



**KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİR OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ ANTI-VEGF
MONOKLONAL ANTİKORLARIN MOLEKÜLER VE İMMÜNOLOJİK
KARAKTERİZASYONUNUN İN VİTRO YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI**

MELEK YAMAN

**DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Şubat 2017

Melek YAMAN tarafından hazırlanan "Kanser Tedavisinde Kullanılabilir Olarak Geliştirilmiş Anti-VEGF Monoklonal Antikorların Moleküler ve İmmünolojik Karakterizasyonunun İn Vitro Yöntemler İle Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Emin Ümit BAGRI AÇIK

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Prof. Dr. Ayşegül Atak YÜCEL

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. Dicle GÜÇ

Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. Ayşe LaLe DOĞAN

Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Doç. Dr. Resul KARAKUŞ

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 20/02/2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

MELEK YAMAN

20.02.2017

KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILABİLİR OLARAK GELİŞTİRİLMİŞ ANTI-VEGF MONOKLONAL
ANTİKORLARIN MOLEKÜLER VE İMMÜNOLOJİK KARAKTERİZASYONUNUN İN VİTRO

YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

MELEK YAMAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2017

ÖZET

Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) anjiyogenez aktivatörlerinin içinde en önemli olan büyüme faktörüdür. Bu çalışmada VEGF-A'ya karşı yeni geliştirilmiş üç adet monoklonal antikorun moleküler ve immünojenik karakterizasyonu in vitro yöntemler kullanılarak araştırıldı. Antikorlar 5D6.5, 1B4.2 ve 3B2.1 olarak adlandırıldı. Çalışmaların ilk basamağında yeni geliştirilen anti-VEGF-A antikorları hibridoma kültür süpernatantlarından afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan antikorların ELİSA, akım sitometri, hücre içi boyama ve Western blot yöntemlerindeki kullanılabilirlikleri test edildi. Karakterizasyonu yapılan antikorlardan 5D6.5 adı verilen antikor ELİSA ve Western blot çalışmalarında VEGF-A proteinine bağlanabilirken, akım sitometri ve immünofloresan boyamada VEGF-A proteinine bağlanamamıştır. 3B2.1 antikoru ise ELİSA, hücre içi boyama ve akım sitometri yönteminde VEGF-A proteinine bağlanabilmiştir. 1B4.2 adı verilen antikor ELİSA, hücre içi boyama ve akım sitometri yönteminde VEGF-A proteinine bağlanabilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu antikorların VEGF-A ile ilgili olarak araştırma amaçlı yapılan in-vitro çalışmalarda kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Bilim Kodu : 1039.2

Anahtar Kelimeler : Kanser, Monoklonal Antikor, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Sayfa Adedi : 110

Danışman : Prof.Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

IN VITRO INVESTIGATION FOR MOLECULAR AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION
OF ANTI-VEGF ANTIBODIES THAT WERE DEVELOPED FOR CANCER TREATMENT.

(Ph. D. Thesis)

Melek YAMAN

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

December 2016

ABSTRACT

Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) is the most important growth factor in angiogenesis activators. In this study molecular and immunological characterization of three newly developed monoclonal antibodies against VEGF-A were investigated by in vitro techniques. Antibodies were named as 5D6.5, 1B4.2 and 3B2.1. During the initial step of the research, newly developed anti-VEGF-A antibodies were purified from the hybridoma culture supernatants by using affinity chromatography method. Following the purification of antibodies their uses in different methods such as ELISA, flow cytometry, intracellular cell staining, and Western blot were tested. Among the characterized antibodies 5D6.5 named antibody, could bind VEGF-A protein in ELISA and Western blot studies but not in flow cytometry and intracellular cell staining techniques. Antibody 3B2.1 could bind VEGF-A protein in ELISA, intracellular cell staining and flow cytometry technique. Antibody named as 1B4.2 could bind VEGF-A protein in ELISA, intracellular cell staining and flow cytometry techniques. According to the results these antibodies can be used in vitro techniques in VEGF-A related research studies.

Science Code : 1039.2

Key Words : Cancer, Monoclonal Antibody, Vascular Endothelial Growth Factor

Page Number : 110

Advisor : Prof.Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yardım ve değerli katkılarıyla beni yönlendiren, bana immünoloji ve laboratuvar çalışmaları hakkında pek çok şey öğreten sayın danışmanım Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK'a, doktora öğrenimim boyunca bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan İmmünoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL, Prof. Dr. Vedat BULUT, Prof. Dr. Cemalettin AYBAY, Doç. Dr. Resul KARAKUŞ ve Doç. Dr. Arzu ARAL'a,

En kötü günümde tanıştığım, benimle birlikte ağlayan ve gülen, her zaman bana destek olan çok değerli arkadaşım Nihan ÖRÜKLÜ'ye,

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalında doktora öğrencilikleri sırasında tanıştığım ve arkadaşlıkları ile bana her zaman destek olan Emine YAVUZ, Handan AKSOY, Süheyla HASGÜR ve Sanem GÖKÇEN'e

Her zaman benim yanımda olan, her konuda beni maddi ve manevi olarak destekleyen, bu dünyadaki en değerli varlıklarım babam ve ablama,

Fiziksel olarak yanımda olamasa da, varlığını her zaman yanımda hissettiğim, beni ben yapan, kıymetlime... *ANNEME*...

Sonsuz Teşekkürler...

Bu tez Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından Proje No: 0192-SanTez-2013-1 projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antikorlar	3
2.1.1. Tarihçe.	3
2.1.2. Antikoru moleküler yapısı	4
2.1.3. Hafif zincirin özellikleri	5
2.1.4. Ağır zincirin özellikleri	6
2.1.5. Epitop ve paratop	8
2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü	8
2.2.1. VEGF-A	10
2.2.2. VEGF-B	14
2.2.3. VEGF-C	16
2.2.4. VEGF-D	17
2.2.5. Plösentel büyüme faktörü	17

Sayfa

2.2.6. VEGF-E.....	18
2.2.7. VEGF-F	18
2.3. VEGF Reseptörleri	19
2.3.1. Yardımcı reseptör neuropilin.....	20
2.3.2. VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase; Flt-1)	21
2.3.3. VEGFR-2 (flk-1/KDR fetal liver kinase-1).....	22
2.3.4. VEGFR-3 (Fms-like tyrosine kinase 4; Flt-4).....	22
2.4. VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	23
2.4.1. Düşük oksijen konsantrasyonunun etkisi (hipoksi).....	23
2.4.2. Büyüme faktörleri ve hormonların etkisi.....	24
2.4.3. Onkogenlerin etkisi	25
2.5. Tümör Anjiyogenezinde VEGF'in Önemi	25
2.6. VEGF-A'nın Tümör Mikroçevresindeki İmmün Baskılayıcı Özelliği	29
2.7. Antikor Karakterizasyonu İçin Tez Kapsamında Kullanılan Metotların	
Temel Prensipleri	33
2.7.1. ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	34
2.7.2. İmmünofloresan Boyama	35
2.7.3. Western Blot.....	36
2.7.4. Flow Sitometri	37
3. MATERYAL ve METOT	39
3.1. Araç ve Gereçler	39
3.1.1. Hücre serileri.....	39
3.1.2. Kimyasallar.....	40

	Sayfa
3.1.3. Antikorlar	42
3.1.4. Kitler.....	43
3.2. Yöntemler	43
3.2.1. Hibridoma ve Kanser Hücre Serilerinin Kültürü.....	43
3.2.2. Hücre pasajlaması	44
3.2.3. Hücre sayısı ve canlılığının tespit edilmesi (<i>Trypan Blue Exclusion</i>)	44
3.2.4. Hızlı performans sıvı kromatografisi.....	44
3.2.5. Antikor konsantrasyonlarının belirlenmesi (Lowry Metodu)	45
3.2.6. SDS-PAGE	45
3.2.7. ELİSA.....	46
3.2.8. Hücre içi boyama ve akım sitometrisi analizleri	46
3.2.9. İndirek immün floresan boyama.....	47
3.2.10. İmmünpresipitasyon.....	47
3.2.11. SDS- PAGE	48
3.2.12. Western Blotting.....	48
4. BULGULAR	51
4.1. Hibridoma Klonlarının Taranması ve Çoğaltılması	51
4.2. Antikorların Saflaştırılması	52
4.3. Anti- VEGF-A Antikorlarının Saflığının Gösterilmesi.....	54
4.4. Anti- VEGF-A Antikorlarının Konsantrasyonları	56
4.5. Anti-VEGF-A Antikorlarının ELİSA İçin Karakterizasyonu.....	57
4.6. Anti-VEGF-A Antikorlarının Akım Sitometrisi Karakterizasyonu	63
4.7. Anti-VEGF-A Antikorlarının Hücre İçi Boyama Tekniği İçin Karakterizasyonu	67

Sayfa

4.8. Anti-VEGF-A Antikorlarının Western Blot İçin Karakterizasyonu	71
4.9. Hücre Lizatlarındaki VEGF-A'nın Anti-VEGF-A Antikorları ile Gösterilmesi.....	73
5. TARTIŞMA	79
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	107



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. VEGF üyelerinin kromozomal lokasyonu, transkript boyutu ve protein ağırlığı	9
Çizelge 3.1. Hücre Serileri	39
Çizelge 3.2. Kimyasallar	40
Çizelge 3.3. Antikorlar	42
Çizelge 3.4. Anti VEGF-A antikorlarının izotipleri	43
Çizelge 3.5. Kitler	43
Çizelge 4.1. Anti-VEGF-A antikorlarının konsantrasyonları	57
Çizelge 4.2. 5D6.5 antikorunun ELİSA için karakterizasyonunda elde edilen optik dansite değerlerinin ortalaması ve optik dansite değerlerinin standart sapması	59
Çizelge 4.3. 1B4.2 antikorunun ELİSA için karakterizasyonunda elde edilen optik dansite değerlerinin ortalaması ve optik dansite değerlerinin standart sapması	61
Çizelge 4.4. 3B2.1 antikorunun ELİSA için karakterizasyonunda elde edilen optik dansite değerlerinin ortalaması ve optik dansite değerlerinin standart sapması	63
Çizelge 4.5. Anti-VEGF-A antikorlarının in vitro yöntemlerde antijene bağlanabilirliğinin derecelendirilmesi	78

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Hibridoma klonlarının ELİSA yöntemi ile taranması sonucu örneklerden elde edilen renk değişim.....	52
Resim 4.2. 5D6.5 antikoru ile yapılan immünofloresan boyama görüntüleri	68
Resim 4.3. 1B4.2 antikoru ile yapılan immünofloresan boyama görüntüleri.....	69
Resim 4.4. 3B2.1 antikoru ile yapılan immünofloresan boyama görüntüleri.....	70



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. VEGF-A geni ve alternatif uç birleştirme	13
Şekil 2.2. VEGF reseptörleri ve ligantları	23
Şekil 2.3. Hipoksinin VEGF gen ifadenmesi üzerine etkisi.....	24
Şekil 2.4. VEGF'in dendritik hücre matürasyonuna etkisi.....	31
Şekil 2.5. VEGF'in immün sistem hücreleri üzerindeki etkisi	33
Şekil 4.1. 5D6.5 antikorunun protein G kolonu ile saflaştırma grafiği.....	53
Şekil 4.2. 1B4.2 antikorunun protein G kolonu ile saflaştırma grafiği	53
Şekil 4.3. 3B2.1 antikorunun HiTrap İgM saflaştırma kolonu ile saflaştırma grafiği.....	54
Şekil 4.4. 5D6.5 ve 1B4.2 antikorlarının SDS PAGE jel görüntüsü.....	55
Şekil 4.5. 3B2.1 antikorunun SDS PAGE jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.6. BSA standart eğri grafiği	57
Şekil 4.7. Antikor 5D6.5'in konsantrasyona göre optik dansite değişimi	58
Şekil 4.8. Antikor 1B4.2'in konsantrasyona göre optik dansite değişimi.....	60
Şekil 4.9. Antikor 3B2.1'in konsantrasyona göre optik dansite değişimi.....	62
Şekil 4.10. 5D6.5 antikorunun HeLa hücreesindeki VEGF-A ile reaktivitesinin akım sitometri ile analizi.....	65
Şekil 4.11. 1B4.2 Antikorunun HeLa hücreesindeki VEGF-A ile reaktivitesinin akım sitometri ile analizi.....	66
Şekil 4.12. 3B2.1 antikorunun HeLa hücreesindeki VEGF-A ile reaktivitesinin akım sitometri ile analizi.....	67
Şekil 4.13. rhVEGF-A proteinin SDS-PAGE jeldeki görüntüsü	71
Şekil 4.14. 5D6.5 antikoru ile yapılan Western blot görüntüsü.....	72

Şekil	Sayfa
Şekil 4.15. 3B2.1 antikoru ile yapılan Western blot görüntüsü	73
Şekil 4.16. Bevacizumab kullanılarak yapılan Western blot görüntüsü.....	74
Şekil 4.17. Hücre lizatları ile 5D6.5 antikoru kullanılarak yapılan Western blot görüntüsü.....	75
Şekil 4.18. Hücre lizatlarında 1B4.2 antikoru kullanılarak yapılan Western blot görüntüsü	76
Şekil 4.19. Hücre lizatlarında 3B2.1antikoru kullanılarak yapılan Western blot görüntüsü	77



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler Açıklamalar

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
CO ₂	Karbon dioksit
dk	Dakika
μ g	Mikrogram
mL	Mililitre
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre

Kısaltmalar Açıklamalar

CC	Servikal kanseri
DII4	Delta-like-4
ECM	Hücreler arası matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA	<i>Enzyme Linked Immonosorbent Assay</i>
Epo	Eritropoetin
FATP3	Yağ asit transport protein 3
FBS	<i>Fetal bovin serum</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
HIF-1	Hipoksi ile indüklenen Faktör
IFN	İnterferon

Kısaltmalar	Açıklamalar
İgG	İmmünglobülin G
İgM	İmmünglobülin M
İL	İnterlökin
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
MDSC	Myeloid kökenli supresör hücreler
MMPs	Matriks metalloproteinaz
mRCC	Metastatik renal hücreli kanser
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NRP	<i>Neuropilin</i>
NSCLC	Skuamoz olmayan küçük hücreli dışı akciğer kanseri
PAI-1	Plasminojen aktivatör inhibitörü 1
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PIGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
prOC	Peritoneal kanser
rGBM	<i>Glioblastoma multiform</i>
RTK	Reseptör trozin kinaz
TAM	Tümör ile ilişkili makrofajlar
TGF- α	<i>Transforming growth factor-a</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-b</i>
uPA	Urokinaz tip plasminogen aktivatör
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFR-1	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1
VEGFR-2	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2
VEGFR-3	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 3
VPF	Vasküler geçirgenlik faktörü

1. GİRİŞ

Monoklonal antikorlar oldukça özgül olarak antijenik bir epitopa bağlanabilen ve hibridoma biyoteknolojisi yöntemleriyle geliştirilerek üretilebilen biyomoleküllerdir. Çeşitli kanserler ve otoimmün hastalıklar gibi yaygın hastalıkların tedavisinde bağışıklık sisteminin önemli bir unsuru olabilmelerinin yanı sıra, organik ve inorganik birçok molekülün tanısında kullanılabilirlikleri bilinmektedir. Tedavi ve moleküler tanı amacıyla kullanılabilmesi için, geliştirilerek saflaştırılmalarını takiben, mutlaka karakterize edilmeleri gereklidir. Monoklonal antikorların moleküler karakterizasyonu çeşitli yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Bu karakterizasyon işlemleri sonucuna dayanarak, antijenik özgüllükleri ve antijene bağlanma kapasiteleri hakkında elde edilecek bilgiler, monoklonal antikorların hangi tedavi ve tanı işleminde veya yönteminde daha uygun olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmaktadır. Bu tez konusu kanser tedavisi ve/veya vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF-A) moleküler tanısında kullanılması tasarlanan anti-VEGF-A monoklonal antikorların moleküler karakterizasyonunu kapsamaktadır. VEGF-A damarlanma veya anjiyogenez oluşumunda çok önemli bir elemandır. Dolayısıyla tümörün vaskülarizasyonu, beslenmesi ve gelişiminde önemli bir tetikleyicidir.

VEGF, endotel hücrelerinin gelişimi, farklılaşması, proliferasyonu ve migrasyonundan sorumludur. Ayrıca vasküler geçirgenliği de arttırmaktadır. VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plasental Büyüme Faktörü (PlGF), viral VEGF (VEGF-E) ve yılan zehiri VEGF (VEGF-F) olmak üzere 7 üyeden meydana gelmektedir [1, 2]. VEGF-A ve PlGF anjiyogenezi tetiklerken, VEGF-C ve VEGF-D lenfanjiyogenezi uyarır. VEGF-B, endotel hücrelerinin, düz kasların ve perist hücrelerinin üzerinde önemli etkisi olan bir sağkalım faktörüdür. VEGF molekülleri etkilerini hücreler üzerinde ifadelenen reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirmektedir [3-5]. VEGFR'leri protein-tirozin kinaz ailesi üyelerindendir. Üç tane VEGF reseptörü bulunmaktadır. Bunlar VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3'dür. Ayrıca neuropilin adı verilen yardımcı bir reseptör sayesinde, hücrede oluşan sinyal daha güçlü hale gelmektedir [6, 7].

Tümör gelişiminde anjiyogenezin çok önemli bir yeri vardır. Tümör hücreleri anjiyogenez olmadan sadece 1-2 milimetre büyüklüğe ulaşabilir. Bu büyüklüğe gelene kadar tümör hücreleri için gerekli olan besin maddesi ve oksijen pasif difüzyon ile çevreden sağlanır. Tümör hücrelerinin büyümesi ve metastazı için damarlanma şarttır ve bu da "anjiyogenik dönüşüm" (*angiogenic switch*) ile başlar. VEGF-A diğer VEGF ailesi üyelerine oranla tümörün damarlanmasında daha etkili bir rol oynamaktadır. Damarlanma için gerekli olan VEGF-A, hem tümör hücreleri hemde tümör stromasındaki hücreler tarafından üretilmektedir [8]. Tümör çevresindeki VEGF sadece damarlanmada değil aynı zamanda tümör çevresinde immünsüpresif bir ortamın oluşmasında da etkilidir [9].

Tümör gelişimi için anjiyogenezin şart olması kanser tedavisinde anjiyogenezi önemli bir hedef haline getirmiştir. Günümüzde FDA (*US Food and Drug Administration*) tarafından onaylanan ve VEGF-A molekülünü hedef alan monoklonal antikor tabanlı ilaçlar, VEGF dekok reseptörleri ve hücre içi sinyalizasyonu engelleyen reseptör tirozin kinaz inhibitörleri bazı kanser türleri tedavisinde kullanılmaktadır [2, 10, 11].

