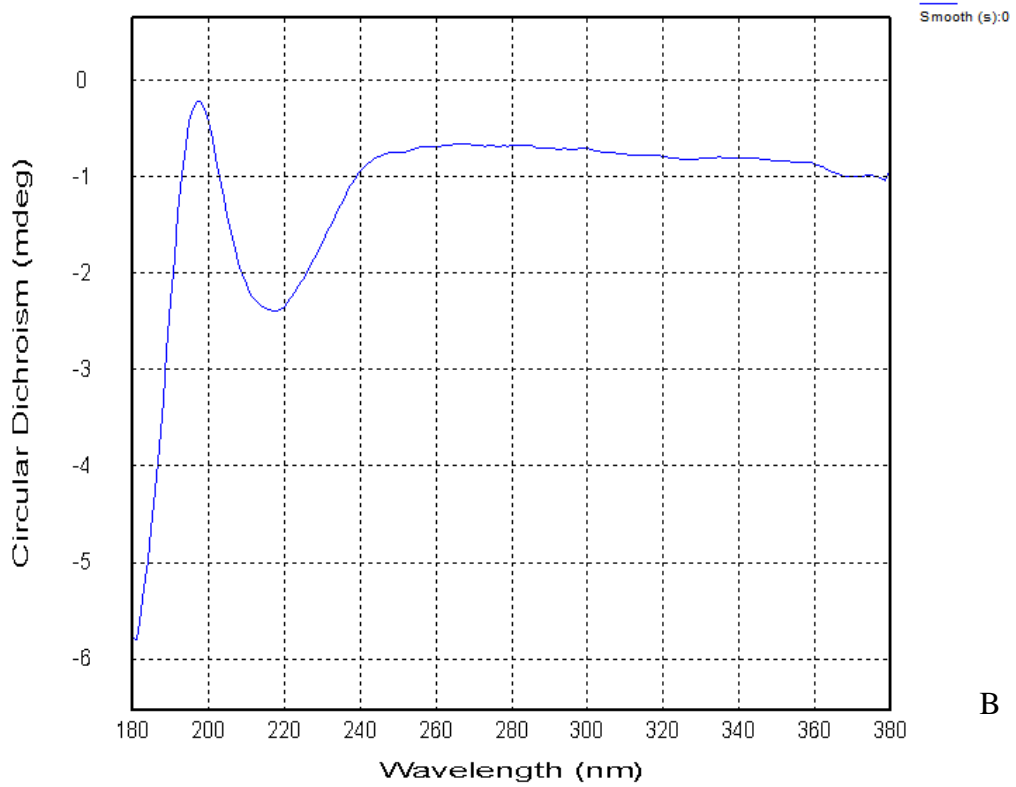
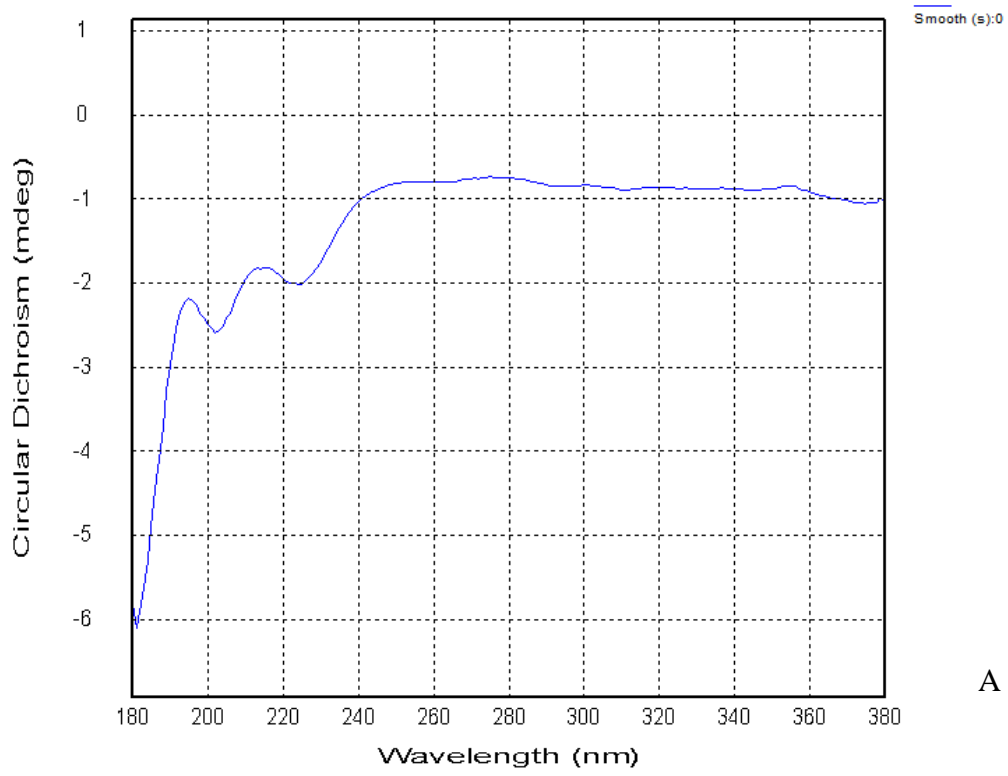
Ticari ve rekombinant Anti-VEGF'nin CD spektroskopileri Şekil 5.3.A ve Şekil 5.3.B'de, nanobiyokonjugat haline getirilen ticari ve rekombinant Nano-Anti-VEGF'nin CD spektroskopileri ise Şekil 5.4.A ve Şekil 5.4.B'de belirtilmiştir.

5.5.3.1. *Rekombinant Anti-VEGF*

Şekil 5.3.A'da görüldüğü gibi, rekombinant Anti-VEGF yapısı CD analiziyle değerlendirildiğinde, spektrumdaki 190-200 nm de gelen pozitif bant ve 200-205 nm'de gelen negatif bant, yapıdaki α heliks katlanmalarını, 210-220 nm'deki bant β katlanmasını ifade etmektedir. Ayrıca; 230-240 nm arasındaki bölgede rastgelen katlanmaların olduğu görülmektedir. 350 nm'de gelen pozitif bant ise yapıdaki aromatik aminoasitlerin varlığını göstermektedir. Anti-VEGF derişiminin çok düşük olması nedeniyle bantlar çoğunlukla negatif bölgede gelmiştir. Ancak; sekonder yapı analizi için karakteristik piklerin belirli bölgelerde gelmiş olması CD spektrumunun yapı analizinde kullanılabilirliğini göstermektedir.

5.5.3.2. *Ticari Anti-VEGF*

Şekil 5.3.B'de görülen ticari Anti-VEGF'nin CD spektrumu incelendiğinde 190-210 nm arasındaki pozitif pik ve 210-222 nm arasındaki negatif pikin α -heliks yapısını belirttiği görülmektedir. Bunun yanında, 222-240 nm arasındaki negatif bant β -katlanmasını göstermektedir. Böylece sekonder yapının α -heliks ve β -katlanmasından oluştuğu söylenebilir.



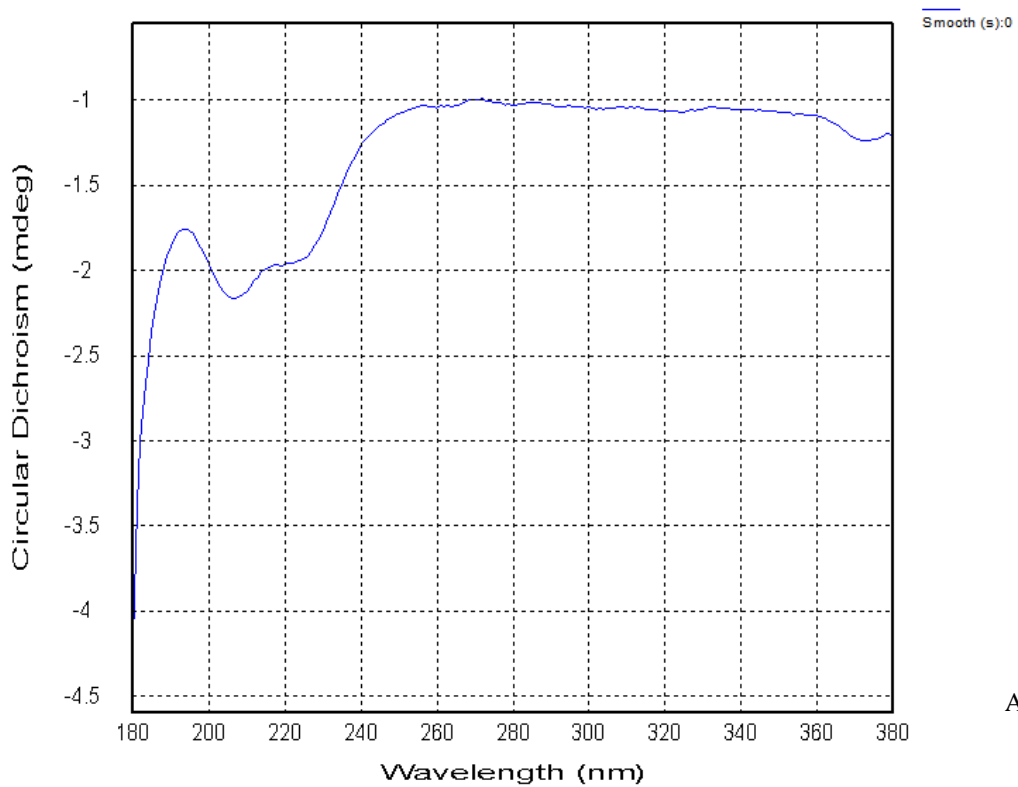
Şekil 5.3. *A. Rekombiant Anti-VEGF'nin CD spektroskopisi, B. Ticari Anti-VEGF'nin CD spektroskopisi*

5.5.3.3. Rekombinant Nano-Anti-VEGF

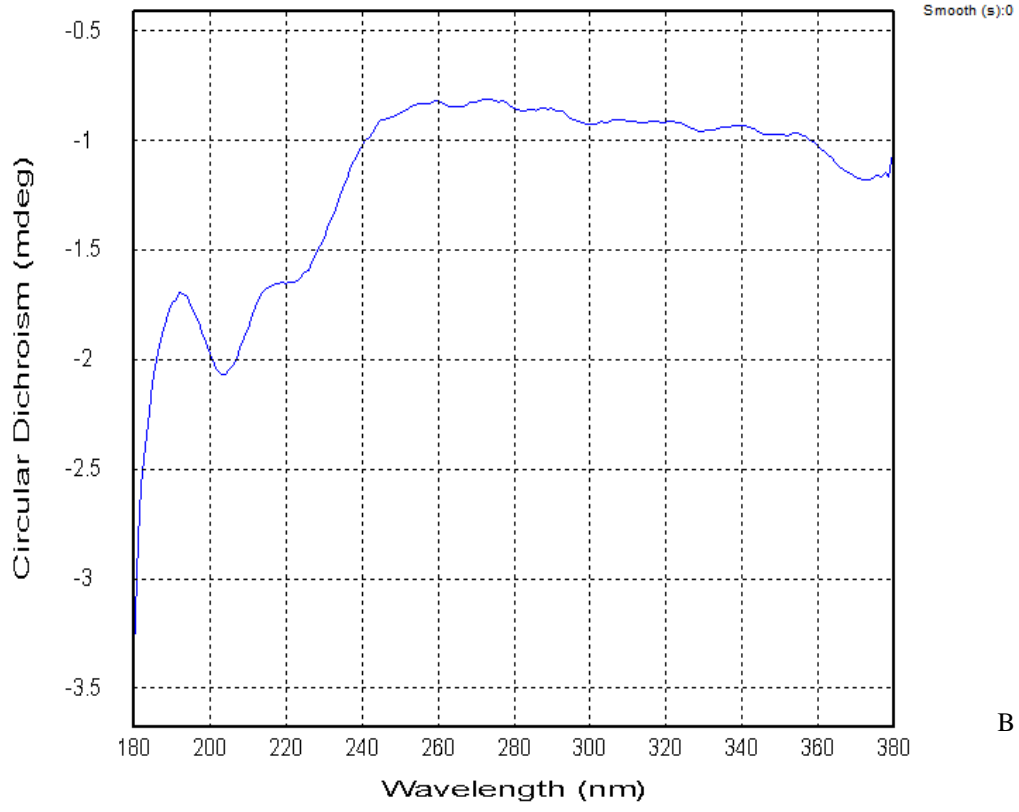
Şekil 5.4.A'da görülen rekombinant Nano-Anti-VEGF yapısının CD spektrumuna bakıldığında, 190-210 nm arasındaki pozitif pik ve 210-221 nm arasındaki negatif pik α -heliks yapısını ve 220-230 nm arasındaki negatif bant β -katlanmasını göstermektedir. Bunun yanında, 232 nm'deki band yapıdaki rastgele katlanmaları ifade etmektedir. Nano yapının CD spektrumunda görülen 320-340 nm arasındaki yayvan band protein yapısındaki aromatic proteinleri işaret etmektedir. Derişimin çok düşük olmasından dolayı CD değerleri negatif yönde çıkmış olsa da belirtilen aralıklarda karakteristik piklerin gelmesi nano yapıda da protein yapısının bozunmadığını göstermektedir.