Çalışmamızda Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Araştırma Laboratuvarında daha önceden VEGF-A'ya karşı geliştirilmiş olan üç farklı anti-VEGF-A monoklonal antikorunun moleküler ve immünolojik karakterizasyonu yapıldı. Karakterizasyon işlemlerinde moleküler büyüklük ve protein analizi için SDS-PAGE gibi metotların yanı sıra, antijen-antikor reaksiyon temeline dayanan ELİSA, akım sitometri, hücre içi boyama ve Western blot yöntemleri kullanıldı. Saflaştırılan monoklonal antikorların fiziki özellikleri ve antijen-antikor reaksiyonu kapasiteleri, her bir moleküler analiz yönteminde ayrı ayrı araştırılarak, uygunluk özellikleri irdelendi. Çalışılan üç farklı monoklonal antikordan her biri farklı karakteristik özellikler gösterdi. Bu özelliklere dayanarak, bu tez konusu kapsamında karakterizasyonu yapılan monoklonal antikorların, VEGF-A'nın moleküler tanısında hassas bir şekilde ölçülebilmesi amacıyla kullanılabilirliğinin yanı sıra, anjiyogenezin engellenmesinde birer antianjiyogenik ajan olabileceği de düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antikorlar

2.1.1. Tarihçe

Antikorlar ya da diğer adları ile immünoglobülinler multimerik, glikoprotein yapısında moleküllerdir. Hümorale immün yanıtın efektör elemanları olarak iş görürler. 1890'lı yıllarda Emil Behring ve Shibasaburo Kitasato tarafından difteri toksini ile yapılan bir çalışma sonucu keşfedilmiştir. Bu araştırmacılar difteri toksininin atenuye edilmiş bir formu ile immünize ettikleri hayvanların serumlarında, koruyucu bir maddenin meydana geldiğini bulmuşlardır. İmmünize edilen hayvanların serumları alınıp, immünize olmayan ve toksin verilen hayvanlara transfer edildiğinde, bu hayvanların hasta olmadığı görülmüştür. Yapılan bu çalışma ile serum içerisinde bulunan bir maddenin difteri toksinini nötralize ettiği anlaşılmıştır [12]. "Anti serum" içindeki bu aktif ajana ilk olarak "antitoksin" adı verilmiştir. 1900 yılında Karl Landsteiner tarafından yapılan çalışmalar sonucunda, serumda bulunan ve nötralizan özelliği olan bu maddelerin sadece mikrobiyal toksinlerden dolayı oluşmadığı, başka bakterilerin de bu maddelerin oluşumuna neden olabileceği gösterilmiştir. İmmün serumların içindeki bu maddelerin bakterilerin aglütinasyonuna sebep olduğu ve bazı koşullarda bakterileri lizis ettiği de anlaşılmıştır. Yani bu maddelerin tek özelliği nötralizan etkiye sahip olmaları değildir. Bu çalışmalardan sonra bakteriler ile reaksiyona giren bu maddeler "antikörper (antikor)" olarak adlandırmıştır [13]. Deutsch ise 1899 yılında antikor oluşumuna neden olan ya da antikorlar tarafından tanınan maddelere "antijen" adını vermiştir [14]. 1900'lü yıllarda yapılan bu çalışmalar modern immünolojinin doğumuna neden olan en önemli olaylardır [15].

1939 yılında ise Arne Tiselius ve Elvin Kabat kan serum proteinlerini elektroforez yöntemi ile ayırmış ve proteinlerin elektrik yüklerine göre tabakalara ayrıldığını tespit etmişlerdir. Bu tabakalar albümin, alfa globülin, beta globülin ve gamma globülin olarak isimlendirilmiştir. Belirli bir antijene karşı bağışık hale getirilmiş olan hayvanların serumlarında, immünize edilmeyenlere oranla gamma globülin fraksiyonunda artış

görülmekle birlikte, immün serumlar özgül antijen ile karıştırıldığında gamma globülin fraksiyonunda azalma olduğu görülmüştür. Bu çalışma neticesinde gamma globülin fraksiyonunun majör antikor içeren fraksiyon olduğu anlaşılmış ve antikorlar gamma globülinler olarak adlandırılmıştır. Bu fraksiyondan saflaştırılan antikorlar ise immünoglobülin G olarak isimlendirilmiştir [13, 16].

Hümöral immün yanıtın elemanları olan antikorlar hem membrana bağlı hem de çözülebilir formda bulunurlar. B lenfositlerinin yüzeylerinde membrana bağlı olarak bulunan antikorlar, B hücre reseptör kompleksinde antijeni özgül olarak tanıyan öge olarak iş görür. Naive B hücrelerinin yüzeyindeki immünoglobülin reseptörleri özgül antijenleri ile bağlandığında B lenfositler aktive olur ve antijene karşı immün yanıt başlar. Aktive olan B hücresi, antikor salgılayan plazma hücrelerine farklılaşır. Plazma hücrelerinin salgıladığı antikorlar ile membrana bağlı immünoglobülin aynı antijene özgüdür. Plazma hücrelerinden salgılanan antikorlar serumda, mukozada ve dokular arası sıvıda yoğunlaşır. Bu antikorlar yabancı antijenleri tanıyarak onların yok edilmesi için bazı efektör mekanizmaları aktive eder. Antijenlerin yok edilmesi için kompleman proteinleri ve fagositler gibi diğer immün sistem elemanlarının antikorlar ile etkileşimi gereklidir [13, 15].

2.1.2. Antikorum moleküler yapısı

Antikorlar glikoprotein yapısında olan moleküllerdir. Antikorların yapısal özellikleri 1950 ve 1960'lı yıllarda Gerald Edelman ve Rodney Porter tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bütün antikorların ortak bir çekirdek yapısı vardır ve "Y" harfine benzer biçimdedirler. Antikorlar iki adet ağır (55-77 kDa *H chain*) ve iki adet hafif polipeptit zincirinden (25 kDa *L chain*) (H_2L_2) meydana gelir. Genetik olarak bir B hücresi sadece bir çeşit ağır zincir ve yine sadece bir çeşit hafif zincir üretebilir. Bu yüzden bir antikor molekülünde bulunan iki ağır zincir birbirinin aynısı olduğu gibi iki hafif zincir de birbirinin aynısıdır [12, 17]. Bir antikoru oluşturan ağır zincir peptitleri, birbirlerine iki ya da daha fazla kovalent disülfid bağları ile bağlanırken, hafif zincirler de ağır zincirlere disülfid bağı ile bağlanır. Molekülü oluşturan disülfid bağlarının sayısı ve pozisyonu antikor izotipleri ve alt tiplerine göre değişiklik gösterir. Aminoasitler arasındaki hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi kovalent olmayan bağlar da bu dört polipeptit zincirinin birbirlerine tutunarak tek bir molekülü

oluşturmasına katkı sağlar [12]. Ağır ve hafif zincirlerde, her biri yaklaşık 70-110 aminoasitin (~12 kDa) katlanması ile oluşan ilmi yapıya benzer, tekrarlayan, homolog birimler bulunur. Bu birimler immünoglobülin kıvrımı (*domain*) olarak adlandırılır. Her bir immünoglobülin kıvrımı iki adet β -pileli tabakadan oluşur. Her bir tabakada üç ya da beş adet anti-paralel polipeptit zinciri bulunur. İki tabaka birbirine disülfid bağları ile bağlıdır [15]. Bu karakteristik kıvrım immünoglobülin süper ailesinin üyelerini tanımlar [18].

Bütün antikorlar aynı moleküler yapıya sahip olmasına rağmen farklı antikorlar farklı antijenleri tanır. Bu farklılığın sebebi antikorların aminoasit sekanslarının karşılaştırılmasıyla anlaşılmıştır. Antikorların ağır ve hafif zincirlerinin amino-terminal bölgesindeki aminoasit dizilerinde farklılıklar bulunmaktadır. Bu bölgeye değişken (*variable*, *V*) bölge adı verilmiştir. Hafif zincirdeki değişken bölge V_L , ağır zincirdeki değişken bölge ise V_H olarak gösterilmektedir. Ağır ve hafif zincirlerin değişken bölgelerinde birer adet immünoglobülin kıvrımı bulunur. Bir antikorda V_H ve V_L bölgeleri birlikte antijenin bağlandığı bölgeyi oluşturur. Bir antikor iki hafif ve iki ağır zincirden (H_2L_2) oluştuğu için bütün antikordarda iki tane antijen bağlama bölgesi bulunur. Bazı antikor izotiplerinde ise bu temel yapının sayısı birden fazladır. Bu yüzden antijen bağlayan bölge sayısı daha fazla olabilir. Değişken bölge dışında kalan diğer bölgelerin aminoasit dizisindeki farklılık çok azdır. Bu bölgeler sabit bölge (*constant*, *C*) olarak adlandırılır. Hafif zincirin sabit bölgesinde bir adet immünoglobülin kıvrımı (C_L) bulunurken, ağır zincirde ise antikor izotipine göre bu sayı üç veya dört adet ($C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}$) olabilir [14, 19, 20].

2.1.3. Hafif zincirin özellikleri

Antikorum moleküler yapısının anlaşılması multiple miyelom denilen ve antikor üreten plazma hücrelerinin kanseri olarak tanımlanan hücrelerin keşfiyle başlamıştır. Normal plazma hücreleri birkaç gün antikor salgıladıktan sonra ölen hücrelerdir. Bundan farklı olarak multipl miyelomda plazma hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalır ve ölümsüzdür. Pek çok hastada miyelom hücreleri fazla miktarda hafif zincir üreterek, salgırlar. Bu hafif zincirler ilk olarak idrarda saptanmıştır. Bu proteinlere Bence-jones proteinleri adı verilmiştir. Bence-jones proteinlerinin yani antikorum hafif zincirinin aminoasit sekansları

incelenerek hafif zincirin moleküler yapısı hakkında bilgiler elde edilmiştir [21]. Hafif zincir yaklaşık olarak 214-216 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlığı 22- 25 kDa civarındadır. Hafif zincirin amino terminal kısmında 100-110 amino asitlik bölge farklı Bence jones proteinlerinde farklılık göstermektedir. Bu kısım değişken bölge (V) olarak adlandırılır. Hafif zincirin karboksi terminal kısmı ise sabit bölge (C) olarak isimlendirilmektedir. Sabit bölgede iki farklı amino asit sekansı bulunabilir. Bundan dolayı hafif zincirler kappa veya lambda olarak adlandırılır. İnsanlarda kappa hafif zincir oranı %60 iken lambda hafif zincir oranı %40 civarındadır. Farelerde ise %95 oranında kappa ve %5 oranında da lambda hafif zinciri bulunur. Bir antikorda ya kappa ya da lambda hafif zinciri bulunur. İki zincir aynı antikorda asla bir arada bulunamaz. Kappa ve lambda zincirlerini içeren antikorlarda fonksiyonel bir farklılık bulunmazken neden böyle bir farklılığın olduğu hala net olarak bilinmemektedir. Lambda hafif zincirinde minör aminoasit farklılıkları bulunabilir. Bu farklılıklardan dolayı lamda hafif zincirinin insanda dört tane alt tipi, farelerde ise üç tane alt tipi vardır [22, 23].

2.1.4. Ağır zincirin özellikleri

Ağır zincir, hafif zincirden daha büyük olmasına rağmen, yapısal olarak hafif zincire benzer. Bunların da amino-terminal kısımlarında 110 aminoasitten oluşan değişken bölge yapısı bulunur. Sabit bölgesinde ise antikor izotipine göre değişiklik gösteren sayıda üç veya dört tane immünoglobülin kıvrımı bulunur. Hafif zincirde olduğu gibi ağır zincirde de aminoasit dizilimindeki farklılıklar izotip olarak adlandırılan formların oluşmasına neden olur [24]. İzotiplerdeki bu aminoasit farklılıkları antikorun boyutuna, yüküne, çözünürlüğüne ve yapısal özelliğine etki ederek, antikorun vücudun hangi bölgesine gideceğini, yüzey reseptörleri ya da diğer moleküller ile nasıl etkileşeceğini belirler. Bilinen beş tane majör ağır zincir izotipi vardır. Bu izotiplerin immün yanıtta farklı fonksiyonları bulunur. İzotipler immünoglobülin A (İgA), immünoglobülin D (İgD), immünoglobülin E (İgE), immünoglobülin G (İgG) ve immünoglobülin M (İgM)'dir [25, 26]. İzotipler α , δ , ϵ , γ , μ yunan harfleri ile gösterilirler. Farklı ağır zincir izotiplerinde yaklaşık olarak %30 civarında sekans benzerliği vardır[13]. α , δ ve γ izotiplerinde sabit bölgede yaklaşık olarak 330 aminoasit ve 3 adet C_H kıvrımı bulunurken μ ve ϵ izotiplerinde sabit bölgede 440 aminoasit vardır ve 4 adet C_H kıvrımından meydana gelir. İnsanlarda α ve γ

izotiplerinde, farelerde γ izotiplerinde bulunan aminoasitlerdeki minör farklılıklardan dolayı alt sınıflar bulunmaktadır. Bunlar insanlarda IgA1 , IgA2 , IgG1 , IgG2 , IgG3 ve IgG4 'tür. Farelerde ise IgG1 , IgG2a , IgG2b , ve IgG3 'tür. α , δ ve γ ağır zincirlerinde C_H1 ve C_H2 bölgeleri arasında bulunan, prolin, serin, threonin aminoasitleri açısından zengin ve esnek yapıda olan bölgeye menteşe bölgesi (*hinge*) denilmektedir. Menteşe bölgesi antikorun sabit bölgesindeki diğer immünoglobülin kıvrımları ile benzerlik göstermemektedir. Bu kısım IgG , IgD ve IgA antikorlarına esneklik sağlamaktadır. Her antikor en az iki tane antijen bağlama bölgesine (Fab) sahiptir. Menteşe bölgesinden kaynaklı esneklik sayesinde antikorun Fab kısımları farklı uzaklıkta bulunan antijenik yapılara bağlanabilir [22].

Antikorlar hem salgılanmış hem de membrana bağlı formda bulabilir. Membran formunda olan bir immünoglobülin molekülü hidrofobik bir transmembran segmenti ile plazma membranına bağlanır. Membran immünoglobülini (mIg) B hücreler yüzeyinde bir reseptör olarak iş görür ve immün yanıt sırasında antijen spesifik B hücrelerin aktivasyonunda çok önemli bir rol oynar. Antikorun membrana bağlı formu ve salgılanan formu arasındaki aminoasit sekans farklılığı, ağır zincirin C-terminal bölgesindedir. Öncül RNA'da meydana gelen bir alternatif uç birleşmesi sonucu membrana bağlı form ya da salgılanan form meydana gelir. Salgılanan formda ağır zincirin C-terminal kısmındaki hidrofilik aminoasitlerin sayısı daha fazladır. Membran formunda ise yaklaşık 26 aminoasitten oluşan hidrofobik bir transmembran segmenti bulunmaktadır [13].

Hem ağır hem de hafif zincirin değişken (V) bölgelerindeki bazı kısımlar olağanüstü değişkenlik gösterir. Bu bölgeler aşırı değişken bölge (*hypervariable region, HV*) olarak isimlendirilir. Aşırı değişken bölgeler, değişken bölgenin yaklaşık olarak %15-20 kadarını oluşturur. Antijenlerin özgül olarak tanınması bu bölgedeki beş-yedi aminoasit ile gerçekleşmektedir. Bu bölge tamamlayıcılığı belirleyen bölge (*complementarity-determining reagents, CDR*) olarak da adlandırılmaktadır. İnsan ve farelerin ağır ve hafif zincirlerinde üçer adet aşırı değişken bölge vardır. V_L ve V_H bölgelerinin geri kalan kısmı daha az farklılık göstermektedir. Bu parçalara iskelet bölgesi (*framework region, FRs*) denilmektedir[12, 14].

Antijen ve antikor arasındaki bağlanma kovalent olmayan birkaç bağın bir araya gelmesi ile gerçekleşir. Bu bağlar hidrojen bağları, elektrostatik bağlar, Van der Waals güçleri ve hidrofobik güçlerdir. Bu bağlar tek başına güçlü bağlar değildir fakat hep birlikte antikor ve antijen arasında çok sıkı bir bağ oluşur. Yüksek tuz konsantrasyonu, deterjanlar ile muamele ve fizyolojik olmayan pH aralığında bu bağ geri dönüşümlü olabilir [18].

2.1.5. Epitop ve paratop

Antijenler, antikorum özgül tanıma bölgesine oranla daha büyük moleküllerdir. Bu yüzden bir antikor bütün bir antijen molekülü yerine antijendeki belirli bölgeleri tanır. Antikorum antijene bağlandığı bu bölgelere antijenik determinant ya da epitop, epitopa bağlanan antikor bölgesine de paratop denir. Antikorlar epitoplarına son derece özgül bir şekilde bağlanır. Epitopun şeklinde ya da kimyasal yapısında meydana gelebilecek olan en ufak bir değişiklik antikorum bu epitopa bağlanmasını ortadan kaldırabilir [27, 28]. Karbonhidratlar, proteinler, lipitler, nükleik asitler antijenik determinant olabilir. Proteinlerdeki epitoplar genellikle iki gruba ayrılır. Bunlar lineer epitoplar ve konformasyonel epitoplardır. Proteinlerdeki bazı antijenik determinantlar proteinin moleküler yapısı primer haldeyken ortaya çıkar. Yan yana dizilmiş birkaç aminoasitten oluşan bu epitoplara lineer epitop denir. Naive bir proteinde bu lineer epitop, proteinin dış yüzeyinde ise antikor tarafından tanınabilir. Fakat genellikle naive bir proteinde lineer epitoplar proteinin daha iç yüzeyinde olduğu için ancak protein denatüre edilince ortaya çıkmaktadır. Konformasyonel epitoplarda ise aminoasitler bir sıra halinde değildir. Antikora bağlanan aminoasitler, proteinin üç boyutlu yapısında yan yana gelmiştir. Antijenler denatüre edildiği zaman bu tip epitopların yapısı bozulabileceği için bu antijenlere, antikorlar bağlanamaz [15, 29].

2.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) , heparine bağlanabilen, glikoprotein yapıda, anjiyogenik bir büyüme faktörüdür. Özellikle endotel hücreler için spesifik bir mitojendir. Vasküler endotelyal hücrelerin sağ kalımından, gelişiminden, farklılaşmasından, proliferasyonundan ve migrasyonundan sorumludur. Ayrıca vasküler geçirgenliği,

histamine oranla 50 000 kat daha fazla arttırabilmektedir. Bu yüzden vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak da adlandırılmaktadır [1, 30-33]. Yapılan pek çok çalışma VEGF'in hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogeneze çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Embriyogeneze sırasında VEGF ve reseptörleri kan damarlarında ifade olmaktadır. Embriyonik dönemde VEGF ve/veya reseptörleri hedeflenerek yapılan gen susturma çalışmalarında doğru ve tam bir vaskülogenez gerçekleşemediği için erken embriyonik ölümler meydana gelmektedir. Tümör büyümesi, diyabetik retinopati, romatoid artrit gibi hastalıklarda meydana gelen patolojik anjiyogeneze de VEGF'in önemli bir rolü bulunmaktadır. VEGF fonksiyonunun inhibe edilerek, patolojik anjiyogenezin engellenebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur [33, 34].

İnsan VEGF gen ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve Plasental Büyüme Faktörü (PlGF) olmak üzere 5 üyeden oluşur. Ayrıca parapoxvirus, Orf virüs genomunda da VEGF ile hem yapısal hem de aktivite olarak benzerlik gösteren bölge bulunmaktadır. Bu protein VEGF-E olarak adlandırılmaktadır. Yılan zehrinde de svVEGF olarak adlandırılan benzer bir protein bulunmaktadır. VEGF ailesi anjiyogeneze, lenfanjiyogeneze ve vaskülogenezde bütünüleyici bir rol oynamaktadır [1, 5, 30, 35-37].

Çizelge 2.1. VEGF üyelerinin kromozomal lokasyonu, transkript boyutu ve protein ağırlığı [6]

	Kromozomal Lokasyon	Majör mRNA Transkript Boyutu (kb)	Majör Protein Ağırlığı (kDa)
VEGF-A	6P23.1	3,7- 4,5	21
VEGF-B	11q13	1,4	21, 30
VEGF-C	4q34	2,4	20-21
VEGF-D	Xp22.31	2,2	20-21
PlGF	14q24	1,7-1,2	38,30

VEGF ailesi ligandları için, üç adet reseptör protein-tirozin kinaz (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) ve iki tane enzimatik olmayan yardımcı reseptör bulunmaktadır. Bunlar Neuropilin-1 ve Neuropilin-2 yardımcı reseptörleridir. Bazı VEGF ailesi ligandları bu reseptörlerden farklı olarak, plazma membranında ve ekstrasellüler matrikste bulunan heparan sülfat proteoglikanlara da bağlanabilmektedir [38, 39].

2.2.1. VEGF-A

VEGF-A vaskülogenezde, anjiyogeneze ve progenitör endotel hücrelerin farklılaşmasında anahtar rol oynamaktadır. Bu yüzden VEGF-A genellikle VEGF olarak tanımlanmaktadır. VEGF-A pek çok hücre tarafından üretilmektedir. Ortama salınan VEGF-A parakrin olarak endotel hücrelere etki ederek bu hücrelerde bir dizi sinyal oluşumunu tetikler ve hücre fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca endotel hücreler de VEGF-A sentezleyerek otokrin etki ile kendi canlılıklarının devamını sağlarlar [40].

VEGF-A diğer VEGF ailesi üyeleri içerisinde en spesifik ve öne çıkan anjiyogenik faktördür. 34-42 kDa ağırlığında, homodimerik yapıda, disülfid bağlarıyla birbirine bağlı, glikoprotein yapıda bir moleküldür. Her bir VEGF peptidi tek başına yaklaşık 20 kDa ağırlığındadır. Biyolojik olarak aktif formda olabilmesi için homodimer yapıda olması gereklidir [41]. Yetişkin bireylerde akciğer, böbrek, kalp ve adrenal bezlerinde yüksek miktarda VEGF-A mRNA'sı bulunmaktadır. Karaciğer, dalak ve gastrik mukozada ise daha az miktarda VEGF-A mRNA'sı saptanabilmiştir. Bununla beraber VEGF-A mRNA ve proteini, meme kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde de tümör hücresi tarafından üretilerek, ortama salgılanmaktadır. Ortamdaki VEGF-A anjiyogenezi tetikleyerek tümörün büyümesi ve metastazına katkı sağlar. Bu yüzden VEGF-A kanser tedavisi için önemli bir hedeftir [35, 41, 42].

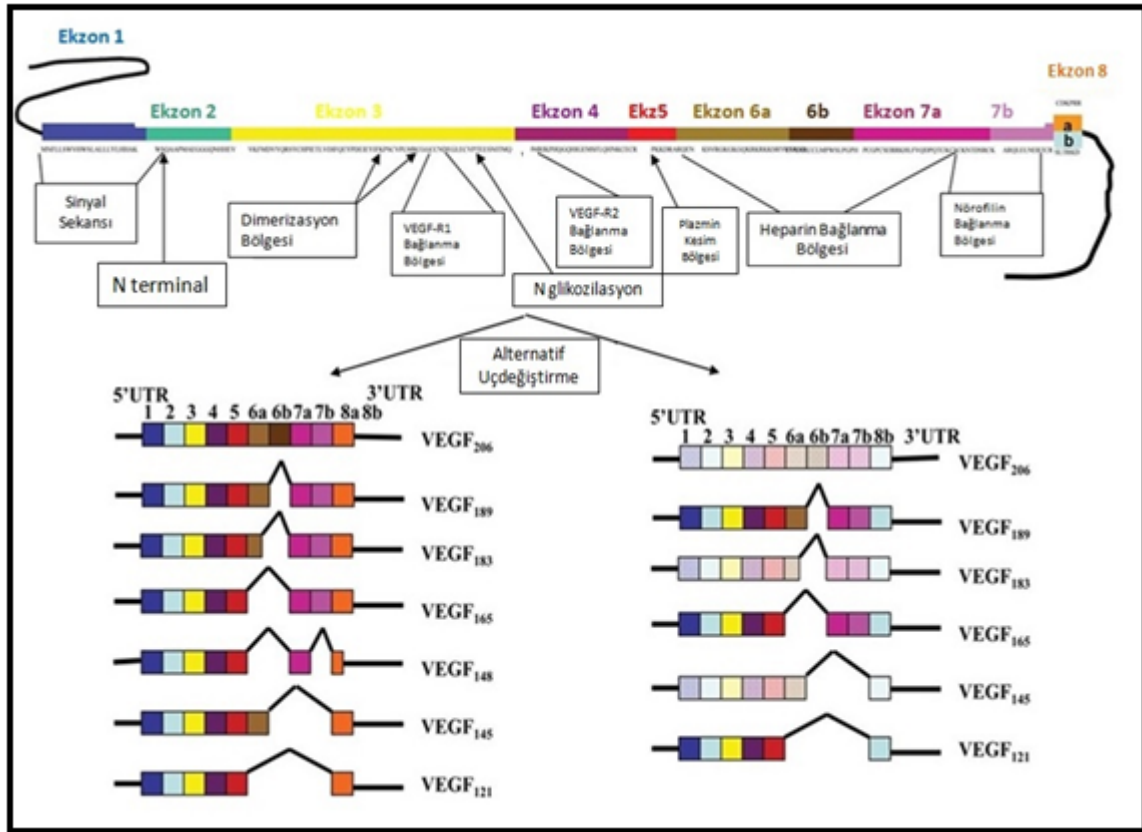
VEGF-A'nın keşfi 1980'lerin başında, çeşitli gruplar tarafından yapılan çalışmalarda benzer sonuçların ortaya çıkmasıyla gerçekleşmiştir. 1983 yılında, Senger ve arkadaşları kobay hepatoselüler karsinoma hücrelerinin içinde bulunduğu besiyerinden, vasküler geçirgenliği arttıran bir proteini izole etmiş ve bu proteini kısmen saflaştırmıştır [43, 44]. 1989 yılında Ferrara ve Henzel sığır hipofiz foliküler hücrelerinin bulunduğu besi yerinden, vasküler endotel hücrelerini mitozo yönlendiren, heparine bağlanabilen yeni bir protein

izole etmiştir. Bu protein sadece vasküler endotel hücrelerini aktive ettiği için, bu proteine VEGF adı verilmiştir. Bu proteinin amino terminal sekansındaki aminoasit dizilimi Ala-Pro-Met-Ala-Glu olarak belirlenmiş ve bu proteinin daha önceden bilinen endotel hücre mitojenlerinden farklı olduğunu gösterilmiştir[44, 45]. Connely ve arkadaşları kobay hepatoselüler karsinom besiyerinden vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak adlandırılan proteini izole edip saflaştırmıştır. Bu grup, VPF'nin vasküler endotel hücrelerine yüksek afinite ile bağlandığını göstermiştir. Bunun nedenini, endotel hücrelerinin yüzeyinde bu faktörün bağlanabileceği bir reseptörün var olduğu şeklinde açıklanmıştır[46-48] Ferrara ve Henzel, VEGF'i jel elektroforezinde yürüterek, indirgenmemiş koşullarda proteinin moleküler ağırlığını 46 kDa, indirgenmiş koşullara ise 23 kDa olarak göstermiştir. Connely ve Senger ise bu proteinin moleküler ağırlığını indirgenmemiş koşullarda 34-42 kDa aralığında, indirgenmiş koşullarda ise 17-24 kDa aralığında bulmuştur. Moleküler ağırlıkların değişiklik göstermesinin sebebi olarak, proteinin bazı kısımlarının proteolize olması ya da alternatif uç değiştirme sonucu farklı moleküler ağırlıkta izoformların olabileceği düşünülmüştür. Bütün farklılıklara rağmen VEGF'in disülfid bağları ile birbirine bağlanmış homodimer yapıda, indirgenmiş ve indirgenmemiş koşullarda farklı moleküler ağırlığa sahip ve tek bir N- terminal amino asit sekansı olan bir protein olduğu sonucuna varılmıştır. [1, 49, 50].

VEGF-A geni, 16,272 baz çifti uzunluğundadır. İnsanda kromozom 6p12 üzerinde yer alır. 8 adet ekzon ve 7 adet introndan oluşur. Hem ekzonlar hem de intronlardaki gen dizisi farklı türlerde sıkı bir şekilde korunmuştur. Her bir ekzondan kodlanan bölgeler, proteine belirli özellikler katmaktadır. Örneğin ilk dört ekzon sinyal peptidini, dimerizasyon kısmını, VEGF reseptörlerinin (VEGFR-1, VEGFR-2) tanınip bağlandığı kısmı kodlamaktadır. VEGF proteininde sinyal peptidinin bulunduğu aminoasit dizisinde bazı kesim işlemleri gerçekleşir ve protein matür hale gelerek sekrete edilir. Bu kesim işlemlerinin yapıldığı kısımlar ise ekzon 1 ve ekzon 2'de kodlanmaktadır. Ekzon 5'de plasmin ve matriks metalloproteinazlar tarafından kesim yapılabilecek bölgeler kodlanmaktadır. Ekzon 6, 7 ve 8'de ise heparine bağlanan bölge ile yardımcı bir reseptör olan Neuropiline (NRP) bağlanan bölge kodlanmaktadır. Ekzon 6, 7 ve 8'de oluşan alternatif uç birleştirme (*alternative splicing*) sonucu, aynı genden farklı proteinler sentezlenerek VEGF-A'nın farklı izoformları oluşur [51-54]. En çok bilinen 4 adet majör izoform bulunmakla birlikte son

yıllarda yapılan çalışmalar sonucu yeni izoformlar bulunarak izoform sayısı artmıştır. İzoformlar içerdikleri aminoasit sayıları ile numaralandırılır. Bu izoformlardan en bilinenleri VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆'dır [55, 56]. Alternatif uç birleştirme, ekzon 6, ekzon 7 ve ekzon 8'de oluştuğu için bütün VEGF izoformlarında ekzon 1-5 bulunmaktadır. Ekzon 6a ve 7'de VEGF izoformlarının heparine bağlanma özelliklerini içeren 2 adet blėe ve yardımcı reseptör Neuropiline (NRP) bağlanma blėesi kodlamaktadır. Bu özelliğe göre VEGF izoformları çözünüp difüze olabilen ya da ekstraselüler matrikse bağlı olarak kalan formlar olarak kategorize edilebilirler. VEGF 145, 189 ve 206'da ekzon 6 ve ekzon 7'de bulunan iki adet heparin bağlanma blėesine sahiptir. Bu yüzden ekstraselüler matriks yapısında heparin içeren proteoglikanlara bağlanarak hücre yüzeyine sıkı bir şekilde tutunurlar [7, 56].

VEGF₁₆₅ sadece ekzon 7'deki heparin bağlanma blėesini içerir. Bundan dolayı kısmen difüze olabilirken, VEGF₁₂₁'de ekzon 6 ve ekzon 7 deki bağlanma blėeleri yoktur. Bu yüzden VEGF₁₂₁ yüksek derecede difüze olabilir. VEGF-A'nın proteolitik olarak parçalanması bu molekülün biyoyararlılığını arttırabilmektedir. Örneğin VEGF₁₆₅ ve VEGF₁₈₉'un COOH-terminal kısmının plasmin tarafından kesilmesi sonucu oluşan ve N-terminal blėeden ilk 110 amino asitlik kısmı içeren biyoaktif haldeki molekül, yüksek derecede diffüze olabilen yapıdadır. Ayrıca matriks metalloproteinazlarda (MMP) VEGF₁₆₅'i COOH-terminal kısmından keserek heparine bağlanmayan ve difüze olabilen bir forma dönüştürebilmektedir [33, 57, 58].



Şekil 2. 1. VEGF-A geni ve alternatif uç birleştirme [59]

Bates ve arkadaşlarının 2002’de VEGF_{165b} adı verilen yeni bir izoform bulmalarıyla VEGF-A ailesi yeniden sınıflandırılmıştır [60]. Bu yeni sınıflandırmaya göre VEGF grupları VEGF_{xxx} (pro-anjiyogenik) ve VEGF_{xxx}b (anti-anjiyogenik) olarak gösterilmekte ve xxx matür proteindeki aminoasit sayısını belirtmektedir. VEGF_{xxx}b ile VEGF_{xxx} arasında % 94-98 oranında homoloji vardır. Bu gruplar arasında sadece 6 aminoasit farklılığı bulunmaktadır. Bu farklılığa bağlı olarak gruplardan biri (VEGF_{xxx}) anjiyogenezi tetiklerken, diğeri (VEGF_{xxx}b) anti-anjiyogenik etki göstermektedir. Bu alt gruplar ekzon 8’deki farklılıktan dolayı meydana gelmektedir. Ekzon 8 kendi içinde 8a (tgtgacaagccgaggcggtga) ve 8b (tctctcaccaggaaagactga) olmak üzere iki alt bölgeye ayrılmıştır [58, 61]. Ekzon 8a Cys-Asp-Lys-Pro-Arg-Arg aminoasitlerini kodlarken ekzon 8b Ser-Leu-Thr-Arg-Lys-Asp aminoasitlerini kodlamaktadır. Bu değişiklik nedeniyle proteinin yapısı nötral hale gelir ve bir adet disülfid bağı yok olur. Molekülde meydana gelen bu konformasyonel değişiklik nedeniyle VEGF_{165b}, reseptörü olan VEGFR-2 ve yardımcı reseptör olan NRP-1’e uygun bir şekilde bağlanamaz. Bunun sonucunda da sinyal iletiminde önemli farklılıklar meydana gelir [62]. VEGF₁₆₅ VEGFR-2 ve NRP-1’e bağlandığı zaman, dimerize olan reseptörün hücre

içinde bulunan kısmında bir rotasyon meydana gelir ve otofosforilasyon oluşur. VEGF_{165b} VEGFR-2 reseptörüne bağlandığı zaman ise reseptörün hücre içindeki kısmında farklı bir rotasyon olduğu için fosforilasyon olan bölge, VEGF₁₆₅'in uyarmasına bağlı olarak gerçekleşen fosforilasyondan farklı olur. Ayrıca VEGF_{165b}, COOH-terminal kısmında NRP-1'e bağlanmak için gerekli aminoasitleri bundurmadığından dolayı NRP-1'e bağlanamaz. VEGF₁₆₅ ve VEGF_{165b}'nin fonksiyonel farklılıklarının nedeni, NRP-1 yardımcı sinyalinin olmaması ya da NRP-1, VEGFR-2 ve VEGF₁₆₅ üçlü kompleksinin oluşturduğu sinyal kaskatının, VEGFR-2 ve VEGF_{165b} ikilisinin oluşturduğu sinyal kaskatından farklı olması şeklinde açıklanmaktadır [63, 64].

VEGF_{165b}, diğer bütün anti-anjiyogenik VEGF_{xxx}b faktörleri içerisinde ilk bulunan ve hakkında en çok araştırma yapılan majör anti-anjiyogenik izoformdur. Anti anjiyogenik izoformlar, normal sağlıklı dokularda total VEGF proteinleri içinde predominant olarak bulunur fakat plesanta gibi anjiyogenezin normal fizyolojik koşullarda da gerçekleştiği bir dokuda total VEGF proteinlerinden sadece %1,5'i VEGF_{165b}'dir [63].

VEGF_{xxx} ve VEGF_{xxx}b izoformların sağlık ve hastalık koşullarında birbirine çevrilmesi, bu izoformları anjiyogenezin ile ilgili araştırma yapanların ilgi odağı haline getirmiştir. Örneğin kanser gibi anjiyogenezin önemli olduğu bir hastalıkta VEGF izoformlarının anti-anjiyogenetik formdan pro- anjiyogenetik forma çevrilmesi belki de kanserde metazistik sürecin başlamasına neden olmaktadır. Prostat, mesane, böbrek ve melanoma gibi kanserlerde ve diyabetik retinopati, maküler dejenerasyon gibi hastalıklarda VEGF_{xxx} ekspresyonu yükselirken VEGF_{xxx}b ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir [65-67].

2.2.2 VEGF-B

VEGF-B 1996 yılında keşfedilmiştir. Miyokart, pankreas, iskelet kası gibi dokularda ekspresyon olmaktadır. Ayrıca fare embriyonal dokusunda kalp gelişimi sırasında, kaslarda, embriyonik arterler içerisindeki düz kaslarda ve spinal kordta ifadelendiği gösterilmiştir. Farelerde embriyonik dönemde 14. günde kalp ve santral sinir sisteminde VEGF-B mRNA seviyesi çok yüksektir [1, 68, 69].

VEGF-B geni insanda kromozom 11q13'de kodlanmaktadır. 7 ekzon ve 6 introndan oluşmaktadır. Exon 3 ve ekzon 4'de sabit (*invariant*) sistein rezidüleri vardır. Bunlar molekülde disülfid bağları oluşturmaktadır. Ekzon 6'da meydana gelen alternatif uç birleşimi sonucu 2 adet izoformu meydana gelir. Bunlar VEGF-B₁₆₇ ve VEGF-B₁₈₉'dur. VEGF-B₁₆₇ 21 kDa, VEGF-B₁₈₉ 32 kDa ağırlığındadır. Bunların aktif formu VEGF-A'da olduğu gibi homodimer yapıdadır. Homodimer yapıdaki VEGF-B₁₆₇ 42kDa, VEGF-B₁₈₉ ise 60 kDa ağırlığındadır. Ayrıca VEGF-A ile heterodimer oluşturabilirler. VEGF-B₁₆₇'nin COOH-terminal ucu hidrofilik yapıdadır ve heparin bağlayan bölge bulunmaktadır ayrıca yardımcı reseptör olan NRP-1'e bağlanabilmektedir. VEGF-B₁₈₉ ise hidrofobik yapıdadır ve NRP-1'e bağlanması diğer izoforma göre daha sınırlıdır. VEGF-B₁₈₉'da heparin bağlayan bölge olmadığı için bunlar hücre yüzeyine bağlanamaz ve difüze olurlar [70] .

VEGF-A ve VEGF-B'nin yapısal olarak benzerlik göstermesi ve VEGFR-1 ve NRP-1'e bağlanmasından dolayı VEGF-B'nin de anjiyogenik etkiye sahip olduğu düşünülmüştür. Fakat yapılan çalışmalar sonucu diğer VEGF ailesi üyeleri ile kıyaslayınca anjiyogenik aktivitesinin farklı olduğu gösterilmiştir. VEGF-B geni silinmiş farelerde yapılan çalışmalarda farelerin yaşadığı ve normal koşullarda sağlıklı bir hayat sürdükleri görülmüştür. Fakat VEGF-A veya VEGF-C geni silinen fareler embriyonik dönemde ölürlür. VEGF-B transgenik fareler kullanılarak yapılan çalışmalarda da VEGF-B'nin ne anjiyogenezi ne de lenfanjiyogenezi tetiklediği gösterilebilmiştir. Yine diğer VEGF ailesi üyelerinden farklı olarak vasküler geçirgenliği uyarmadığı da gösterilmiştir [71, 72].

VEGF-B normal koşullarda anjiyogenezi tetiklememesine rağmen vasküler hücreler üzerinde önemli etkisi vardır. VEGF-B, vasküler endotel hücreler, perisitler ve düz kas hücreleri için potansiyel bir hayatta kalma faktörüdür. Oksidatif strese ve serum yoksunluğuna bırakılan endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde, VEGF-B eksikliğinde apoptoz artmaktadır. En çok kalpte ekspresse olmaktadır ve kalp kan damarlarının hayatta kalması için gereklidir. Normal koşullarda kalpte anjiyogenezi tetiklemezken, patolojik bir koşul olan kardiyak iskemi fare modelinde, VEGF-B'nin kardiyak kan damar yoğunluğunu arttırdığı gösterilmiştir. Aynı şekilde beyin kortikal nöronları, retinal nöronlar, spinal kord motor nöronları gibi nöronların hayatta kalması için önemli bir faktördür [73]. VEGF-B'nin yağ asitlerinin endotel hücre bariyerinden geçişinde görev aldığı da gösterilmiştir. Endotel hücreler üzerindeki VEGFR-1 reseptörü ile bağlanan VEGF-B, yağ asit transport protein 3

(FATP3) ekspresyonunu arttırarak dolaşımdaki yağ asitlerinin kaslara geçmesine yardımcı olmaktadır. VEGF-B'nin fazla ekspresyonu ve buna bağlı olarak FATP3 protein ekspresyonunun artması kaslarda fazla miktarda yağ asidi birikimine neden olabilmekte ve bu durum insülin direncine yol açabilmektedir [74, 75]. VEGF-B, dejeneratif koşullarda pek çok hücrenin hayatta kalmasını sağlayan önemli bir faktör iken, patolojik koşullarda da anti-anjiyogenik ve büyümeyi inhibe eden bir etki göstermektedir. Bu yüzden ileride hastalıkların tedavisinde terapötik bir rol oynayabilir [71].

2.2.3 VEGF-C

VEGF-C embriyonal gelişim sırasında ve tümör metastazı sırasında gerçekleşen lenfanjiyogenez ve anjiyogenezde önemli rol oynar. 1996 yılında keşfedilmiştir. VEGF-C insanlarda kromozom 4q34'de farede ise 8. kromozomda bulunur. VEGF-C geninde 7 ekzon bulunmaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3 için liganttır. VEGF-C'nin VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanmasıyla birlikte bu reseptörlerin sitoplazmik kısımlarındaki tirozinler ototofosforile olur ve sinyal yolağı aktiveleşir [76-78]. VEGF-C pro-protein olarak sentezlenir. Bu pro-protein 46.9 kDa ağırlığındadır. Protein daha sonra proteolitik süreçten geçerek matür haldeki büyüme faktörü haline gelir. Matür haldeki protein kovalent olmayan homodimer yapıdadır [79].