5.5.3.4. Ticari Nano-Anti-VEGF

Şekil 5.4.B'de görülen, nano yapıli ticari Anti-VEGF yapısının CD spektrumuna bakıldığında ise, yine 190-200 nm arasındaki pozitif pik ve 205-212 nm arasındaki negatif pikin α -heliks yapısı gözlenmektedir. 210-219 nm β katlanmalarını gösterirken, 225 nm'deki negatif ve geniş band rastgele katlanmaları işaret etmektedir. Bunun yanında 300-350 nm arasında gelen yayvan bantlar nano yapıdaki aromatic aminoasitlerin varlığını göstermektedir.



A

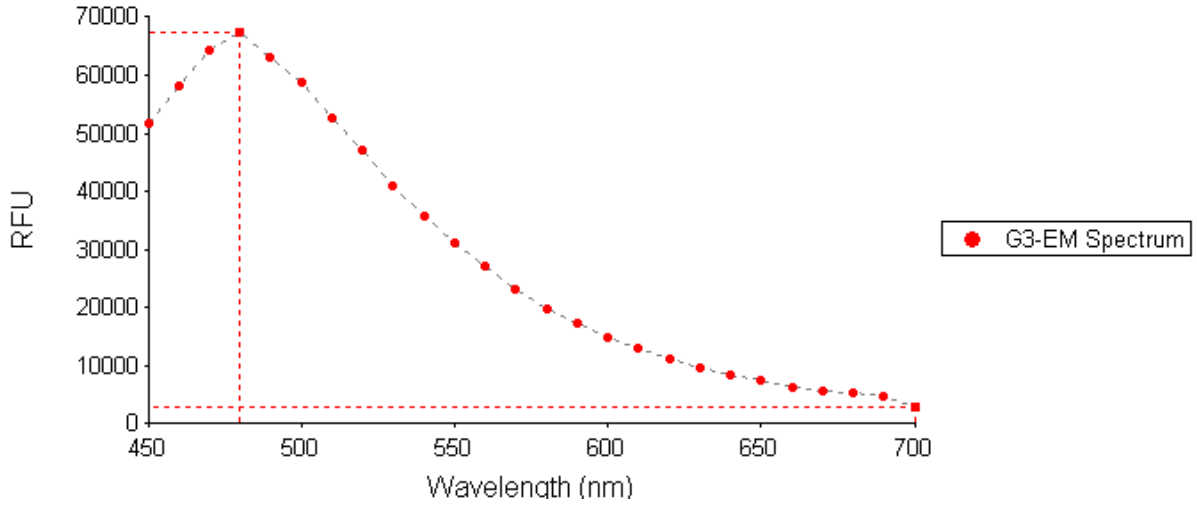


Şekil 5.4. *A. Rekombinant Nano-Anti-VEGF'nin CD spektroskopisi, B. Ticari Nano-Anti-VEGF'nin CD spektroskopisi*

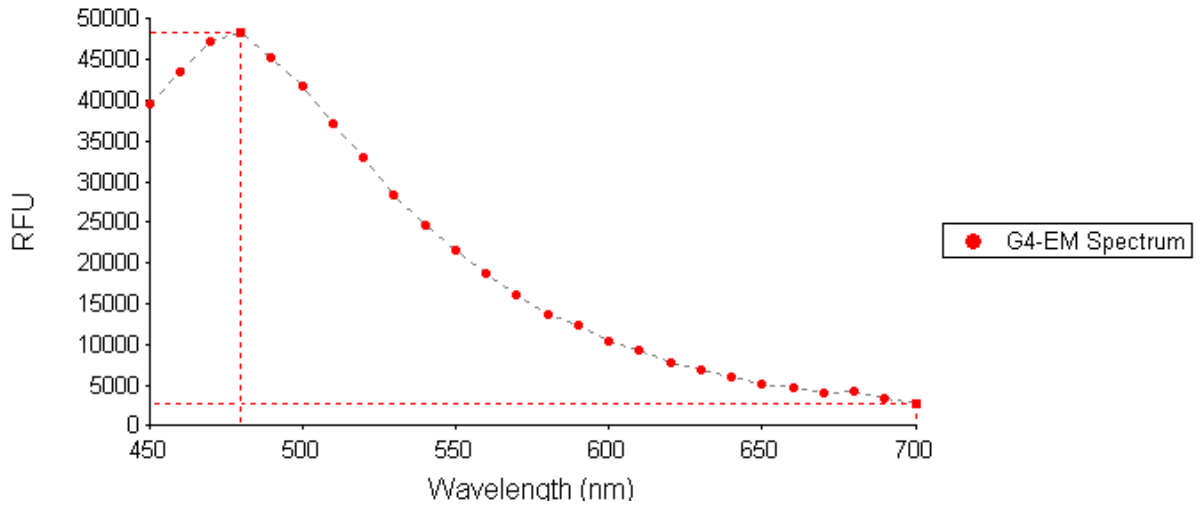
5.5.4. Akridin + Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans spektrofotometresi

Akridin ile konjuge edilen ticari ve rekombinant Nano-Anti-VEGF'nin floresans grafikleri Şekil 5.5.A ve Şekil 5.5.B'de verilmiştir.