İnsanda kalp, yumurtalık, plesanta, iskelet kası ve ince barsakta yüksek oranda VEGF-C mRNA'sı görülmektedir. Ayrıca böbrek, akciğer, pankreas, prostat, dalak ve testislerde de bir miktar VEGF-C mRNA'sı bulunmaktadır. Embriyonik dokuda ise lenfatik damarların köken aldığı embriyonik damarlarda bulunmaktadır. Homozigot olarak VEGF-C geni susturulmuş farelerde lenfatik sistem gelişmezken, VEGF-C^{+/-} farelerde lenfatik sistem gelişimi büyük ölçüde bozulmuştur. Endotel hücrelerin yanı sıra immün sistem hücreleri ve tümör hücrelerinin de VEGF-C salgıladığı bilinmektedir. Solid tümörlerin çevresinde ve kanser hastaların kanlarında yüksek oranda VEGF-C ekspresyonu olduğu gösterilmiştir [76, 80-82].

Embriyonik lenfatik sistemin gelişiminde VEGFR-3 lenfatik endotel hücreleri üzerinde ifadelemektedir. VEGF-C, VEGFR-3'e bağlandığında lenf endotelinin proliferasyonu, hareketliliği ve sağ kalımı sağlanır. Matür haldeki VEGF-C, VEGFR-3'ün yanı sıra VEGFR-

2'ye de bağlanabilir. VEGF-C yardımcı reseptörler olan NRP-1 ve NRP-2'ye de bağlanır. NRP-2'ye bağlanma afinitesi, NRP-1'e bağlanma afinitesinden yüksektir. NRP-2 küçük lenfatik damarların ve kapillerin oluşması için gereklidir. NRP-2, VEGF-C VEGFR-3'ün oluşturduğu etkiyi daha da güçlendiren bir yardımcı reseptördür [83].

2.2.4. VEGF-D

VEGF-D geni Xp22.31 kromozomunda kodlanmakta ve 7 ekzondan oluşmaktadır. VEGF-D de VEGF-C gibi pro-protein olarak sentezlenmekte daha sonra proteolitik bir süreç sonunda matür büyüme faktörü haline gelmektedir. VEGF-D vasküler ve lenfatik endotel hücre uyarımını VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak gerçekleştirir. Yetişkinlerde kolonda, kalpte, iskelet kasında, ince barsakta yüksek oranda VEGF-D mRNA'sı görülürken, yumurtalık, pankreas, prostat, dalak ve testiste düşük miktarda bulunmaktadır. VEGF-C'nin aksine VEGF-D geni susturulan fareler embriyonik gelişim sürecinde ve yetişkin hallerinde normal lenfatik gelişim göstermektedir. Kolorektal, meme, gastrik kanserler, tiroid kanseri, glioblastoma, melanom gibi kanser türlerinde yüksek ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Ekspresyonu lenf nodu metastazı ile doğru orantılı olarak artmaktadır [6, 79, 81, 82].

2.2.5. Plesental büyüme faktörü

PlGF, VEGF ailesinin keşfedilen ikinci üyesidir. 1991 yılında İtalyan bilim insanı Maria Graziella Persico tarafından plesantada bulunmuş, saflaştırılmış ve VEGFR-1'e bağlandığı gösterilmiştir [84]. VEGF ile yaklaşık %42 oranında aminoasit benzerliği olmasına rağmen, bu moleküllerin üç boyutlu yapıları büyük benzerlik göstermektedir. Yoğun bir şekilde plesantada bulunmasına rağmen kalp, akciğer ve çizgili kaslarda da bulunur. Devinimsiz haldeki endotel hücreleri çok az miktarda PlGF sentezlerken, uyarı almış hücreler yüksek miktarda PlGF sentezler ve anjiyogeneze yardımcı olurlar [85]. PlGF geni kromozom 14q24'de bulunur ve 7 ekzon vardır. 800 kb uzunluğunda bir DNA'dan kodlanmaktadır. Alternatif uç değişimi sonucu insanda 4 adet izoformu oluşur. Bunlar, PlGF-1 (PlGF131), PlGF-2 (PlGF152), PlGF-3 (PlGF203) ve PlGF-4 (PlGF224). PlGF-2 ve PlGF-4'ün yapısında heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanabilen aminoasitler vardır. PlGF-1 ve PlGF-3 ise

difüze olabilir. Farede ise sadece bir adet izoform bulunur. PIGF, endotel hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu, sağ kalımını sağlar ve damar geçirgenliğini artırır [86]. PIGF homodimerleri VEGFR-1 ve NRP-1 e bağlanır. VEGFR-2'ye bağlanmazlar. PIGF, VEGF-A'nın anjiyogenik etkisini arttırmaktadır. Bunu şu mekanizma ile gerçekleştirmektedir. VEGF-A hem VEGFR-1 hem de VEGFR-2'ye bağlanabilmektedir. Fakat anjiyogenezi uyarması VEGFR-2'ye bağlanarak gerçekleşir. PIGF ve VEGF-A olan ortamda PIGF VEGFR-1'e bağlanır, böylece VEGF-A'nın bağlanabileceği VEGFR-1 sayısı azalmış olur. Daha çok VEGFR-2'ye bağlanan VEGF-A anjiyogenezi daha güçlü bir şekilde uyarılmış olur. PIGF, VEGF-A ile de heterodimer oluşturabilir. Oluşan bu heterodimer VEGF-A/VEGF-A homodimerinin, anjiyogenezi uyarması kapasitesini azaltmaktadır [87, 88].

Bazı patolojik koşullarda PIGF'in yüksek derecede ekspresse olduğu görülmüştür. Tümörlerin PIGF ekspresse ettiği ilk kez 1994 yılında Takahashi A. tarafında renal karsinom hücrelerindeki PIGF mRNA artışı ile gösterilmiştir [89]. Kolorektal kanserli hastalarda serumlarında bulunan PIGF miktarı, hastalığın progresyonu ve sağ kalım ile ilişkilidir [90]. Eksikliğinde ise bozulmuş bir anjiyogeneze dolay, gecikmiş yara iyileşmeleri görülmektedir [91].

2.2.6. VEGF-E

İnsanda bulunmayan bir faktördür. Orf parapoxvirüs ve pseudocowpox virüs de kodlanmaktadır. VEGF-A ile %20-25 oranında aminoasit benzerliği vardır. VEGF-E bir grup proteinin ortak adıdır. Bu proteinler VEGF-ENZ-2 (Orf virüs, NZ-2) VEGF-ENZ-7 (Orf virüs, NZ-7), VEGF-ENZ-10 (Orf virüs, NZ-10), VEGF-ED1701 (Orf virüs, D1701) ve VEGF-EVR634 (Pseudo-cowpox virüs, VR634)'dir. VEGF-E yüksek afinite ile VEGFR-2'ye bağlanır, VEGFR-1'e bağlanamaz. Bu faktör parapoxvirüs ile infekte lezyonlarda anjiyogenezi tetikler. Vasküler geçirgenlik özelliği VEGF-A ile benzerlik gösterir [5, 92, 93].

2.2.7 VEGF-F

VEGF-F 1999 yılında bir engerek yılanı olan *Vipera aspis aspis*'in zehrinde bulunmuştur. Yapısal olarak VEGF-A ile %50 oranında benzerlik gösterir. Endotel hücre

proliferasyonuna, düşük tansiyona ve vasküler geçirgenliğin artmasına neden olmaktadır [3, 94].

2.3. VEGF Reseptörleri

VEGF proteinleri reseptörlerine bağlanarak, reseptörlerin ifade edildiği hücrede bir dizi sinyal oluşumuna neden olurlar. VEGF ailesi üyelerinin bağlandığı 3 farklı reseptör bulunmaktadır. Bunlar VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR), ve VEGFR-3 (Flt-4) [95]. VEGFR'leri reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesinin üyeleri olup, PDGF (*Platelet-derived growth factor*) ve FGF (*Fibroblast growth factor*) reseptörleri ile aynı alt sınıf içerisinde yer almaktadır. Membrana bağlı bu reseptörler benzer moleküler yapıdadırlar. Hücre dışında kalan ve ligantın bağlandığı N-proksimal bölgede 7 adet immünoglobüline (İg) benzer yapı vardır. 1 adet transmembran bölge, transmembran bölgenin hemen altında juxtamembrane kısım, hücre içinde kalan bölgede ise tirozin-kinaz kısmı ve karboksi terminal kısım bulunur [96].

VEGFR-1 reseptörü endotel hücre, tümör hücreleri ve monositler gibi pek çok hücre yüzeyinde ifadelanmaktadır. Ligantları VEGF-A, VEGF-B ve PlGF'dir. VEGFR-3 daha çok lenfatik endotel hücreler üzerinde ifade olmakla birlikte makrofaj ve dendritik hücrelerde de VEGFR-3 ifadelendiği gösterilmiştir. Ligantları VEGF-C ve VEGF-D'dir. Lenfanjiyogenezde önemli rol alan bir reseptördür. VEGFR-2 ise vasküler endotel hücreler, kemik iliği kökenli hücreler ve bazı kanser hücreleri üzerinde ifade olup, anjiyogenezin gerçekleşmesinde rol alan en önemli reseptördür. Ligantları VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E [9, 97, 98].

Dimer halindeki VEGF proteinleri, reseptörün hücre dışında kalan kısmındaki immünglobiline benzeyen yapının ikinci-üçüncü İg ilmeğine bağlanır. Bu bağlanma sonucu reseptörler homo ya da heterodimer haline gelirler. Reseptörlerin dimer haline gelmesi sinyal oluşumu için gerekli fakat yeterli değildir. Dimerizasyonun stabil hale gelmesi önemlidir. Bu stabilizasyon reseptörlerin yedinci İg ilmekleri arasındaki direk bir kontak ile oluşur. Stabilize hale gelen dimer reseptörde sinyal iletim/dönüşüm yolağını aktive olur. Sinyal oluşumu heparan sülfat, neuropilin ve integrinler gibi yardımcı bir reseptör ile modüle edilmektedir [99, 100].

2.3.1. Yardımcı reseptör neuropilin

Soker ve arkadaşları HUVEC hücrelerinde VEGF proteinine bağlanan, VEGFR-1 ve VEGFR-2'den farklı bir reseptörün olduğunu bulup, MDA-MB-231 meme kanseri hücre serisinden bu reseptörü saflaştırmıştır. Bu reseptörün neuropilin-1 (NRP-1) adı verilen ve nöral gelişimde önemli bir rol alan molekül ile hemen hemen aynı olduğu ortaya çıkmıştır [101].

NRP ailesi, NRP-1 ve NRP-2 olarak adlandırılan iki homolog üyeden oluşmaktadır. Bu moleküller yaklaşık 120-140 kDa moleküler ağırlıkta ve glikoprotein yapıdadır. İlk olarak adezyon molekülleri olarak tanımlanan bu moleküller, nöral gelişim sırasında önemli işlevleri olan semaphorin/collapsins ailesi üyeleri ve anjiyogeneze önemli olan VEGF reseptörleri, VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 için hücre yüzeyinde ifadelenen yardımcı bir reseptördür. Hücre içi, transmembran ve hücre dışı kısımları bulunmaktadır. NRP-2 angiogeneze, NRP-1 ise nöral gelişimin yanı sıra, anjiyogeneze, tümör büyümesi ve metastazında önemli rol oynamaktadır. VEGF₁₆₅ proteininin NRP-1 ile bağlanmasıyla birlikte, VEGFR-2'nin oluşturduğu sinyal daha güçlü hale gelerek, endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu artmaktadır. NRP-2 ise VEGF-C / VEGFR2-R3 ile oluşan ve lenfanjiyogenezin gerçekleşmesini sağlayan sinyal için önemlidir [102, 103].

İnsanda NRP-1 kromozom 10q12'de kodlanırken, NRP-2 ikinci kromozomda kodlanmaktadır. Her iki gen de 17 ekzon içermektedir. Embriyonik gelişim sırasında NRP-1 sinir sistemi, kardiyovasküler sistem ve kas sistemi hücrelerinde ifade olurken, yetişkinlerde endotel hücre, tümör hücreleri, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, pankreas ve kemik iliği stromal hücrelerinde ifade olmaktadır [104, 105].

Pek çok tümör hücresinin NRP-1 ekspresse ettiği gösterilmiştir. Akut myeloid lösemi, prostat kanseri, meme kanseri, akciğer kanserinde NRP-1 ekspresyonu kötü prognoz olarak tanımlanabilmektedir. VEGF ve NRP-1 bağlanmasının sonucu hepatosit büyüme faktörü, platelet büyüme faktörü, plasental büyüme faktörü gibi pek çok sitokin salgılanmaktadır. VEGFR-2 olmaksızın NRP-1'in tek başına tümör anjiyogenezini ve migrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [106, 107].

2.3.2. VEGFR-1 (*fms-like tyrosine kinase; Flt-1*)

İnsan VEGFR-1 geni kromozom 13q12 de bulunmakta ve 30 ekzondan oluşmaktadır. 180 kDa ağırlığındadır [1]. VEGF-A, VEGF-B, PlGF ve VEGF-F'ye yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Membrana bağlı ve çözünebilir form olmak üzere iki şekilde bulunmaktadır. VEGF-A'nın VEGFR-1'e bağlanma afinitesi VEGFR-2'den on kat daha fazladır. Fakat uyarılması sonucu oluşan tirozin kinaz fosforilasyonu, VEGFR-2'ye oranla çok daha zayıftır [108]. Endotel hücrelerdeki mitotik etkisi, sadece embriyonik dönemde vasküler gelişimin olduğu erken evrede gerçekleşir. Embriyonik dönemde ilk önce angioblastlarda ve endotelyumda ifade olmaktadır. VEGFR-1 geni susturulmuş fare embriyoları uterusunda sekiz ve dokuzuncu günler arasında ölmektedir. Embriyogenezin ilerleyen evrelerinde VEGFR-1 ifadelenebilir bastırılmıştır. VEGFR-1 endotel hücrelerin yanı sıra, osteoblast, monosit, makrofaj, placentalar, trofoblast ve bazı hematopoietik kök hücrelerde ifade olmaktadır [6, 109, 110].

VEGFR-1 vaskülarizasyonu negatif olarak düzenleyebilen bir reseptördür. Bu durum şöyle açıklanmaktadır. VEGF-A, VEGFR-2 yerine afinitesi daha güçlü olan VEGFR-1'e bağlanmaktadır. VEGFR-1'inde endotel hücre proliferasyonunu indüklediği bilinmektedir. Yani VEGFR-1 bir çeşit deko reseptör olarak iş görmektedir. VEGFR-1'in membrana bağlı formu dışında, günde alternatif uç değişimini sonucu oluşan, çözünür reseptör olarak adlandırılan bir izoformu (sVEGFR-1) bulunmaktadır. Bu izoformun yapısında sadece reseptörün hücre dışında bulunan kısmı ve liganın bağlanabildiği bölge vardır. Sinyal peptidi kesilen sVEGFR-1, 661 aminoasitten oluşur. Altı veya yedi adet immünoglobülin benzeri bölgesi vardır. Her iki izoform da deko reseptör gibi davranmaktadır. Çözünebilir formdaki sVEGFR-1 hamilelik sırasında placentada yüksek miktarda bulunur. Çok fazla bulunması hamilelikte hipertansiyona neden olmaktadır [100, 111-113].

VEGFR-1, VEGF-B'ye de bağlanmaktadır. Fakat bağlanma sonucu oluşan sinyal endotel hücrelerinde mitojenik bir aktiviteye yol açmaz. Endotel hücrelerdeki VEGFR-1'e VEGF-B'nin bağlanması sonucu endotel hücreler uPA (Ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü) ve PAI-1(plazminojen aktivatör inhibitörü-1) üretmeye başlar. Bu moleküller ekstraselüler matriksin parçalanmasında görev alan moleküllerdir [114].

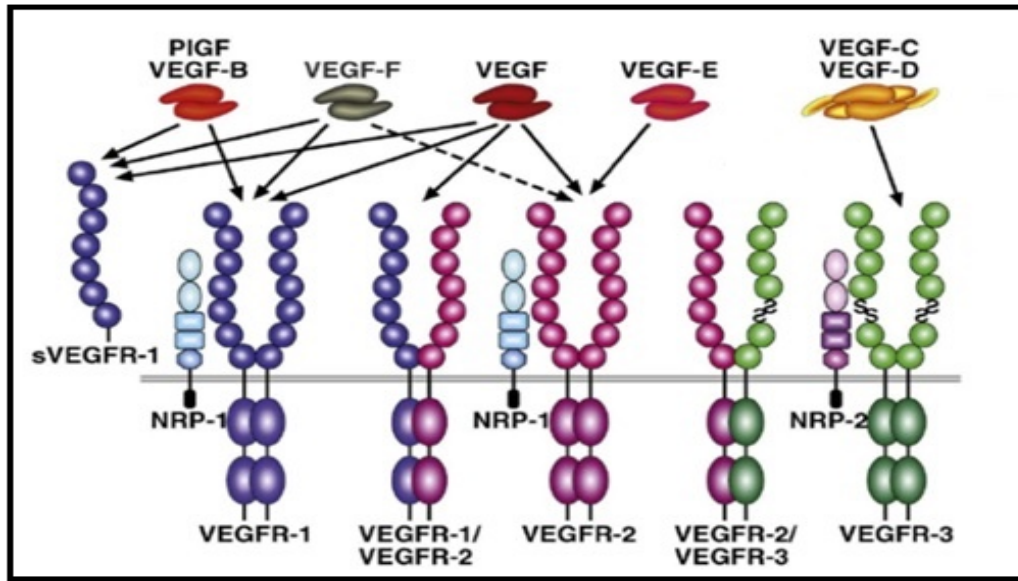
2.3.3. VEGFR-2 (*flk-1/KDR fetal liver kinase-1/ kinase domain- containing receptor*)

Yaklaşık olarak 210 kDa ağırlığında bir moleküldür. Alternatif uç birleşimi sonucunda oluşan, hem membrana bağlı formu hem de çözünebilir formu bulunmaktadır. Membrana bağlı formun ifadelenmesi vasküler hücreler ile sınırlıyken, çözünebilir formu plazma, kalp, dalak, deri ve böbreklerde bulunmuştur. VEGFR-2'nin VEGF-A'ya bağlanma afinitesi VEGFR-1'in VEGF-A'ya bağlanma afinitesinden 10 kat daha düşüktür. Proteolitik olarak işlem görmüş VEGF-C ve VEGF-D'de VEGFR-2'ye bağlanabilir. VEGF-E için bilinen tek reseptör VEGFR-2'dir [40, 99]. VEGFR-2, diğer VEGFR'leri arasında hakkında en çok araştırma yapılan ve bilgi bulunan reseptördür. Hem vaskülogenez hem de angiogeneze önemli rolü vardır. VEGFR-2 embriyonik ve yetişkin dönemde endotel hücrelerin yüzeyinde ifadelenen, fizyolojik ve patolojik angiogeneze ile ilgili olan esas reseptördür. VEGFR-2 ve VEGF-A geni susturulmuş fareler embriyonik dönemde ölmektedir [97]. VEGFR-2'nin endotel hücrelerinin yanı sıra hematopoietik kök hücreler, nöronal hücreler, osteoblast, pankreas hücreleri, retinal progenitör hücreler ve megakaryosit hücrelerde de ifade olduğu görülmüştür. VEGF-A'nın VEGFR-2 aracılığı ile oluşturduğu sinyal, endotel hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu, filizlenmesini, hayatta kalmasını sağlayarak anjiyogenezi tetiklemekte ayrıca vasküler sızıntı/geçirgenliğini de arttırmaktadır. Bu özellikler, uyarıya bağlı olarak hücre içinde oluşan farklı sinyal yolları ile sağlanmaktadır [115, 116].

2.3.4. VEGFR-3 (*Fms-like tyrosine kinase 4; Flt-4*)

VEGFR-3, 170 kDa moleküler ağırlıkta bir reseptördür [1]. VEGFR-3 hem proteolitik olarak işlenmemiş hem de işlenmiş VEGF-C ve VEGF-D'ye bağlanmaktadır. Proteolitik olarak işlenmiş VEGF-C ve VEGF-D'ye VEGFR-2 de bağlanabildiği için VEGFR-2 ve VEGFR-3 arasında bir heterodimer olabilmektedir. Lenfatik endotel hücrelerde ifade olmakta ve lenfangiogeneze önemli işlev görmektedir. Lenfatik endotel hücreleri yanı sıra vasküler endotel hücrelerinde, öncül nöron hücrelerinde, makrofaj ve osteoblastalarda da ifade olduğu gösterilmiştir. VEGFR-3 geni susturulmuş fare embriyoları 10. günde ölmektedir [100, 111]. Vasküler tümörler ve solid tümörler gibi patolojik koşullarda VEGFR-3'ün vasküler endotel hücrelerdeki ekspresyonları artmaktadır. Özellikle vasküler tümörlerdeki

VEGFR-3'ün artışı, buradaki endotel hücrelerin patolojik olarak farklılaştığını gösteren bir belirteç olarak gösterilebilir [6]. VEGFR-3 diğer VEGF'leri arasında doğal mutasyonun görüldüğü tek reseptördür. Milroy hastalığı olarak da bilinen kalıtsal lenf ödem hastalığı VEGFR-3'de sinyal bölgesindeki kinaz kısmında meydana gelen inaktive edici bir mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Bu hastalıkta eller ve ayaklarda kronik olarak ödem meydana gelmektedir [117].



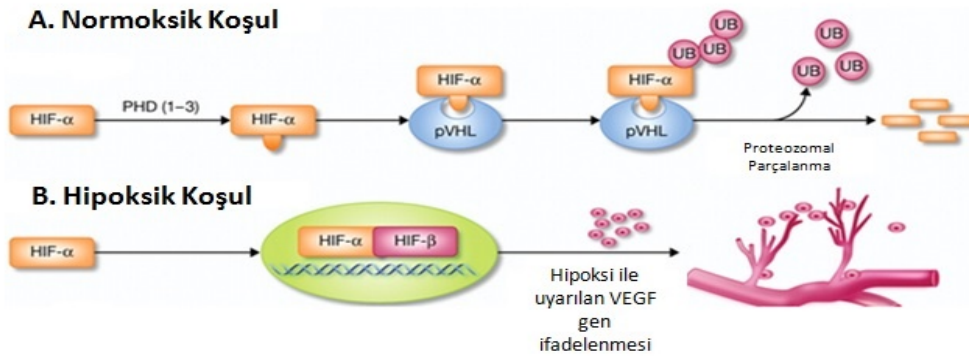
Şekil 2.2. VEGF reseptörleri ve ligantları [83]

2.4. VEGF Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

2.4.1. Düşük oksijen konsantrasyonunun etkisi (hipoksi)

Oksijenin hücre içindeki konsantrasyonu pek çok genin ekspresyonunun düzenlemesinde önemli rol oynamaktadır. Oksijen konsantrasyonu düşük olduğu zaman glikoz transporter molekülleri, glikolitik yolak enzimleri, eritropoetin (Epo) ve VEGF gibi proteinlerin ekspresyonu artmaktadır. Oksijen düşüklüğüne bağlı olarak dokuda VEGF proteinin artması anjiyogenezin başlamasını uyarmakta, böylece dokuya daha çok kırmızı kan hücresi ile oksijen ulaşması gerçekleşmektedir [118-121].

Hipoksiye duyarlı pek çok proteinde olduğu gibi, VEGF transkripsiyonu da hipoksi ile indüklenen faktör 1 (HIF-1) aracılığı ile düzenlenmektedir. HIF-1 40'dan fazla genin ekspresyonunu kontrol etmektedir. HIF-1 heterodimer yapıda bir protein kompleksidir. HIF-1 α ve HIF-1 β alt ünitelerinden oluşmaktadır. Normoksik koşullarda HIF-1 α proteinleri prolin aminoasitlerinden hidroksile olur. Hidroksile olan bu kısım von Hippel-Lindau proteini (tümör baskılayıcı protein) ile etkileşir ve ubikütinasyona uğrar. Daha sonra proteozomlar tarafından parçalanır. Fakat hipoksik koşullarda HIF-1 α stabil halde kalır ve HIF-1 β ile dimer oluşturarak VEGF geninin promotör bölgesinde, hipoksi-duyarlı element bölgesine bağlanarak bu geni aktif hale getirir. Böylece VEGF-A ekspresyonu artar. VEGF-C ve VEGF-B'nin ekspresyonunun da hipoksik akciğerde arttığı gösterilmiştir. VEGF-D ve VEGF-E ekspresyonlarının hipoksi ile arttığına dair kesin bir bilgi henüz yoktur [81, 122-125].



Şekil 2.3. Hipoksinin VEGF gen ifadelenmesi üzerine etkisi [120]

2.4.2. Büyüme faktörleri ve hormonların etkisi

VEGF ekspresyonunu etkileyen en önemli faktör olarak hipoksik koşullar kabul ediliyor olsa da büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler ve onkogenler de VEGF gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Örneğin Fibroblast Büyüme Faktörü 4 (FGF-4), PDGF, Tümör Nekrozis Faktör α , Transforming Büyüme Faktörü β (TGF- β), keratinosit büyüme faktörü (KGF), İnterlökin 1 β (İL-1 β), İL-6 ve İGF-1 VEGF ekspresyonunu arttırmaktadır. İL-10 ve İL-13 ise VEGF ekspresyonunu azaltmaktadır [31, 126]. Goldman ve arkadaşları epidermal büyüme faktörü (EGF) ile uyarılan insan glioma hücre serilerinde VEGF

ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir [127]. Östrojen hormonu, meme kanseri hücre serisi MCF-7’de VEGF-A gen transkripsiyonunu arttırmaktadır [128]. Progesteron hormonunun da MCF-7 hücre serisinde VEGF₁₂₁ ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [129].

2.4.3. Onkogenlerin etkisi

Proto-onkogenlerin mutasyona uğrayarak onkogenlere dönüşmesi ile tümör oluşumunun meydana geldiği bilinmektedir. Onkogenler tümör hücrelerinin farklılaşmasına ve proliferasyonuna neden olurlar. Solid tümörlerin büyümesi ve metastazı için damarlanmaya ihtiyacı vardır. Proto-onkogenlerde oluşan mutasyonlar direk ya da dolaylı olarak pro-anjiyogenik sinyalleri arttırırken, anti-anjiyogenik sinyalleri baskılamaktadır. Örneğin H-ras, K-ras, v-src, v-raf, onkogenlerinde meydana gelen mutasyonun, endotel hücrelerinde ve fibroblast hücrelerinde VEGF-A ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [130]. Ras proto-onkogeninde meydana gelen mutasyon, insanda pek çok kanser türüne neden olabilmektedir. Ras aktivasyonu sonucu Raf-Mek-Erk- Map kinaz kaskadı aktive hale gelir. Bu aktivasyon sonucu, aktif hale gelen bazı transkripsiyon faktörleri hücre proliferasyonunu tetiklemenin yanı sıra VEGF-A ekspresyonunu da arttırmaktadır. Ras aktivasyonu anjiyogeneze direk ya da dolaylı olarak etki eden TGF- β ve TGF- α ekspresyonunu da arttırmaktadır [131, 132].

2.5. Tümör Anjiyogenezinde VEGF’in Önemi

Malign tümörler, genetik olarak anormal hale gelmiş hücrelerin, klonal olarak kontrolsüz ve durdurulamayan çoğalması sonucu meydana gelir. Bu hücreler, homeostazinin sağlanması için oluşan sinyallere karşı duyarsız haldedir. Yakın çevre dokulara invaze olurken, daha uzak dokulara metastaz gerçekleştirebilir.

Solid tümörler oldukça kompleks bir yapıdan meydana gelmektedir. Bu yapı içinde neoplastik hücreler, bu hücreleri çevreleyen stromal hücreler ve çevre dokular bulunmaktadır. Stromal hücrelerden olan, tümör ile ilişkili fibroblastlar, endotel hücreler, vasküler duvar yapısında yer alan perisit hücreleri, düz kas hücreleri ve immün sistemin bazı hücreleri tümör mikro çevresini oluşturur. Bu hücreler tümör oluşumu ve progresyonu

açısından son derece önemli hücrelerdir [133, 134]. Tümör hücreleri tohum olarak düşünülecek olursa, mikro çevredeki hücreler toprak olarak düşünülebilir. Çünkü mikro çevredeki hücreler tümör gelişimi sırasında, hücreler arası matriksin yeniden biçimlendirilmesi, hücrelerin migrasyonun sağlanması, anjiyogenezin tetiklenmesi, tümör hücrelerinin invazyonunun sağlanması, ilaç direncinin gelişmesi, ortama salgıladıkları pek çok büyüme faktörü, kemokin ve sitokin sayesinde immün gözetimden kaçmayı sağlamaktadır [135].

Anjiyogenezin başlaması, tümör dokusunun büyümesi ve metastazın olabilmesi için gerekli en önemli aşamadır. Çünkü normal dokularda olduğu gibi, tümör dokularının da besin maddesine ihtiyacı vardır. Ayrıca oluşan metabolik atıklar ortamdaki uzaklaştırılmalıdır [136].

Tümör dokusunun büyümesi için anjiyogenezin gerekliliği hipotezi ilk kez 1971 yılında Judah Folkman tarafından ortaya atılmıştır [137]. Bu hipoteze göre, primer solid tümörler yıllarca dormant halde kalabilir. Bu hale denge fazı denilmektedir. Bu fazda, yeni oluşan hücreler ile ölen hücre sayısı bir denge halindedir. Tümör çapı sadece 1-2 milimetre kadar olabilir. Tümör yapısı bu büyüklüğe kadar, oksijen ve besin ihtiyacını çevre dokulardan pasif difüzyon ile sağlayabilir. Tümör yapısının avasküler halden vasküler hale geçmesi "anjiyogenik dönüşüm" (*angiogenic switch*) ile başlar [138, 139]. Hem tümör hücreleri hem de stromal hücreler anjiyogenezi başlatabilmek için anjiyogenik faktörler salgılayabilir. Bunlar VEGF, fibroblast büyüme faktörü, hepatosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, transforming büyüme faktörü, matriks metalloproteinazlar, tümör nekrozis faktör, anjiyopoietinler ve platelet kaynaklı büyüme faktörleridir. Bu anjiyogenik faktörler tümör çevresindeki damarlardan yeni damarların oluşmasını uyarır ve yeni oluşan damarlar sayesinde tümörün büyümesi başlamış olur [140]. Bu faktörlerden en önemlisi VEGF'dir. Tümör anjiyogenezi ile ilgili yapılan çalışma sonuçlarına göre, yüksek miktarda VEGF'in varlığı kötü bir prognozu işaret etmektedir. Ayrıca kanserin yeniden nüksetmesi ile de ilişkilidir [138, 141, 142].

Tümör anjiyogenezi, anjiyogenez aktivatörleri ve inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması ile meydana gelmektedir [136, 143]. Bu dengenin bozulmasına, bazı onkogenlerin aktif hale gelmesi ya da tümör baskılayıcı genlerin susturulması neden

olmaktadır. Örneğin anjiyogenezin en önemli inhibitörü p53 tümör baskılayıcı gendir. p53 geni anormal koşullarda meydana gelen hücre bölünmesini engelleyen ve hipoksik koşullarda hücrenin apoptoza gitmesini sağlayan bir gendir. p53 gen ürünü olan thrombospondin, VEGF-A üretimini engelleyen bir inhibitördür. Kanserlerde %50 oranında p53 geni mutasyonunun olduğu bilinmektedir. Tümör mikroçevresinde oksijen oranı düşüktür yani hipoksik bir ortam mevcuttur. Pek çok kanser türünde bu hipoksik koşuldan dolayı HIF-1 α üretilmesi artmaktadır. Normal koşullarda p53, HIF-1 α 'ya bağlanarak HIF-1 α 'yı stabil hale getirir fakat P53 geninin mutasyona uğramasıyla birlikte HIF-1 α 'ın HIF-1 β ile dimerizasyonu artar ve bu da tümör hücrelerinde VEGF-A üretimini arttırır [144-147].

Normal kan damarları ve tümör kan damarları arasında belirgin morfolojik farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin normal damarlarda arter, ven ve kapiller olmak üzere sıralı bir dallanma mevcutken, tümör damarlarında bu hiyerarşik düzen bozulmuş durumdadır. Tümör endotel hücreleri, düzgün, tek tabaka halinde sıralanmış değildir. Bu yüzden etkili bir bariyer görevi görememektedir. Endotel hücrelerin altındaki basal membran normalden çok daha kalındır. Endotel hücreler üzerinde bulunan perisitler, endotel hücrelere çok gevşek olarak bağlandıkları gibi, tümör dokusuna doğru yönelen sitoplazmik uzantılar bulundurlar. Bu düzensizlikler tümör damarının geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Diğer bir anormallikse, bu damarları oluşturan hücrelerin anjiyogenezi tetikleyen ve inhibe eden faktörleri üretme dengesinin bozulmuş olmasıdır [141, 148]. Bütün bu düzensizlikler tümör yapısında, yetersiz lenfatik drenaja, düşük kan basıncına ve dokular arasındaki sıvının yüksek basıncına neden olur. Kan akışının düşük olması ortamın hipoksik olmasını sağlar. Bu nedenle VEGF üretimi anormal bir şekilde artar ve yeni düzensiz tümör damarlarının oluşması devam eder [134, 149]. VEGF, tümör endotel hücrelerinin mitozunu uyarmasının yanı sıra bu hücrelerin apoptozunu da engellerler. Bu özelliğini anti apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve A1 ekspresyonunu uyararak gerçekleştirir [150]. Yeni damarların oluşabilmesi için hücreler arası matriks yapısının bozulması gereklidir. VEGF bu enzimlerin üretilmesi için endotel hücreleri uyarır. Endotel hücrelerinden salgılanan plasminojen aktivatörleri ve bunların inhibitörleri, matriks metalloproteinazlar, jelatinaz A gibi proteinler matriksin bozulmasında iş gören proteinlerdir. VEGF, kemik iliği kökenli endotel hücre öncüllerinin de tümör çevresine

yönelmesini sağlayarak anjiyogenezi destekler. Tümör hücrelerinin ve stromal hücrelerin ürettiği VEGF, pozitif bir feedback döngüsü meydana getirir. VEGF, tümör damarlanmasını arttırırken, damarlanma sayesinde büyüyen tümör daha fazla VEGF üretmeye başlar [151].

Judah Folkman'nın, tümörün büyümesi ve metastazi için anjiyogenezin gerekli olduğunu ortaya çıkarmasından sonra kanser tedavisinde "anti- anjiyogenik terapi" konsepti ortaya çıkmıştır. Bu düşünceye göre anjiyogenez inhibe edilirse tümörün büyümesi ve metastazi durdurulabilir. VEGF-A'nın tümör hücreleri ile stromal hücrelerden salgılanan ve tümör anjiyogenezinde en önemli faktör olduğunun anlaşılmasıyla birlikte, VEGF-A'nın oluşturduğu sinyalin inhibe edilmesi üzerine günümüze kadar pek çok çalışma yapılmış ve yapılmaya da devam etmektedir [152]. Bu doğrultuda VEGF'i hedef alan 3 majör ajan geliştirilmiştir. Bunlar monoklonal antikolar, VEGF dekey reseptörü, küçük molekül reseptör trozin kinaz inhibitörleridir (RTKIs). Günümüzde bu ajanlar klinikte kemotepi ile birlikte ya da tek başına kanser tedavisinde kullanılmaktadır [153]. Bevacizumab kanser tedavisinde antianjiyogenik ajan olarak kullanılan, insansılaştırılmış, immünglobülin G1 tipinde bir monoklonal antikordur. VEGF'i nötralize ederek anjiyogenezi engeller [154]. 2004 yılında FDA (*US Food and Drug Administration*) tarafından metastatik kolon kanseri tedavisinde kemotepi ile birlikte kullanılması onaylanmıştır. Bevacizumab, FDA tarafından antianjiyogenik tedavide kullanılması onaylanan ilk ilaçtır. Genellikle hastalar tarafından iyi tolere edilse de hipertansiyon, proteinüri, kanama, yaraların iyileşmesinde sorunlar ve tromboemboli gibi yan etkileri de olabilmektedir [155]. İlk olarak metastatik kolon kanseri (MCRC) tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde ise metastatik skuamoz olmayan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC), metastatik renal hücreli kanser (mRCC), persistant, nükseden ya da metastatik servikal kanser (CC), peritoneal kanser (prOC) tedavisinde sitotoksik tedavi veya sitokin terapisi ile birlikte kullanılmaktadır. Nükseden glioblastoma multiform (rGBM) kanserinde ise palyatif tedavi sırasında tek başına kullanılabilir [156]. Anti-anjiyogenez tedavisinde Bevacizumab'ın yanı sıra monoklonal antikor temelli yeni ilaçlar üzerine pek çok çalışma yapılmış ve yapılmaktadır. IMC-18F1 VEGFR-1'e, Ramucirumab VEGFR-2'ye bağlanarak VEGF'in reseptörüne bağlanmasını engelleyen monoklonal antikordur. Ziv-aflibercept ise peptit-antikor füzyonu ile oluşan ve VEGF-A, VEGF-B ve PlGF için dekey reseptör olan FDA tarafından

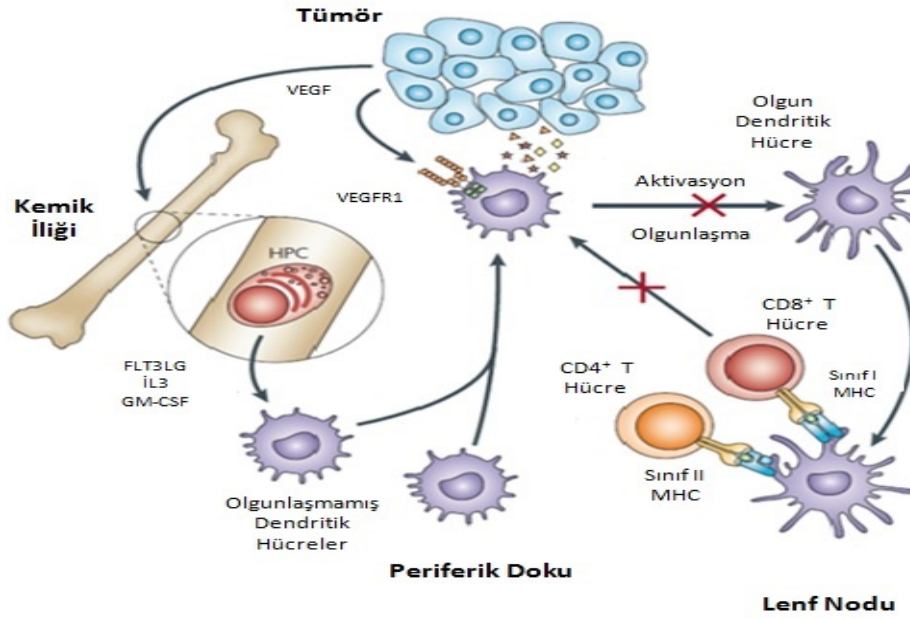
onaylanmış bir ilaçtır [153, 157]. Reseptör Trozin kinaz inhibitörleri ise antianjiyogenik tedavide kullanılan diğer bir grup ilaçtır. Bunlar VEGF- VEGFR bağlanması sonucu oluşan sinyal yolağını inhibe ederek anjiyogenezi engellerler. Sunitinib, Sorafenib, Axitinib, Pazopanib, Vandetanib ve Lenvatinib FDA tarafından onaylanan ve çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörleridir [158].