A



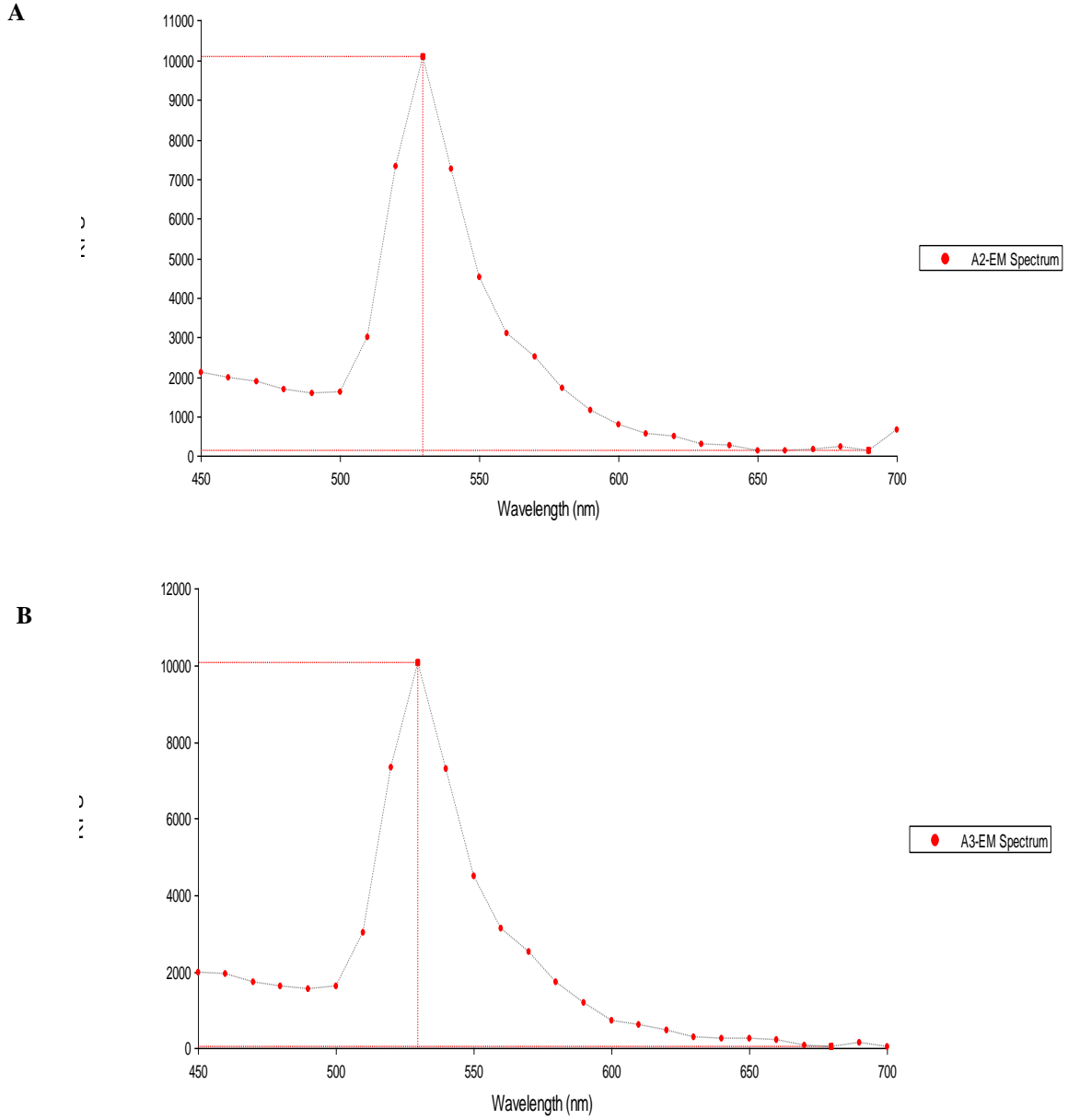
B



Şekil 5.5. A. Acridin + Rekombinant Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği, B. Acridin + Ticari Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği

5.5.5. BODIPY + Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans spektrofotometresi

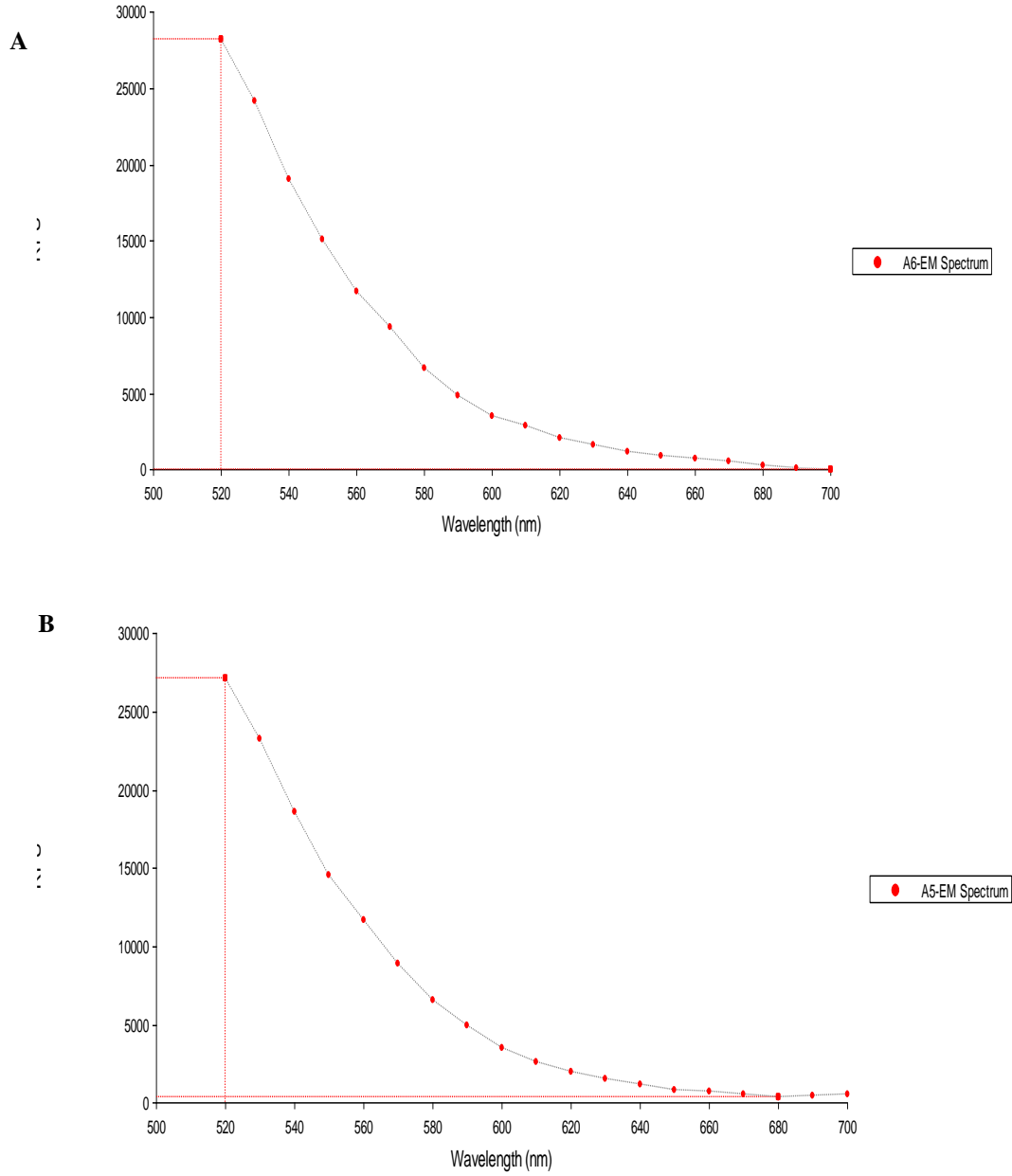
BODIPY ile konjuge edilen ticari ve rekombinant Nano-Anti-VEGF'nin floresans grafikleri Şekil 5.6.A ve Şekil 5.6.B'de verilmiştir.