2.6. VEGF-A'nın Tümör Mikroçevresindeki İmmün Baskılayıcı Özelliği

İmmün sistem hücrelerinin, kanser hücrelerini yok ederek tümörün büyümesini engellediği ilk olarak 1909 yılında Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. 1957 yılında Sir MacFarlane Burnet ve Lewis Thomas'ın immün sürveyans hipotezi ile bu görüş desteklenmiştir. Hayvan çalışmaları ile birlikte immün sistem eksikliği olan veya immün sistemi baskılanmış olan hastalarda yapılan çalışmalar sonucunda da, immün sistemin kanser gelişimini kontrol ettiği gösterilmiştir [159]. Genetik olarak T ve B lenfosit eksikliği olan farelerde (RAG2^{-/-}) veya interferon gamma sinyal yolağı bozuk farelerde, normal farelere oranla spontan olarak veya kanserojen ile uyarılarak oluşturulan tümörlerin daha sık olduğu görülmektedir. İmmün sistemi baskılanmış ya da immün yetmezliği olan kişilerde de normal sağlıklı bireylere oranla kanser görülme olasılığı daha yüksektir. Klinik olarak tümörün görülebilmesi için, immün sürveyansın etkisiz hale gelmesi gereklidir. Bunun için, kanser hücreleri immün sistem tarafından tanınan moleküllerinin ekspresyonunu baskılar yada immün regülatör hücreler tümör çevresine çekilebilir [160]. VEGF anjiyogenik bir büyüme faktörü olmasının yanı sıra, özellikle tümör çevresindeki immün yapılanma üzerinde önemli bir etkisi vardır. Hematopoietik hücreler, dendritik hücreler, makrofajlar ve lenfositler, farklı VEGF reseptörlerini ifade etmektedir [9]. Tümör kaynaklı VEGF, immün sistem hücreleri üzerindeki reseptörlerine bağlanarak bu hücrelerin etkili bir şekilde anti tümöral etki göstermelerine engel olmaktadır. Ayrıca hematopoietik progenitör hücrelerin, immün hücrelere farklılaşmasını engelleyerek, tümör çevresindeki immünsüpresif ortamın ortaya çıkmasına katkı sağlamaktadır [9, 160-162].

Dendritik hücreler, tümör immünolojisinde önemli yer alırlar. Bu hücreler kemik iliği kökenli antijen sunucu hücrelerdir. Tümör tarafından salgılanan VEGF ve bazı diğer faktörler, immatür dendritik hücrelerin kemik iliğinden ve periferik dokulardan tümör

çevresine gelmesini tetikler. Apoptotik tümör hücrelerinden ortama salınan tümör spesifik antijenler, immatür dendritik hücreler tarafından alınarak işlenir ve lenf nodlarında T hücrelerine sunulur. Böylece tümöre karşı kazanılmış immün yanıt başlamış olur. Tümör modeli oluşturulan farelerde ve kanser hastalarında dendritik hücre matürasyonu ve farklılaşması doğru bir şekilde gerçekleşmemektedir. Bu yüzden immatür dendritik hücreler, tümör antijenlerini T hücrelerine sunamazlar. Bu da immün toleransa neden olmaktadır [39, 163]. VEGF'in dendritik hücre matürasyonunu engellediğini gösteren in vitro bir çalışmada CD34⁺ hematopoietik öncül hücreler insan kord kanından izole edilmiş ve GM-CSF, IL-4, TNF- α içeren ortamda kültür edilmiştir. Ortama kolon ve meme kanseri hücrelerinin süpernatantları ilave edilmiş ve dendritik hücre matürasyonunun gerçekleşmediği görülmüştür. Dendritik hücre gelişimini etkileyen bu molekülün 30-50 kDa ağırlığında olduğu bulunmuş ve ortama VEGF'i nötralize eden antikorların ilavesi ile dendritik hücre matürasyonunun doğru bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir [164]. İn vivo bir çalışmada ise tümörü bulunmayan fareye rekombinant VEGF verilmesi, dendritik hücre gelişimi bozulmuş ve immatür myeloid kökenli hücre miktarının artmasına neden olmuştur. Tümör modeli oluşturulan farelerde ise VEGF'i nötralize eden antikorların fareye verilmesi ile birlikte lenf nodları ve dalaktaki dendritik hücre sayıları artmış ve dendritik hücre matürasyonu gerçekleşmiştir. Böylece VEGF'in dendritik hücre fonksiyonunu negatif yönde ve güçlü bir şekilde etkilediği anlaşılmıştır [165]. VEGF bu etkiyi CD34⁺ hematopoietik kök hücrelerdeki reseptörüne bağlanarak (flt-1/VEGFR-1) gerçekleştirmektedir. VEGFR-1'e bağlanan VEGF, CD34⁺ hematopoietik kök hücrelerdeki NF- κ B transkripsiyon faktörünü inhibe ederek bu hücrelerin dendritik hücrelere farklılaşmasını engellemektedir [166].



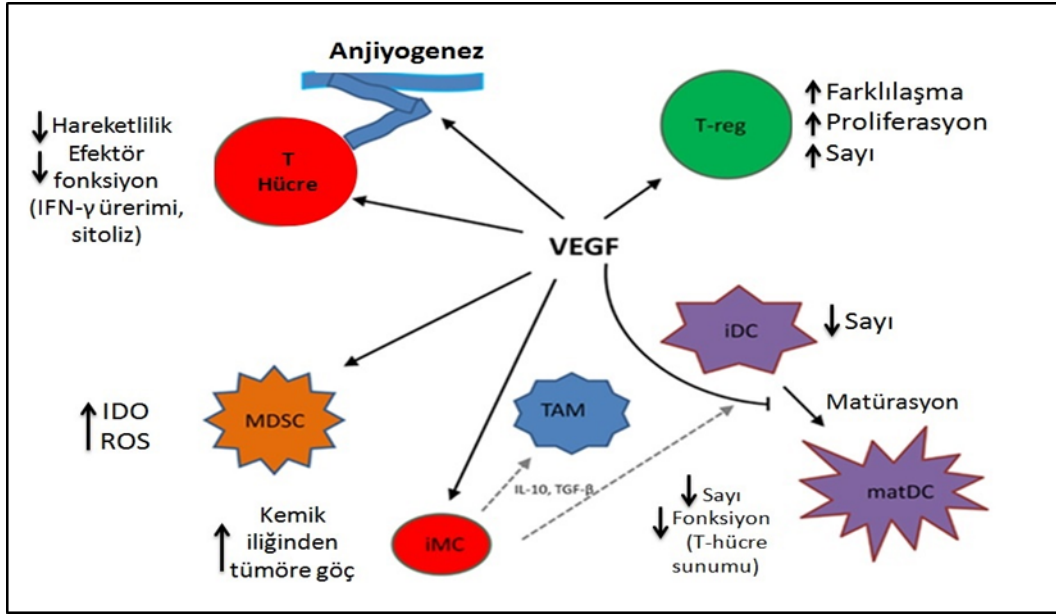
Şekil 2.4. VEGF'in dendritik hücre matürasyonuna etkisi [39]

Myeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC), myeloid progenitör hücreleri ve immatür myeloid hücreleri içeren immünsupresif özelliği olan bir grup hücredir [167]. Bu hücreler hem tümör çevresinde hem de dolaşımda yoğun bir şekilde görülmektedir. Bu hücrelerin ekspansiyonunda ve tümör çevresinde yoğunlaşmasında VEGF önemli bir rol almaktadır [160]. MDSC'ler tümör çevresindeki immün baskılayıcı etkisini daha çok T hücrelerine etki ederek gerçekleştirirler. MDSC'ler, T hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olan esansiyel aminoasit L-Arginini, Arginaz-1 enzimini kullanarak metabolize ederler. Böylece ekstraselüler ortamdaki L-Arginini tüketmiş olurlar. iNOS enzimi aracılığı ile NO üretimine neden olurlar. Ortamdaki NO miktarının artması T hücrelerinin proliferasyonunu engeller ve bu hücrelerin apoptoza gitmesine neden olur. İndoleamin 2,3- deoksijenaz (IDO), reaktif oksijen radikalleri (ROS), radikal süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) üreterek de T hücre baskılanmasına neden olurlar. Oluşan NO ile radikal süperoksit reaksiyona girerek radikal peroksinitrit oluşturur. Oluşan bu peroksinitrit peptit/MHC kompleksinin oluşmasını engelleyerek T hücrelerinin antijeni tanımasını engeller [167, 168]. VEGF aracılığıyla tümör çevresindeki miktarı artan MDSC'ler, $IL-10$ ve $TGF-\beta$ salgılayarak $Foxp3^+$ Treg hücrelerinin oluşmasına neden olurlar. Sayıca artan Treg hücreleri de VEGF salgılayarak ortamdaki VEGF miktarını daha da arttırmaktadır. Metastatik koleraktal kanser hastalarında da VEGF'in VEGFR-2 aracılığıyla Treg proliferasyonuna neden olduğu gösterilmiştir.

Bevacizumab (VEGF'e karşı üretilmiş, humanize bir monoklonal antikor) kullanan hastalarda Treg sayısının azaldığı görülmüştür [161, 169-171].

Kanser hastalarının serumlarında VEGF miktarı belirlendikten sonra, aynı miktardaki rekombinant VEGF'in fareye verilmesi ile yapılan bir çalışmada, farelerde timik atrofi gerçekleşmiş ve CD4, CD8 timosit sayısı azalmıştır. Bu çalışma sonucunda VEGF'in timosit apoptozuna neden olmadığı, patolojik olabilecek düzeydeki miktarının hematopoietik hücrelerden T hücre farklılaşmasını engellediği anlaşılmıştır [172]. VEGF- T hücre ilişkisini araştıran başka bir çalışmada ise VEGF miktarı ile doğru orantılı olarak tümör içerisindeki CD8 T hücrelerinde PD-1 ifadenmesinin arttığı, VEGF- VEGFR blokajı sağlandığında CD8 T hücrelerinde PD-1 ifadenmesinin azaldığı gösterilmiştir [173].

Tümör ile ilişkili makrofajlar (TAM) tümör çevresinde bulunan diğer bir hücre grubudur. TAM hücrelerinin tümör çevresinde yoğun bir şekilde bulunması kötü prognaza işaretler. Bu hücreler monositlerden köken almaktadır. Tümör mikroçevresinde bulunan VEGF, İL-4 ve İL-10, monositlerin TAM hücrelerine dönüşmesine neden olur. TAM hücreleri salgıladıkları anjiyogenik faktörler ile tümör büyümesi ve metastazına önemli bir şekilde katkı sağlarlar [174, 175]. VEGF-A, TAM hücrelerinden salgılanan en önemli anjiyogenik faktördür. Bazı kanser türlerinde TAM yoğunluğu ile VEGF-A miktarı birbiri ile doğru orantılıdır. Meme kanserlerinde TAM hücreleri, tümörün özellikle hipoksik kısmında bulunmaktadır. Hipoksik ortam bu makrofajlardaki hipoksi ile indüklenen faktör 1 (HIF-1 α ve HIF-1 β) üretimini artırır. Bu transkripsiyon faktörü VEGF-A ekspresyonunun majör düzenleyicisidir. TAM hücreleri sadece VEGF-A üreterek tümör büyümesine katkı sağlamazlar. Pek çok hücre tarafından salgılanan VEGF-A'nın bazı formları hücreler arası matrikse bağlı durumdadır. Hücreler arası matriksin, matriks metalloproteinazlar tarafından (MMPs) parçalanması ile VEGF-A'nın çözünebilir formları dolaşıma katılabilmektedir [176-178].



Şekil 2.5. VEGF'in immün sistem hücreleri üzerindeki etkisi [179]

2.7. Antikor Karakterizasyonu İçin Tez Kapsamında Kullanılan Metotların Temel Prensipleri

Bir monoklonal antikorun karakterizasyonu uzun ve kompleks bir prosedürdür. Antikorların farklı özelliklerinin tespit edilebilmesi için karakterizasyon yapılabilir. Örneğin antikorun moleküler özelliklerinin belirlenebilmesi için ya da kullanılmak istendiği amaca uygun olup olmadığının tespit edilebilmesi için karakterizasyon yapılabilir. Bu karakterizasyon işlemleri sonucuna dayanarak, antijenik özgüllükleri ve antijene bağlanma kapasiteleri hakkında elde edilecek bilgiler, monoklonal antikorların hangi tedavi ve tanı işleminde veya yönteminde daha uygun olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmaktadır. Bu yüzden karakterizasyon için uygulanacak protokoller ve yöntemler büyük ölçüde değişiklik gösterebilir. Örneğin Ghaemimanesh ve arkadaşları insan sortilin proteinine karşı geliştirdikleri monoklonal antikorun karakterize ederken, Western blot ve flow sitometri yöntemlerini kullanmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar neticesinde bu antikorun, belirtilen yöntemlerde kullanımının uygunluğu açısından karakterizasyonu yapılmıştır [180]. Başka bir çalışmada ise Zheng ve arkadaşları insan nükleer proteini olan FAM76B'ye karşı geliştirdikleri farklı monoklonal antikorları karakterize ederken ELİSA, Western blot, immünoprespitasyon ve immünohistokimya metotlarını kullanmışlardır. Bu çalışma sonucunda araştırmacıların geliştirdikleri antikorların farklı antijenik epitoplara bağlandığı

tespit edilmiş ve ELİSA yönteminde antijene özgül olarak bağlandığı gösterilen bir antikorun Western blot ve immünohistokimya çalışmalarında özgül antijenine bağlanmadığı gibi sonuçlar elde edilmiştir [181]. Yani antikor karakterizasyonu çalışmaları sonucunda antikorların, bireysel olarak farklı özellikleri tespit edilmiş olur ve bu özellikler sayesinde antikorların kullanım alanları belirlenebilir.

2.7.1. ELİSA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

ELİSA yöntemi özgül antijen ve antikor bağlanmasını göstermek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Hem klinik hem de araştırma laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan immünolojik bir testtir. Antijene özgül antikor veya antikora özgül antijen aranabilir. Bu yöntemde kullanılan antikora, enzimler kovalent bağlar ile bağlıdır. Bu enzimler ile reaksiyona giren renksiz olan substrat, renkli hale gelir ve oluşan reaksiyon ürünü spektrofotometrede okutulur. Testte kullanılan renksiz substrat kromojenik substrat olarak adlandırılmaktadır. Antikor ile konjuge edilen enzimler genellikle alkalın fosfataz, horseradish peroksidaz ve β -galaktozidaz enzimidir [182, 183].

Örneklerdeki antijen ya da antikorun kalitatif tespitinin yada kantitatif ölçümünün yapılabilirdiği farklı ELİSA tipleri geliştirilmiştir. Bunlar in-direk ELİSA, Sandwich ELİSA ve Kompetitif ELİSA'dır. Mevcut bütün ELİSA çeşitlerinde var olan antijenin yada antikorun kalitatif tespiti yapılabilir. Alternatif olarak konsantrasyonu bilinen antijen ya da antikor hazırlanarak, bunlardan elde edilen bir standart eğri sayesinde, konsantrasyonu bilinmeyen örneğin konsantrasyonu tespit edilebilir [13, 184].

İn-direk ELİSA

İn-direk ELİSA yönteminde antijene özgül bir antikorun varlığı ve konsantrasyonu ölçülebilir. Bu teknikte mikropaklar antijen ile kaplanır. Test edilecek örnek, antijenle kaplanmış plaklardaki kuyucuklara eklenir. Örnekte bulunan ve antijene özgül olan antikorlar, plakların yüzeyindeki antijene bağlanır. Özgül olarak bağlanan antikorlar, izotipe veya allotipe özgül olarak bağlanabilen ikincil antikorlar ile tespit edilir. Kullanılan ikincil antikorların özelliği, bu antikora enzimlerin kimyasal olarak bağlanmış olmasıdır. Birincil antikora bağlanmayan ikincil antikor yıkama ile ortamdan uzaklaştırılır ve ortama

ikincil antikora konjuge olan enzimin renksiz substratı ilave edilir. Meydana gelen renklenme spektrofotometre ile ölçülerek örneklerin optik dansite değerleri belirlenir [185].

Sandwich ELİSA

Sandwich ELİSA yönteminde örnekteki antijenin varlığı ve miktarı tespit edilebilmektedir. Bu teknikte mikropiplaklar antijene özgül antikorlar ile kaplanır. Antijen içeren örnek kuyucuklara ilave edilir. Bağlanmayan antijenin uzaklaştırılmasını takiben enzim ile işaretli ve antijene özgül olan ikincil antikor ilave edilir. Bu ikincil antikor, kaplama yapmak için kullanılan antikorun bağlandığı antijenik epitoptan farklı bir epitopa bağlanmalıdır. Ortama renksiz substratın ilave edilmesiyle oluşan renk değişimi ölçülerek örnekte bulunan antijen tayin edilebilir. Kullanılan ikincil antikorun enzim ile konjuge olması zorunlu değildir. İn direk ELİSA'da olduğu gibi enzim ile konjuge ve ikincil antikora bağlanabilen başka bir antikor da kullanılabilir [186].

Kompetitif ELİSA

Bu teknikte ilk olarak antikor antijenin bulunduğu örnek ile inkübe edilir. Eğer örnekte antijen çok ise antikorlar antijenlere bağlanır ve serbest antikor miktarı azalır. Örnekte antijen yok ise serbest antikor miktarı fazladır. Oluşan antikor antijen kompleksi, antijen ile kaplanmış plaklara ilave edilir. Birincil antikora özgül ve enzim ile işaretli olan ikincil antikor ile kuyucuklardaki antijene bağlanan birincil antikor miktarı belirlenir. Kompetitif ELİSA'da ters orantılı bir eğri elde edilir. Örnek içinde yüksek oranda antijen varsa daha düşük abzorban değeri oluşmaktadır [21].

2.7.2. İmmünofloresan Boyama

İmmünofloresan boyama antijen-antikor özgüllüğüne dayalı immünolojik bir yöntemdir. İmmünofloresan boyamanın geçmişi 1942 yılına kadar dayanmaktadır. Albert Coons'un pulmoner dokulardaki antipneumococcal antikorları, floresan boyalar ile işaretlemesi sonucu ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde kullanılan antikorların sabit kısımları floresan bir madde ile işaretlenmiştir. Antikora konjuge edilen floresan maddelerden bazıları

fluorescein, rhodamine, phycoerythrin'dir. Floresan moleküllerin ışığı absorbe ettiği dalga boyu (*excitation*) ile yansıttığı dalga boyu (*emission*) farklıdır. Bu floresan maddeler UV ışık kaynağı olan bir mikroskop ile görülebilir. Floresan madde ile işaretli antikorlar kullanılarak yapılan boyamalar direk ya da in-direk olarak ayrılmaktadır. Direk boyamada antijene bağlanan birincil antikor floresan madde ile konjuge iken, in-direk boyamada birincil antikorda floresan madde yoktur. Birincil antikora bağlanan ikincil bir antikor floresan madde ile işaretlenmiştir [187-189]. İmmünofloresan tekniği, otoimmün hastalıklarda immün kompleksin ya da otoantikorların tespitinde, hasta dokularında mikrobiyal partiküllerin tespitinde, tümörlerin yüzeyinde bulunan tümöre özgül antijenlerin tespit edilmesinde kullanılan önemli bir tekniktir [12].

2.7.3. Western Blot

Western blot tekniği, antijen antikor etkileşiminin özgüllüğüne dayanan metotlardan biridir. Bu teknikte spesifik bir protein, kompleks bir karışımın içinden proteine özgül olarak geliştirilmiş antikorların kullanılması ile tespit edilebilir. Bu tekniğin Western blot olarak adlandırılmasının nedeni, DNA fragmentlerinin tespit edildi Southern blot ve RNA fragmentlerinin tespit edildiği Northern blot tekniklerine benzer bir protokolün uygulanıyor olmasıdır [190, 191]. Western blot tekniğinin ilk aşamasında protein karışımı poliakrilamid jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılır. Sodyum dodesil sülfat jel elektroforezinde (SDS-PAGE) protein karışımı, negatif yüklü bir deterjan olan SDS ile karıştırılır. Bu deterjan sayesinde karışımdaki proteinler denatüre olur ve negatif yük ile yüklenir. Negatif yükle yüklenen proteinler elektrik akımı ile hareket ederler. Proteinlerin jeldeki hareketi moleküler ağırlıklarına göre gerçekleşir. Moleküler ağırlığı küçük olan proteinler daha hızlı hareket ederken, büyük ağırlıklı proteinler pozitif yüklü elektroda yani jelin alt kısmına daha yavaş hareket eder [192]. Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler nitroselüloz veya poliviniliden diflorid (PVDF) membrana transfer edilir. Membran hedef proteine özgül olan antikor ve bu antikora bağlanabilen enzim ile işaretli ikincil bir antikor ile muamele edilir. Ortama substratın ilave edilmesi ile hedef proteine ait bantlar tespit edilir [193].