Şekil 5.6. A. BODIPY + Ticari Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği, B. BODIPY + Rekombinant Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği

5.5.6. FITC + Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans spektrofotometresi

FITC ile konjuge edilen ticari ve rekombinant Nano-Anti-VEGF'nin floresans grafikleri Şekil 5.7.A ve Şekil 5.7.B'de verilmiştir.



Şekil 5.7. A FITC + Ticari Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği, B. FITC + Rekombinant Nano-Anti-VEGF konjugasyonu floresans grafiği

6. SONUÇ VE YORUM

Anti-VEGF, daha VEGF anjiyogenesi başlatacak olan reseptörüne bağlanmadan VEGF'ye bağlanır ve VEGF'yi tutar. Böylece VEGF reseptörüne bağlanmadığı için anjiyogenesis yolağı aktifleşmemiş olur ve endotel hücreleri sinyali alamadığı için çoğalıp damar oluşumuna katılamaz. Beslenme ve oksijen için damarlara ihtiyacı olan tümör, damarın oluşması engellendiğinde gelişemez ve büyüyemez. Bu aşamadan sonra tedavi, vücuda yayılmayan tümöre spesifik olan lokal bir alanda daha kolay bir şekilde uygulanabilir.

Bu çalışmada; Anti-VEGF antikorunun rekombinant üretimi yapılarak daha kontrollü, üretimi kolay, kararlı, maliyeti düşük ürün elde edilmesi sağlanmış, daha sonra rekombinant teknoloji ile elde edilen bu ürünün ANADOLUCA metodu ile nanobiyokonjugatı halinde sentezlenmiş ve Nano-Anti-VEGF'nin uzun süre ve dış ortam koşullarına dayanabilirliği ve uzun soluklu kullanılabilirliği sağlanmıştır.

İmmünoglobulin yapıda olan antikorun ağır ve hafif iki zinciri rekombinant teknikle birleştirilmiş ve tek bir zincir halinde ifade edilerek tek bir protein halinde elde edilmiştir. Çalışmada; kalıp DNA olarak insan kanından elde edilen mRNA'dan RT-PCR yöntemi kullanılarak elde edilen cDNA kullanılmıştır. cDNA'dan spesifik primerlerle tek zincir halinde klonlanan Anti-VEGF genlerinin klonlanması için pGEMT-Easy vektörüne (Promega) entegrasyonu sağlanmıştır. Anti-VEGF genlerini taşıyan vektörün çoğaltılması için *E. coli* **DH5-α** konakçı hücreleri kullanılmıştır. Çoğalan vektörlerden Anti-VEGF geni saflaştırılıp 6X-His takısı eklendikten sonra rekombinant protein ifadesi için ise pcDNA3.1 vektörü (Qiagen) kullanılmıştır. Bu vektörün çoğaltılıp ifade edilen proteinin miktarını artırmak için *E.coli* **Rosetta** ırkı ifade konakçısı hücreler kullanılmıştır. Pozitif koloniler seçilip amfisilin içeren LB besi yeri ortamında inkübe edilerek proteinin ifade edilmesi sağlanmıştır. İnkübasyon sonucunda hücrelerden toplam protein izolasyonu yapılarak Nikel afinite kromatografisi ile histidin takısına sahip olan proteinler saflaştırılmıştır. Saflaştırılan rekombinant proteinlerin kontrolü için SDS-Page ve Western Blot teknikleri kullanılarak proteinin molekül ağırlığının beklenildiği gibi 150 kDa olduğu tespit edilmiştir.