2.7.4. Flow Sitometri

Flow sitometri cihazı, süspansiyon halindeki hücrelerin sıvı bir sistem içerisinde tek tek geçerken büyüklüklerine, granülaritelerine ve floresan özelliklerine göre ayrılabilirdiği ve elde edilen verilerin kantitatif olarak değerlendirilebildiği bir cihazdır. İlk flow sitometri cihazında sadece tek bir parametre olarak hücrenin boyutu ölçülebilenken, gelişen teknoloji ile birlikte 14 parametrenin aynı anda bakılabildiği çok komplike olan flow sitometri cihazları geliştirilmiştir [194]. Süspansiyon haline hazırlanan hücrelerin flow sitometri cihazında incelenebilmesi için hücreler, araştırılan antijenin epitopuna özgül olan monoklonal antikorlar ile işaretlenmelidir. Kullanılan antikorların antijene özgül olmalarının yanı sıra florokrom maddeler ile de konjuge olması da gereklidir. Direk olarak antijene bağlanan primer antikorlar florokrom madde ile işaretli olabileceği gibi, primer antikora bağlanabilen ikincil antikorlar da florokrom ile işaretli olabilir. En çok kullanılan florokromlar fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerytrin (PE/RD1), energy coupled dye(ECD), Phycoerytrin cyanin 5 (PC5), Allophycocyanin (APC) dir [195]. Flow sitometri cihazı akış sistemi, optik sistem ve elektronik sistem olmak üzere üç kısımdan oluşur. Floresan ile işaretli antikorlarla boyanan hücreler, tek sıra halinde akış kanalından geçerken lazer ışığı ile karşılaşırlar. Lazer ışığı ile hücrelerdeki florokrom aktif hale gelir. Aktifleşme ile ortaya çıkan floresan uygun dedektörler ve filtreler tarafından farklı dalga boylarına ayrılarak sinyallere dönüşür. Bu sinyaller bilgisayar sistemine aktarılarak hücrenin büyüklüğü, granülaritesi ve floresan yoğunluğu hakkında bilgi elde edilir [196].



3. MATERYAL ve METOT

3.1. Araç- Gereçler

3.1.1. Hücre serileri

Çalışmalarımızda kullanılmak üzere, hücre kültürü koşullarında çoğaltılan hücre serileri çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hücre Serileri

Hücre Serisi Adı	Hücre Tipi	Markası
HeLa	Serviks Kanseri / Epitel Hücre Serisi	ATCC CCL-2
MCF-7	İnsan Meme Kanseri Hücre Serisi	ATCC HTB-22
5D6.5	İnsan VEGF-A Proteinine Karşı Antikor Salgılayan Hibridoma Hücre Serisi	-
3B2.1	İnsan VEGF-A Proteinine Karşı Antikor Salgılayan Hibridoma Hücre Serisi	-
1B4.2	İnsan VEGF-A Proteinine Karşı Antikor Salgılayan Hibridoma Hücre Serisi	-

Çizelgede bulunan 5D6.5, 3B2.1 ve 1B4.2 olarak isimlendirilen hücreler, daha önceki çalışmalarımızda elde ettiğimiz ve insan VEGF-A proteinine karşı antikor salgıladığını bildiğimiz hibridoma hücrelerdir. Klonların bu şekilde isimlendirilmesi, çalışmalarımızda izlediğimiz sistematığe uygun olarak kendimizce gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Kimyasallar

Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kimyasallar

Kimyasal Adı	Katolog Numarası	Markası
2-Mercaptoethanol	21985-023	GİBCO
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate	T0440	SİGMA
4x Laemmli Sample Buffer	161-0747	BİO-RAD
Amonyum Sülfat	7783-20-2	MERCK
Asetik Asit Glasiyal	K389661156	MERCK
Blotting-Grade Blocker	170-6404	BİO-RAD
Commasie Brilliant Blue	6104-59-2	BİO-RAD
Deoksikolik Asit	D-6750	SİGMA
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	D2650	SİGMA
Disodyum Hidrojen Fosfat	7558-79-4	MİLLİPORE
Dulbecco's Modified Eagle Medium	41965062	GİBCO
Dulbecco's PBS	14190	GİBCO
EGTA	E-3889	SİGMA
Etanol	64-17-5	MERCK
Fetal Sığır Serumı	16000-044	GİBCO
Fetal Sığır Serumı Ultra Low IgG	16250078	GİBCO
Folin Ciocalteus Phenol Reagent	f-9252	SİGMA
Glisin	A3707	APPLICHEM
H ₂ SO ₄	713-2500	MERCK
L-Glutamine	25030	GİBCO
Mem-Neaa	11140	GİBCO
Metanol	67-56-1	MERCK
Mini- Protean Tgx Jel	456-1093	BİO-RAD
NP-40	492015	CALBIOCHEM

Kimyasal Adı	Katolog Numarası	Markası
Paraformaldehit	15712	ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES
Penisilin-Streptomisin	15140	GİBCO
Permeabilizasyon Tamponu (10x)	00-8333-56	AFFYMETRIX EBIOSCIENCE
PMSF	P7626	SİGMA
Potasyum Dihidrojen Ortofosfat	RM1188	HİMEDIA
Potasyum Klorür	RM697	HİMEDIA
Precision Plus Protein Western C Protein Standards	161-0376	BİO-RAD
Precision Plus Protein Prestained Standards	161-0377	BİO-RAD
Proteaz İnhibitör Cocktail Tablets	1836153	BOEHRINGER MANNHEIM
Protein A/G Agaro	20421	THERMO
Recombinant Human VEGF 165 Protein	293-VE-001MG/CF	R&D SYSTEMS
RPMI 1640 Besiyeri	31870	GİBCO
Sığır Albümini	A-2153	SİGMA
Sodyum Dodesil Sülfat	L4390	SİGMA
Sodyum Florür	S-7920	SİGMA
Sodyum Karbonat	A931998718	MERCK
Sodyum Klorür	31434	SİGMA
Sodyum Orthovanadate	S-6508	SİGMA
Sodyum Piruvat	11360	GİBCO
Tripan Mavisi	0508	GİBCO
Trypsin-EDTA (0.25%)	25200056	GİBCO
Trizma Base	T1503	SİGMA
Tween-20	P1379	SİGMA

3.1.3. Antikorlar

Çalışmamızda kullanılan antikorlar Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Antikorlar

Antikor adı	Katolog Numarası	Markası
1B4.2 (Anti-VEGF-A Antikoru)	-	-
3B2.1 (Anti-VEGF-A Antikoru)	-	-
5D6.5 (Anti-VEGF-A Antikoru)	-	-
AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgM, μ Chain Specific	115-036-020	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	715-545-150	Jackson ImmunoResearch
Fluorescein (FITC) AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgM, μ Chain Specific	115-097-020	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	115-036-003	Jackson ImmunoResearch
AffiniPure Donkey Anti-Human IgG (H+L)	709-005-149	Jackson ImmunoResearch
Precision Protein StrepTactin- HRP Conjugate	161-0381	BIO-RAD
Mouse IgM İzotip Kontrol	401601	BioLegend
Mouse IgG İzotip Kontrol	03171D	PharMingen

İnsan VEGF-A proteinine karşı geliştirilmiş ve deneylerde kullanılan antikorların izotipleri Çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Anti VEGF-A antikorlarının izotipleri

	AĞIR ZİNCİR	HAFİF ZİNCİR
5D6.5	İgG1	Kappa
3B2.1	İgM	Kappa
1B4.2	İgG2a	Kappa

3.1.4 Kitler

Çalışmamızda kullanılan kitler Çizelge 3.5’de verilmiştir

Çizelge 3.5. Kitler

Kit adı	Katalog no	Markası
Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit	WP20005	Thermo Fisher Scientific

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hibridoma ve Kanser Hücre Serilerinin Kültürü

Hibridoma hücreleri %10 oranda fetal sıgır serumu (FBS), 2 mM L-glutamin, 1 mM sodyum piruvat, 100U/mL penisilin, streptomisin (Pen-Strep) ve 0,05 mM β -merkaptotonol içeren RPMİ 1640 besiyeri içerisinde çoğaltıldı.

Çalışmalarımızda kullanılan HeLa ve MCF-7 hücre serileri, %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 1 mM sodyum piruvat, 1mM esansiyel olmayan aminoasitler (MEM-NEAA), 100U/mL Pen-Strep ve 0,05 mM β -merkaptotonol içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde 37 °C’de, %5 CO₂’li etüvde, hücre flaskları içerisinde çoğaltıldı. Çoğalan

hücrelerin besiyerleri 3 gün arayla değiştirilerek yeni flasklara taze besi yeri içinde pasaj edildi.

3.2.2. Hücre pasajlaması

Pasaj işlemi için flasklardaki besiyeri boşaltıldıktan sonra, flasklar 10 ml PBS ile 2 kez yıkandı. Flasklara 3 ml %0.25 tripsin-etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ilave edildi. 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde 5 dk inkübasyon yapıldı. Hücreler, fosfatlı tampon çözelti (PBS) yardımı ile konik tabanlı santrifüj tüpünde toplandı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Altta kalan hücreler 1 ml besiyeri ile resüspande edildi.

3.2.3. Hücre sayısı ve canlılığının tespit edilmesi (*Trypan Blue Exclusion*)

Besiyeri ile resüspande edilen hücreler ve tripan mavisi (%0,04) solüsyonu, seyreltme oranı 1:20 olacak şekilde karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µl alındı ve neubauer lamı kullanılarak ışık mikroskopunda hücrelerin canlılığı ve sayısı belirlendi. Hücrelerin bir kısmı deneylerde kullanılırken bir kısmı da %5 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren FBS içerisinde dondurularak daha sonra kullanılmak üzere sıvı azotta saklandı.

3.2.4. Hızlı performans sıvı kromatografisi

Hibridoma süpernatantları FPLC cihazında (*AKTA prufier, USA*), HiTrap Protein G HP kolonu ve/veya HiTrap IgM Purification HP kolonundan geçirildi. 5D6.5 ve 1B4.2 hibridoma süpernatantları HiTrap Protein G kolonundan geçirildi. HiTrap Protein G kolonundan geçen örnekler için, kolona bağlama solüsyonu olarak 20mM sodyum fosfat (pH7.0), elüsyon solüsyonu olarak da 0.1 M gilisine-HCl (pH 2.7) kullanıldı. Elüsyon ürünü üzerine nötralizasyon solüsyonu (1 M Tris, pH 7.5-9) ilave edilerek pH değeri nötral hale getirildi. 3B2.1 hibridoma süpernatantları ise HiTrap IgM saflaştırma kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. HiTrap IgM kolonundan geçen örneklerde bağlama solüsyonu olarak 20 mM sodyum fosfat, 0.8 M (NH₄)₂SO₄ (pH 7.5), elüsyon solüsyonu olarak 20 mM sodyum fosfat (pH 7.5) kullanıldı.

3.2.5. Antikor konsantrasyonlarının belirlenmesi (Lowry Metodu)

Bu metoda göre 4 farklı solüsyon hazırlandı. Standart olarak sığır serum albüminin (BSA) bilinen konsantrasyonları (0 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 35 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL) kullanıldı. Testi yapabilmek için aşağıdaki solüsyonlar hazırlandı.

A solüsyonu: %2 NaCO₃, %0,02 KNaC₄H₄O₆, 0,1M NaOH, %1 SDS

B solüsyonu: %0,5 CuSO₄

C solüsyonu: 25 mL solüsyon A+ 1 mL solüsyon B

D solüsyonu: 1 N Folin Reagent

İşlemler temiz cam deney tüplerinde yapıldı. Son hacim 1 mL olacak şekilde standartlar ve örnekler solüsyon C ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Daha sonra içine solüsyon D ilave edilerek 30 dk karanlıkta inkübe edildi. 96 kuyucuklu plaklara her standart ve örnekten 100 µl koyularak optik dansiteleri mikropilaka okuyucusunda (*Synergy, Biotek, USA*) 650 nm’de okutuldu. Standartlardan elde edilen grafik denklemine, örneklerin optik dansite değerleri koyularak, örneklerin mililitredeki konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.6. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi)

Poliakrilamit jel olarak Bio-Rad marka mini-protean TGX jel (%4-20) kullanıldı. Örnekler jele yüklenirken indirgenmiş (*reducing*) ve indirgenmemiş (*non-reducing*) şekilde yüklendi. İndirgeme yapılan örneklerin laemmlili yükleme solüsyonuna 2-merkaptetanol ilave edildi ve örnekler kuru blok ısıtıcısında 95 °C’de 5 dakika kaynatıldı. İndirgeme yapılmayan örnekler sadece laemmlili yükleme solüsyonu ile karıştırıldı. Standart belirteç olarak Bio-Rad marka Precision Plus Protein belirteci kullanıldı. Örnekler 200 voltta 30 dk yürütüldükten sonra jel, boyama solüsyonu (%0.1 Coomassie R250, %10 asetik asit ve %40 metanol) ile 30 dk boyandı. Yıkama (*destaining*) solüsyonu (%20 metanol, %10 asetik asit) ile birkaç kez yıkama yapılarak jelden fazla boya uzaklaştırıldı.

3.2.7. ELİSA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Polisitren yapıdaki plakların kuyucukları antijen olan rhVEGF-A proteini ile kaplandı. 0.5 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan antijen solüsyonundan her kuyucuğa 100 µL ilave edildi. Plak 1 gece 4 °C'de bekletildi. Kuyucuklardaki antijen solüsyonu boşaltılarak her kuyucuğa 300 µl %3 BSA bloklama solüsyonu aktarıldı. Plaklar 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklar %0.1 Tween-20 içeren PBS yıkama solüsyonu ile yıkandı. 5D6.5, 3B2.1, 1B4.2 antikorlarının seri dilüsyonları hazırlanarak antijen ile kaplanmış kuyucuklara 100'er µL ilave edildi. Her konsantrasyon için 3 kuyucuk çalışıldı. Kontrol olarak ise antijen ile kaplanmış kuyucuklara izotip antikorlar ilave edildi. Plaklar 1.5 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası otomatik yıkama cihazı (*Tecan, HydroFlex, İsviçre*) kullanılarak, kuyucuklar 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Kuyucuklara ikincil antikor olarak HRP ile işaretli anti-mouse antikorları 100 µl olacak şekilde ilave edildi. Plaklar 1.5 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Kuyucuklara 100 µl tetrametilbenzidine (TMB) substrat solüsyonundan ilave edildi. Plaklar oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Kuyucukların içerisine 100 µl durdurma (*stop*) solüsyonu (1N H₂SO₄) ilave edilerek mikroparka okuyucusunda (*Synergy, Biotek, USA*) 450 nm'de okutuldu. Optik dansite değerleri ve antikor konsantrasyonları arasındaki ilişki dağılım grafiği ile gösterildi.

3.2.8. Hücre içi boyama ve akım sitometri analizleri

HeLa hücreleri hücre içi boyama yapmak üzere hazırlandı. Bu işlem için hücre içi boyama kiti (*Ebioscience, USA*) kullanıldı. Hücreler (1x10⁶ HeLa hücresi) 1.5ml'lik tüplerde %4 paraformaldehit ile 10 dk fikse edildi. Fikse edilen hücreler 2 kez santrifügasyon yapılarak PBS ile yıkandı. Hücreler 100 µl permeabilizasyon solüsyonunda 20 dk inkübe edildi. Ardından 2 kez santrifügasyon yapılarak PBS ile yıkama yapıldı. %5 BSA içeren permeabilizasyon solüsyonu ile 30 dk bloklama yapıldı. Hücreler 5D6.5, 3B2.1 ve 1B4.2 antikorları ile 1 saat inkübe edildi. Kontrol grubu olarak uygun izotip antikorları kullanıldı. Süre sonunda 3 kez yıkama yapıldı. İkincil antikor olarak 1/200 oranında Alexa Fluor 488 ile işaretlenmiş Anti-Mouse İgG (H+L) antikoru ve/veya Fluorescein (FITC) ile işaretlenmiş Anti-Mouse İgM (µ zincirine spesifik) antikoru kullanıldı. Hücreler ikincil antikor ile 40 dk

karanlıkta inkübe edildikten sonra 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Ardında okutma solüsyonu içine alınan hücreler akım sitometri cihazında (*FC500, Beckman Coulter, USA*) okutuldu.

3.2.9. İndirek immün floresan boyama

HeLa hücreleri 8 kuyucuğu olan steril özel boyama slaytlarında (*chamber slide*) bölüm 3.2.1’de anlatıldığı gibi kültür edilerek çoğaltıldı. Slaytın her kuyucuğuna 3×10^3 HeLa hücresi ekildi. 2 gün sonra besi yeri boşaltılarak PBS ile yıkama yapıldı. Her kuyucuğa %4 paraformaldehitten 100 μ l koyuldu ve hücreler 10 dk fikse edildi. Ardından 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Her yıkama işleminde hücreler 5 dk PBS’de bekletildi. Süre sonunda kuyucuklardaki PBS boşaltıldı. Yıkama tamamlandıktan sonra hücreler permeabilizasyon solüsyonu (*Ebioscience, USA*) ile 20 dk inkübe edildi. Ardından %5 BSA içeren permeabilizasyon solüsyonu ile 3 saat oda sıcaklığında bloking yapıldı. Hücreler 5D6.5, 3B2.1, 1B4.2 ve izotip kontrol antikorları ile 4 °C’de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, %0.1 tween-20 içeren yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı. İkincil antikor olarak Alexa Fluor 488 ile işaretlenmiş anti-mouse IgG antikor ve/veya Fluorescein (FITC) ile işaretlenmiş anti-mouse IgM antikor 1/300 oranında kullanıldı. Hücreler ikincil antikor ile karanlıkta 30 dk bekletildi. Çekirdek boyaması için %0.5 oranında Hoechst boyası ilave edilerek 30 dk daha inkübe edildi. Süre sonunda 3 kez yıkama yapıldı. Floresan boyamalar için kullanılan kapatma solüsyonu (*Fluorescence mounting medium*) hücrelerin bulunduğu lam üzerine damlatılarak üzerine lamel kapatıldı. Boyamalar floresan mikroskopunda (*Leica-CM1900*) incelendi.

3.2.10. İmmünopresipitasyon

HeLa ve MCF-7 hücre serilerinden 3×10^6 hücre 1 mL radioimmünopresipitasyon assay liziz solüsyonu (RİPA) ile buz üzerinde 30 dk boyunca her 10 dk’da bir vortekslenerek liziz edildi. Süre sonunda lizatlar soğutmalı mikrosantrifüjde 4 °C’de 12 000g’de 15 dk santrifüj edildi. Proteinlerin bulunduğu süpernatant kısmı alındı. Lizatların içine insan VEGF-A proteinine karşı üretilmiş ve insanlaştırılmış bir monoklonal antikor olan Bevacizumab’dan 1 μ g/mL olacak şekilde ilave edildi. İçinde hücre lizatı bulunmayan, sadece RİPA liziz solüsyonu ve 1 μ g/mL Bevacizumab içeren bir grup daha yapıldı. Bu grup ve içerisinde

hücre lizatları olan diğer gruplarda bütün aşamalar aynı şekilde uygulandı. Hücre lizatı- Bevacizumab karışımı ve sadece RİPA solüsyonu- Bevacizumab içeren örnekler 4 °C'de 1 gece inkübe edildi. Örneklerin içine 75 µl protein A/G agaroz ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Örneklerle 500 µl yıkama solüsyonu (25mM Tris, 150mM NaCl; pH 7.2) ilave edildi ve santifügasyon ile yıkama yapıldı. Santrifügasyon sonrası üstteki süpernatant atılarak altta kalan pellete yeniden yıkama solüsyonu ilave edildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. En son aşamada pellet üzerine 50 µl elüsyon solüsyonu (0.2M Glisin-HCl, pH 2.5) ilave edildi ve 5 dk inkübasyon yapıldı. Süre sonunda santrifügasyon yapılarak süpernatant (elüsyon) alındı. Elde edilen elüsyon üzerine 10 µl nötralizasyon solüsyonu (1M Tris, pH 7.5-9) ilave edildi.