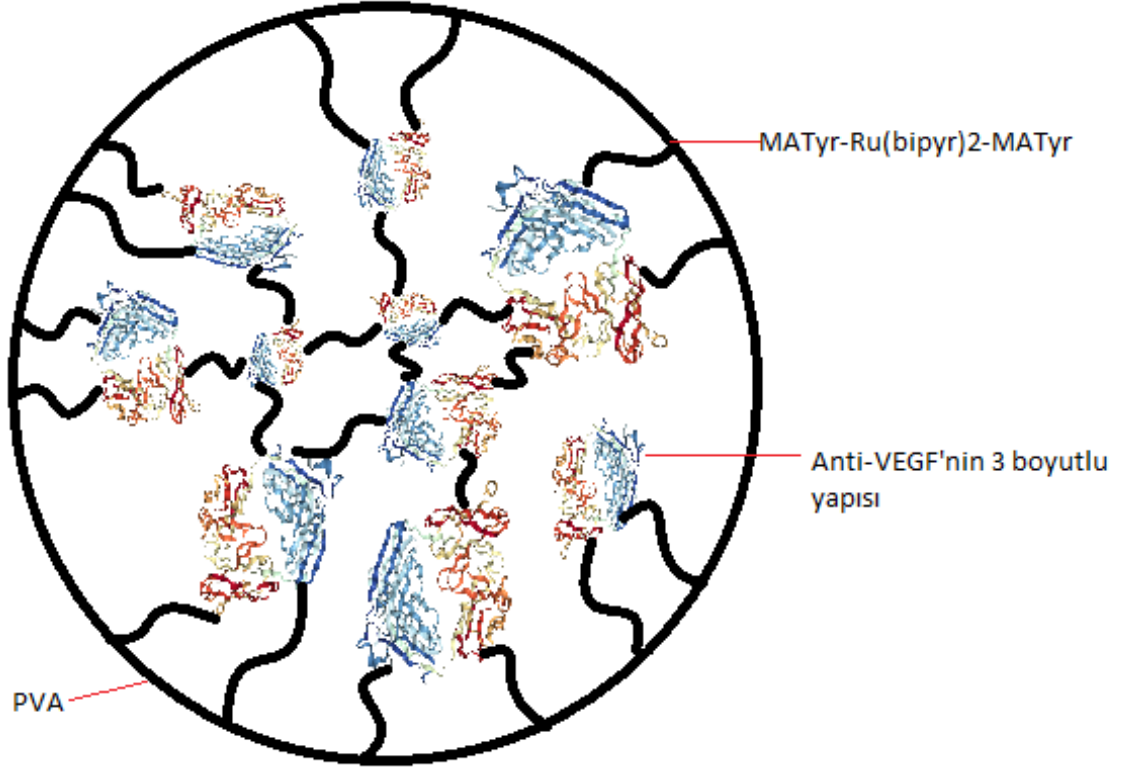
Çalışmanın ikinci aşamasında; tek zincirli rekombinant Anti-VEGF, rutenyum-şelat temelli fotosensitif çapraz bağlayıcı etkileştirilmiş ve deiyonize suda dispers edilen polivinil alkol ile oluşturulan mikroemülsiyon ortamına eklenmiştir. Azot gazı altında inert ortamda 48 sa süren reaksiyon sonucunda sentezlenen Nano-Anti-VEGF konjugatlar santrifüjle reaksiyon

ortamından izole edilmiştir ve karakterizasyonları yapılmıştır. Karakterizasyon işlemleri için Zeta boyut analizi, SEM kullanılmıştır.

Zeta boyut analizinde rekombinant olarak üretilen Nano-Anti-VEGF'nin boyutunun 422,6 nm olduğu görülmüştür. Karşılaştırmak için ticari Anti-VEGF'den sentezlenen Nano-Anti-VEGF proteinin boyutu ise 400,3 nm olarak belirlenmiştir. SEM yüzey analizi görüntülerinde heterojen bir şekilde dağılmış olarak gözlenen nano taneciklerin ortalama boyutlarının 400 nm olduğu belirlenmiş ve bu oran Zeta boyut analizini desteklemiştir. Ticari, rekombinant ve nanobiyokonjugatları olarak dört farklı varyasyonu incelenen Anti-VEGF'nin CD spektrumlarına bakıldığında α -heliks yapıları ve β katlanmaları ile nano yapıya ait aromatik yapı bandları bütün versiyonlarında gözleendiğinden dolayı ikincil yapısını koruduğu ve aktif kaldığı gözlenmiştir.

Akridin, BODIPY ve FITC gibi farklı bir floresans madde ile etkileştirilen Nano-Anti-VEGF'nin floresansları ölçülmüştür. Buna göre Akridin ile etkileştirilen Nano-Anti-VEGF'nin 480 nm'de floresans verdiği ve nispi floresans ünitesi (RFU) değerlerinin 4800 ve 6800 olduğu, BODIPY ile etkileştirilen Nano-Anti-VEGF'nin 530 nm'de floresans verdiği ve RFU değerlerinin 10,000'de olduğu, son olarak FITC ile etkileştirilen Nano-Anti-VEGF'nin 520 nm'de floresans verdiği ve RFU değerlerinin 28,000 ve 27,000'de olduğu gözlenmiştir. Bu sayede; farklı floresans maddelerle etkileşebildiği kanıtlanan Nano-Anti-VEGF molekülünün, ilaç olarak vücuda verildiği takdirde tedavi sürecinin moleküler görüntüleme teknikleri ile takip edilebileceği gösterilmiştir.

Bu sonuçlara göre rekombinant Anti-VEGF antikoru başarılı bir şekilde üretilmiştir. Diğer taraftan, üretilen rekombinant Anti-VEGF antikorunun Şekil 6.1'de gösterildiği gibi ANADOLUCA metodu kullanılarak nanokonjugatları da ilk kez bu çalışmada sentezlenmiştir. Bu tez kapsamında, yeni nanoteranostik olarak geliştirilen Nano-Anti-VEGF; hem kanser tedavisinde damarlaşmanın önüne geçebilecek hem de floresans, radyolojik ve manyetik gibi farklı görüntüleme ligandlarını taşıyabilerek multimodal görüntüleme de yapabilecek üretimi kolay, kararlı, maliyeti düşük, dış ortam koşullarına dayanıklı bir nanobiyokonjugattır.



Şekil 6.1. Nano-Anti-VEGF'nin şematik gösterimi (Ünlüer, Ersöz, Say, Tomsuk, & Sivas, 2013) (Franklin, 2017)

KAYNAKÇA

- Adamis, A. P., Shima, D. T., Tolentino, M. J., Gragoudas, E. S., Ferrara, N., Folkman, J., & Miller, J. W. (1996). Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia—associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Archives of Ophthalmology*, *114*(1), 66-71.
- Algire, G. H., Chalkley, H. W., Legallais, F. Y., & Park, H. D. (1945). Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J. Natl Cancer Inst.* *6.*, 73-85.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc; ringbou edition.
- Baca, M., & Wells, J. A. (2005). *Washington, DC: U.S. Patent No. 6,884,879*.
- Baca, M., Wells, J. A., Presta, L. G., Lowman, H. B., & Chen, Y. M. (2006). *Washington, DC: U.S. Patent No. 7,060,269*.
- Barbero, N., Barolo, C., & Viscardi, G. (2016). Bovine Serum Albumin Bioconjugation with FITC. *World Journal of Chemical Education*, *4*(4), 80-85.
- Bray, F., & Müller, B. (2006). Predicting the future burden of cancer. *Nature reviews. Cancer*, *6*(1), 63.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* *69*, 4-10.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, s. 4-10.
- Clackson, T., & Hoogenboom, H. R. (1991). Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, *352*(6336), 624.
- Cooper, G. M., & Sunderland, M. A. (2000). *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition*. Recombinant DNA.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9950/> adresinden alındı
- De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The lancet oncology*, *13*(6), 607-615.

- Drlica, K. (1992). *Understanding DNA and gene cloning: a guide for the curious. (ed. 2)*.
- Ehrmann, R. L., & Knoth, M. (1968). Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J. Natl. Cancer Inst.*, s. 1329-1341.
- Elgaddar, O. (2006). Study of vascular endothelial growth factor (vegf) and bcl 2 protein levels in serum and vitreous humor of patients with proliferative diabetic retinopathy.
- Ellis, L. M., & Hicklin, D. J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews cancer*, 8(8), 579-591.
- Fact Sheets by Cancer.* (2017). Globocan.iarc.fr:
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx adresinden alındı
- Favre, H. A., & Powell, W. H. (2013). Nomenclature of organic chemistry: IUPAC recommendations and preferred names. *Royal Society of Chemistry*.
- Feldman, A. L., & Libutti, S. K. (2000). Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer*, s. 1181-1194.
- Feldman, A. L., & Libutti, S. K. (2000). Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer*, s. 1181-1194.
- Feldman, A. L., & Libutti, S. K. (2000). Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer*, 89(6), 1181-1194.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5).
- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Rev. Cancer* 2, 795-803.
- Ferrara, N., & Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 161(2), 851-858.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P., & Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 3(5), 391-400.

- fluorophores.org*. (2017, 08 27). Fluorophores.tugraz.at:
<http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/252> adresinden alındı
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.
- Folkman, J. (2001). Angiogenesis-dependent diseases. *In Seminars in oncology (Vol. 28, No. 6)*, 536-542.
- Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *In Seminars in Oncology (Vol 29, No. 6)*, 15-18.
- Folkman, J. (2002, 12). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. (Vol. 29, No. 6, pp. 15-18). WB Saunders. *In Seminars in Oncology*, s. 15-18.
- Folkman, J., & Kalluri, R. (2000). Cancer medicine. *JF Holland et. al (Eds)*, 132-152.
- Folkman, J., & Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., & Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 133, 275-288.
- Franklin, M. C. (2017, 06 25). *The Structural Basis for the Function of Two Anti-VEGF Receptor 2 Antibodies*. Rcsb.org:
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3S34> adresinden alındı
- Fuh, G., Gerber, H. P., Liang, W. C., Fellouse, F., Sidhu, S. S., & Wiesmann, C. (2015). *Washington, DC: U.S. Patent No. 8,975,381*.
- Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician*, 77(3).
- Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*, s. 871-882.
- Gordon, M. S., & et al. (2001). Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology* 19.3, 843-850.
- Gray, A. M., & Ullrich, A. (1992). *Washington, DC: U.S. Patent No. 5,169,762*.
- Greenblatt, M., & Shubick, P. (1968). Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl Cancer Inst.*, s. 111-124.

- Gullino, P. M. (1978). Angiogenesis and oncogenesis.
- Hahnfeldt, P., Panigrahy, D., Folkman, J., & Hlatky, L. (1999). Tumor development under angiogenic signaling: a dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Res*, 59.
- Hajirezaei, M., Darbouy, M., & Kazemi, B. (2014). Cloning and expression of the functional human anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) using the pcDNA3. 1 vector and the human chronic myelogenous leukemia cell line K562. *The protein journal*, 100-109.
- Hansen, W., Hutzler, M., Abel, S., Alter, C., Stockmann, C., Kliche, S., & Schadendorf, D. (2012). Neuropilin 1 deficiency on CD4+ Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *The Journal of experimental medicine*, 209(11), 2001-2016.
- Holmgren, L., O'Reilly, M., & Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 149-53.
- Home - GaBI Online - Generics and Biosimilars Initiative. (2017, 05 22). Gabionline.net: <http://www.gabionline.net/Biosimilars/General/Biosimilars-of-bevacizumab>
adresinden alındı
- Hoogenboom, H. R. (2005). Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nature biotechnology*, 23(9), 1105.
- Houck, Keith, A., & et al. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular endocrinology* 5.12, 1806-1814.
- Huse, W. D., Sastry, L., Iverson, S. A., Kang, A. S., Alting-Mees, M., Burton, D. R., & Lerner, R. A. (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 1275-1281.
- Ide, A. G., Baker, N. H., & Warren, S. L. (1939). Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am. J. Roentgenol*, s. 891-899.
- International Agency for Research on Cancer. (1978). *Acridine Orange*. IARC Monographs Program on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Lyon: IARC Press.

- Keating, G. M. (2014). Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer. *Drugs*, s. 1891-1925.
- Keck, Pamela, J., & et al. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246.4935, 1309.
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., & Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362(6423), 841.
- Kim, Leo, A., & Patricia, A. D. (2012). A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis. *The American journal of pathology* 181.2 , 376-379.
- Klagsbrun, M., & D'Amone, P. A. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annu. Rev. Physiol* 53, 217-239.
- Köse, E., Say, R., & Ersöz, A. (2016). A new approach for the construction of dual character in nanosystems. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222, 1012-1017.
- Kusuzaki, K., Murata, H., Matsubara, T., Satonaka, H., Wakabayashi, T., Matsumine, A., & Uchida, A. (2007). Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. *In Vivo*, 21(2), 205-214.
- Kusuzaki, K., Murata, H., Takeshita, H., Hashiguchi, S., Nozaki, T., Emoto, K., & Hirasawa, Y. (1999). Intracellular binding sites of acridine orange in living osteosarcoma cells. *Anticancer research*, 20(2A), 971-975.
- Lang, P., Yeow, K., Nichols, A., & Scheer, A. (2006). Cellular imaging in drug discovery. *Nature reviews. Drug Discovery*, 5(4), 343.
- Leung, David, W., & et al. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246.4935, 1306.
- Leyton, J., & et al. (2005). Early detection of tumor response to chemotherapy by 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine positron emission tomography: the effect of cisplatin on a fibrosarcoma tumor model in vivo. . *Cancer Res.* 65, 4202-4210.
- Lien, S., & Lowman, H. B. (2008). Therapeutic anti-VEGF antibodies. In *Therapeutic Antibodies. Springer Berlin Heidelberg.*, 131-150.
- Marks, D. B., & Smith, C. (2004). *Marks Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach.* Philadelphia, PA, USA.: Lippincott Williams and Wilkins.

- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., & Winter, G. (1991). By-passing immunization: human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of molecular biology*, 222(3), 581-597.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552-554.
- Monsma, F. J., Barton, A. C., Chol Kang, H., Brassard, D. L., Haugland, R. P., & Sibley, D. R. (1989). Characterization of novel fluorescent ligands with high affinity for D1 and D2 dopaminergic receptors. *Journal of neurochemistry*, 52(5), 1641-1644.
- O'Reilly, M., Boehm, T., Shing, Y., Naomi, F., Vasios, G., Lane, W., & et al. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 277.
- Orlandi, R., Güssow, D. H., Jones, P. T., & Winter, G. (1989). Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(10), 3833-3837.
- Pollack, R. (1981). Readings in mammalian cell culture. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Recombinant DNA*. (2017, 05 22). Ncbi.nlm.nih.gov:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9950/> adresinden alındı
- Rudin, M., & Weissleder, R. (2003). Molecular imaging in drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(2), 123.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sanger, D. R. (2010). Vascular endothelial growth factor: much more than an angiogenesis factor. *Mol. Biol. Cell* 21, 377-379.
- Saville, D. (2014). Explain the role of angiogenesis in cancer development and the current available treatments for metastatic colorectal cancer. *The Angiogenesis Foundation*.
- Say, R., Biçen Ünlüer, Ö., Ersöz, A., Öziç, C., & Kılıç, V. (2015). Reusable nanocopy machine particles for the replication of DNA. *Biotechnology progress*, 31(1), 119-123.
- Say, R., Ersoz, A., Hur, D., Yılmaz, F., Denizli, A., Ozcan, A. A., . . . Saka, G. (2009). *U.S. Patent No. 13/203,833*.

- Say, R., Keçili, R., Biçen, Ö., Şişman, F. Y., Hür, D., Denizli, A., & Ersöz, A. (2011). A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase. *Process biochemistry*, 46(8), 1688-1692.
- Say, R., Uzun, L., Yazar, S., Denizli, A., Hür, D., Yılmaz, F., & Ersöz, A. (2014). Bitargeting and ambushing nanotheranostics. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 42(2), 138-145.
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 41-52.
- Siemeister, G., Martiny-Baron, G., & Marmé, D. (1998). The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer and Metastasis Reviews*, 17(2), 241-248.
- Siligardi, G., & Hussain, R. (2015). CD spectroscopy: an essential tool for quality control of protein folding. *Structural Proteomics: High-Throughput Methods*, 255-276.
- Steinert, K., Artz, C., Fabis, R., & Ribbe, A. (1996). Comparison of chelating resins for purification of 6xHis-tagged proteins. *QIAGEN News*.
- Strugger, S. (1949). *Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie*.
- Tizard, I. R. (2013). *Veterinary Immunology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Tolatanova, G., Khomenko, T., Deng, X., Chen, L., Tarnawski, A., Ahluwalia, A., & Sandor, Z. (2009). Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats: direct evidence for the pathogenic role of VEGF. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 328.3, 749-757.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
- Tram, K., Yan, H., Jenkins, H. A., Vassiliev, S., & Bruce, D. (2009). The synthesis and crystal structure of unsubstituted 4, 4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY). *Dyes and Pigments*, 82(3), 392-395.
- Treat I Science Of RVO*. (tarih yok). Scienceofrvo.org: [http://www.scienceofrvo.org/treat/adresinden alindi](http://www.scienceofrvo.org/treat/adresinden%20alindi)

- Treibs, A., & Kreuzer, F. H. (1968). Difluorboryl-Komplexe von Di-und Tripyrrylmethenen. *European Journal of Organic Chemistry*, 718(1), 208-223.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı. (2012). Akanser: <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-d%C3%BCnya-kanser-istatistikleri-yay%C4%B1nland%C4%B1.html> adresinden alındı
- Ünlüer, Ö. B., Ersöz, A., Say, R., Tomsuk, Ö., & Sivas, H. (2013). Novel nanoimaging approach: Antibodious polymeric nanolabel for intracellular alpha-fetoprotein targeted monitoring. *Biotechnology progress*, 29(2), 472-479.
- von Bertalanffy, L. (1963). Acridine orange fluorescence in cell physiology, cytochemistry and medicine. *Protoplasma*, 57(1-4), 51-83.
- Ward, E. S., Güssow, D., Griffiths, A. D., Jones, P. T., & Winter, G. (1989). Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 341(6242), 544-546.
- Warren, R. S., Yuan, H., Matli, M. R., Gillett, N. A., & Ferrara, N. (1995). Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 95(4), 1789.
- Watson, J. D. (1981). The DNA story: a documentary history of gene cloning. *In WH Freeman and Co.*
- Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., & Zoller, M. (1992). *Recombinant DNA in medicine and industry. Recombinant DNA, Second Edition*. New York: Scientific American Books, WH Freeman and Company.
- Watt, F. M. (1991). Cell culture models of differentiation. *The FASEB journal* 5(3), 287-294.
- Winter, G., & Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*, 349(6307), 293.
- Yagoob, U., & et al. (2012). Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer Res.*, 4047-4059.
- Yaqoob, U., Cao, S., Shergill, U., Jagavelu, K., Geng, Z., Yin, M., & Schwartz, M. (2012). Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer research*, 72(16), 4047-4059.
- Yee, M. C., Fas, S. C., Stohlmeyer, M. M., Wandless, T. J., & Cimprich, K. A. (2005). (Yee, M. C., Fas, S. C., Stohlmeyer, M. M., WanA cell-permeable, activity-based probe for

protein and lipid kinases. (Yee, M. C., Fas, S. C., Stohlmeyer, M. M., Wandless, T. J., & Cimprich, K. A. (2005). *A Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29053-29059.

Yeni Dünya Kanser İstatistikleri Yayınlandı. (2016, Temmuz 25). Kanser.gov.tr:

<http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/860-yeni-d%C3%BCnya-kanser-istatistikleri-yay%C4%B1nland%C4%B1.html> adresinden alındı