RİPA Liziz Solüsyonu İçeriği

50mM Tris-HCL (pH:7,4), %1 NP-40, %0,1 SDS, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 50mM NaF, 1mM PMSF, 0.2mM Na₃VO₄, 1µg/ml proteaz inhibitörü.

3.2.11. SDS- PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi)

İmmünpresipitasyon (*elüsyon*) ürünleri ve rhVEGF-A proteini indirgenmiş ve indirgenmemiş formlarda poliakrilamit jelde yürütüldü. İndirgeme yapılan örneklerin laemmlili yükleme solüsyonuna, 2-mercaptoetanol ilave edildi. Bu yükleme solüsyonu ile karıştırılan örnekler kuru ısıtıcıda 95 °C'de 5 dk kaynatıldı. İndirgeme yapılmayan örnekler sadece laemmlili yükleme solüsyonu ile karıştırıldı. Poliakrilamit jelle yüklenen örnekler dikey elektroforez sistemi kullanılarak 200 volt elektrik akımıyla 30 dk yürütüldü. Standart belirteç olarak Bio-Rad Precision Plus Protein Western C Protein belirteci kullanıldı.

3.2.12. Western Blot

Jelde yürütülen proteinler, poliviniliden diflorid (PVDF) membrana transefer edildi. Transfer işlemi yapmak için transfer cihazı (*Trans-Blot Turbo, Bio-Rad, USA*) kullanıldı. Transfer koşulları 2,5 amper, 25 volt ve 5 dakika olarak belirlendi. Transferden sonra PVDF membran %3 süt tozu içeren bloklama solüsyonunda çalkalayıcı üzerinde 1saat bekletildi. Bloklamadan sonra membranlar, %3 süt tozu solüsyonu içinde hazırlanan 5D6.5, 3B2.1 ve

1B4.2 antikorları ile 4 °C'de 1 gece çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Inkübasyon sonrası membranlar %0,1 tween-20 içeren yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Her yıkamada membranlar 5 dk yıkama solüsyonunda bekletildi. HRP ile konjuge edilmiş ikincil antikorlar 1/5000 oranında %3 süt tozu içeren solüsyon içinde hazırlandı. Membranlar ikincil antikor solüsyonu ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından membranlar 3 kez yıkandı. Görüntüleme işlemi Novex marka ECL (*Chemiluminescent Substrate Reagent*) Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Membranlar röntgen filmine basılarak protein bantları görüntülendi.

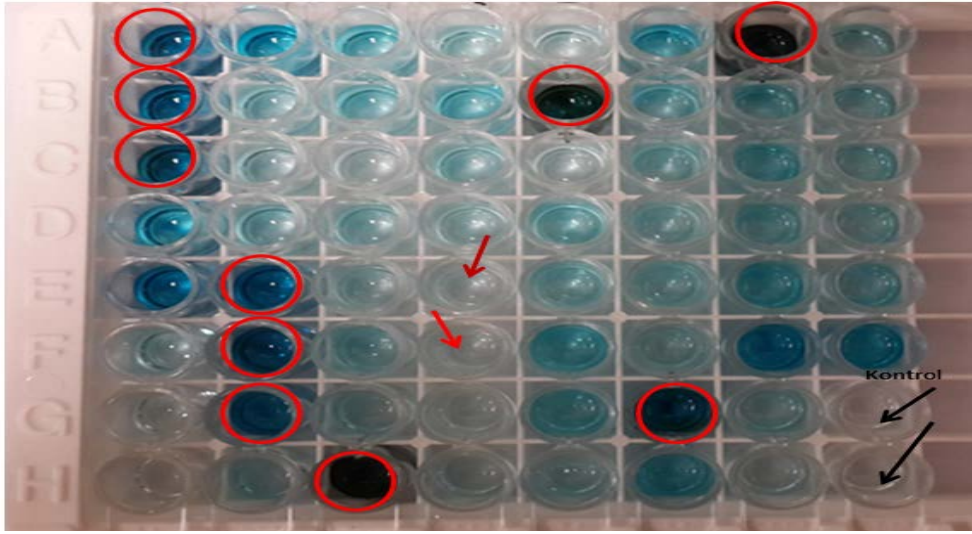




4.BULGULAR

4.1. Hibridoma Klonlarının Taranması ve oğaltılması

Hibridoma klonları 37 °C ve %5 CO₂ içeren etüvde, %10 FBS'li RPMI besi yerinde kültüre edilmiştir. Hibridoma klonlarının arasından rhVEGF-A proteinine özgül olarak bağlanabilen klonların seçimi için ELİSA yöntemi kullanılmış ve 278 adet hibridoma klonu taranmıştır. ELİSA yönteminde rhVEGF-A ile reaksiyona girerek yüksek pozitiflik gösteren üç adet hibridoma klonu, materyal metotta ayrıntılı şekilde anlatılan yöntemler kullanılarak karakterizasyon çalışması için seçilmiştir. Seçilen klonlar 5D6.5, 1B4.2 ve 3B2.1 olarak adlandırılmıştır. 175 cm²'lik hücre kültürü flasklarında çoğaltılan hibridoma hücrelerinin yoğunluğu her gün inverted mikroskop kullanılarak kontrol edilmiştir. Flaskların tabanı yüksek oranda hibridoma hücreleri ile kaplandığında, besiyerleri toplanmıştır. Toplanan hibridoma süpernatantlarının izotiplendirme analizi yapılmış (Çizelge 3.4) ve süpernatantlardan anti-VEGF-A antikorları saflaştırılmıştır. Resim 4.1'de 278 hibridoma klonundan 62 tanesinin ELİSA yöntemi ile taranmasıyla elde edilen veriler nitel (*kalitatif*) olarak gösterilmektedir. Kırmızı daireler ile işaretlenen kuyucuklarda, rhVEGF-A proteini ile yüksek oranda özgül olarak bağlanan antikorların var olduğu görülmektedir. Bu örneklerin 450 nm'deki optik dansite değerleri dörtten büyük (O.D>4.00 *ovrflw*) çıkarken, siyah oklar ile gösterilen kontrol kuyucuklarının optik dansite değeri ortalaması 0,176± 0,049 olarak bulunmuştur.

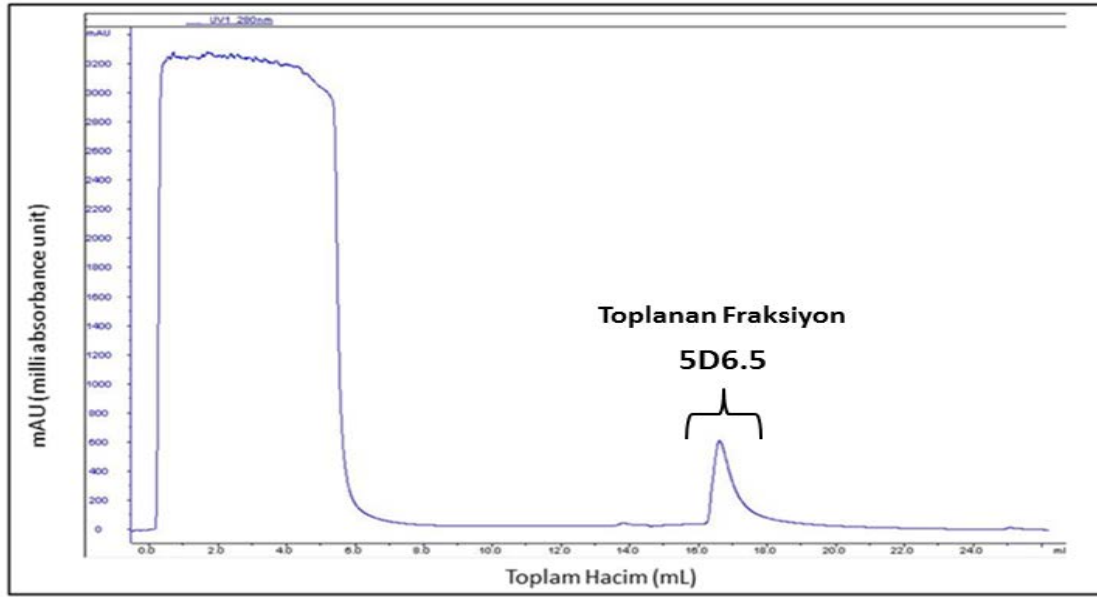


Resim 4.1. Hibridoma klonlarının ELİSA yöntemi ile taranması sonucu örneklerden elde edilen renk değişimi. Kırmızı daireler ile işaretli kuyucuklar yüksek pozitif klonları gösterirken, kırmızı ok işaretli kuyucuklar negatif klonlara örnektir. Siyah oklar kontrol kuyucuklarını göstermektedir

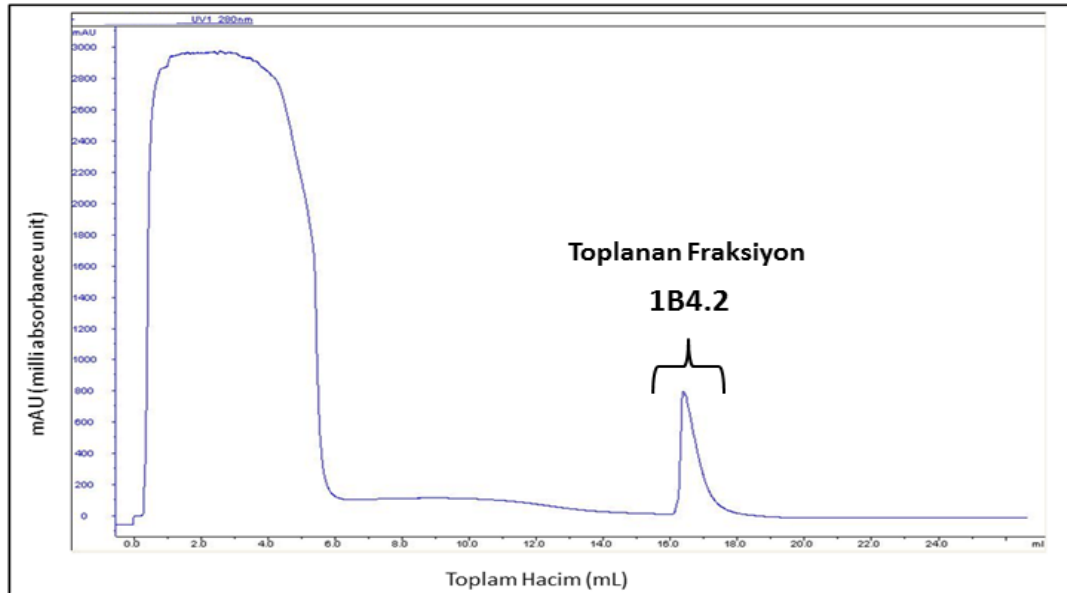
4.2. Antikorların Saflaştırılması

Hibridoma kültür süpernatanlarından antikorlar, hızlı performans sıvı kromatografisi yöntemi ile saflaştırıldı. 5D6.5 ve 1B4.2 hibridoma süpernatanları HiTrap Protein G kolonundan geçirildi. 3B2.1 hibridoma süpernatanları ise HiTrap İgM saflaştırma kolonundan geçirilerek saflaştırıldı. Kolonlara bağlanamayan proteinler kolondan önce düşerken, kolona bağlanan İgG ve İgM izotipindeki anti-VEGF-A antikorları elüsyon sırasında toplanarak saf antikorlar elde edilmiş oldu.

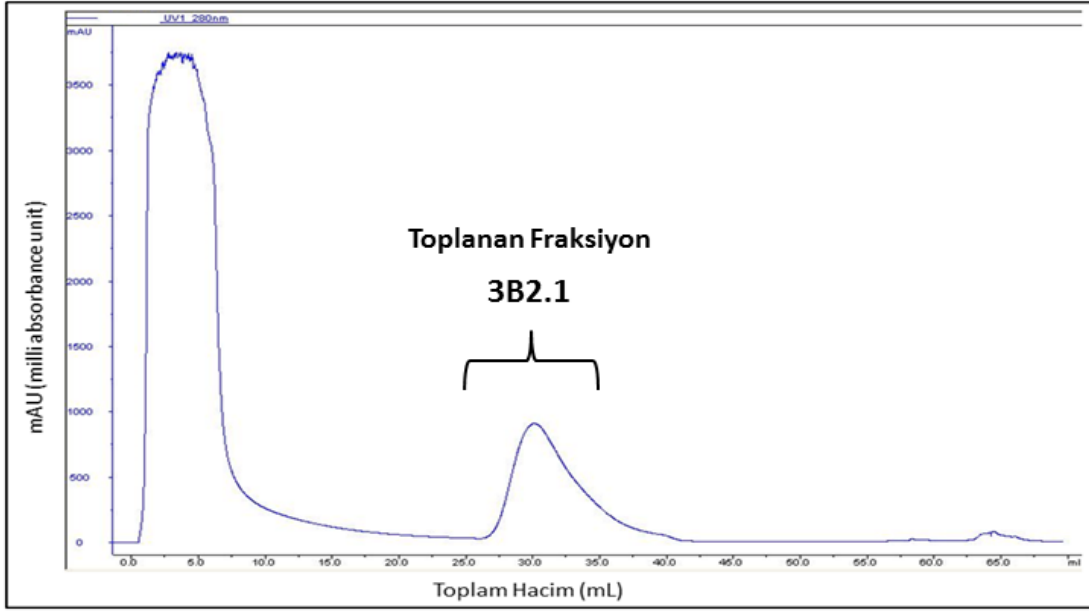
Anti-VEGF-A antikorlu süpernatanlar, saflaştırılırken elde edilen pikler Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Hücre kültürü süpernatanları içinde bulunan anti-VEGF-A antikorları bağlama solüsyonu ile kolona tutunurken, elüsyon solüsyonu ile antikorlar kolondan ayrılmıştır. Büyük pikler kolona bağlanamayan proteinleri gösterirken, küçük pikler antikorları göstermektedir.



Şekil 4.1. 5D6.5 antikorunun protein G kolonu ile saflaştırma grafiği. Büyük pik kolona bağlanamayan proteinleri gösterirken, küçük pik 5D6.5 antikor pikini göstermektedir



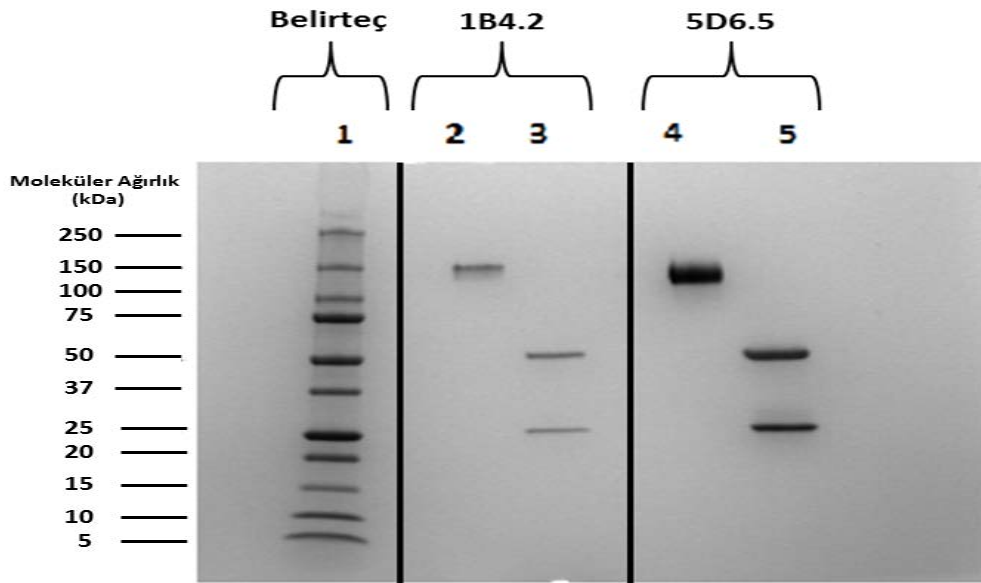
Şekil 4.2. 1B4.2 antikorunun protein G kolonu ile saflaştırma grafiği. Büyük pik kolona bağlanamayan proteinleri gösterirken, küçük pik 1B4.2 antikor pikini göstermektedir



Şekil 4.3. 3B2.1 antikorunun HiTrap İgM saflaştırma kolonu ile saflaştırma grafiği. Büyük pik kolono bağlanmayan proteinleri gösterirken, küçük pik 3B2.1 antikor pikini göstermektedir

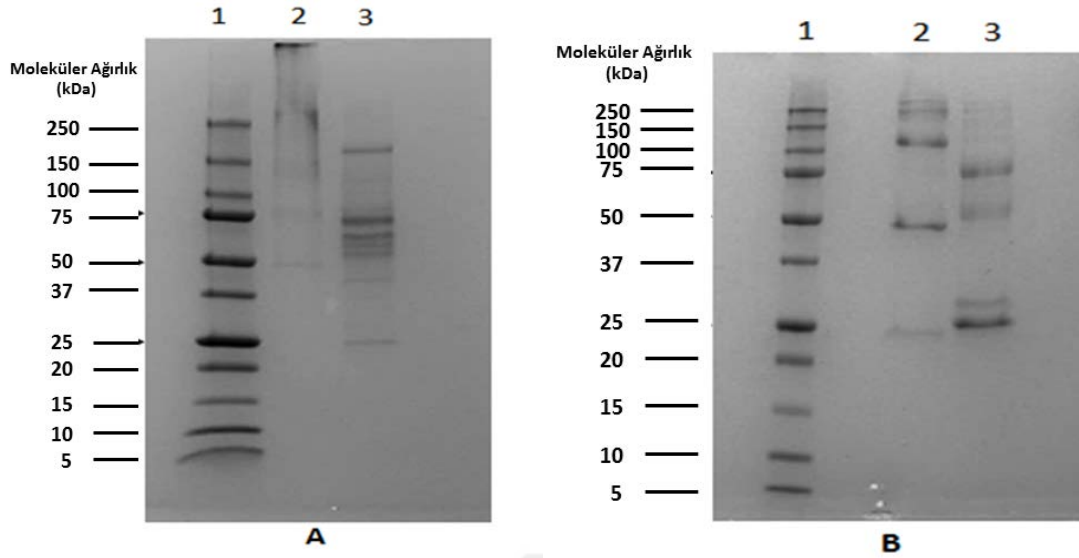
4.3. Anti- VEGF-A Antikorlarının Saflığının Gösterilmesi

Antikor saflaştırma kolonundan geçirilerek elde edilen antikorların saflığını gösterebilmek için antikorlar SDS-PAGE jele yüklenerek 200 voltta 30 dakika yürütüldü. Örnekler jele, indirgenmiş (denatüre edilmiş) ve indirgenmemiş (denatüre edilmemiş) halde 2 farklı şekilde yüklendi. İndirgeme ajanı olarak 2-merkaptetanol kullanıldı. Örneklerin SDS-PAGE’de yürütülmesinden sonra jel coomassie brilliant blue boyası ile boyandı ve protein bantları gösterildi. (Şekil 4.4, Şekil 4.5)



Şekil 4.4. 5D6.5 ve 1B4.2 antikorlarının SDS PAGE jel görüntüsü (1) Belirteç (2) 1B4.2 antikoru indirgenmemiş (3) 1B4.2 antikoru indirgenmiş (4) 5D6.5 antikoru indirgenmemiş (5) 5D6.5 antikoru indirgenmiş

2-Merkaptoetanol ile kaynatılarak yapılan indirgenme reaksiyonunda, antikorların ağır ve hafif zincirleri arasındaki kovalent disülfid bağları koparak indirgenir. Naif halde 150-180 kDa olan İgG molekülünde bu indirgenme işlemi sonrasında ağır ve hafif zincirler birbirinden ayrıldığı için 50 kDa ve 25 kDa olan iki farklı protein olarak görülür. İgG izotipinde olan 5D6.5 ve 1B4.2 antikorları indirgeme olmayan koşullarda 150 kDa ağırlığında görünürken, indirgeme yapılan yani antikorun hafif ve ağır zincirleri arasındaki disülfid bağları koparılan örnekteki bantlar 25 kDa (hafif zincir), 50 kDa (ağır zincir) civarında görüntülendi (Şekil 4.4).



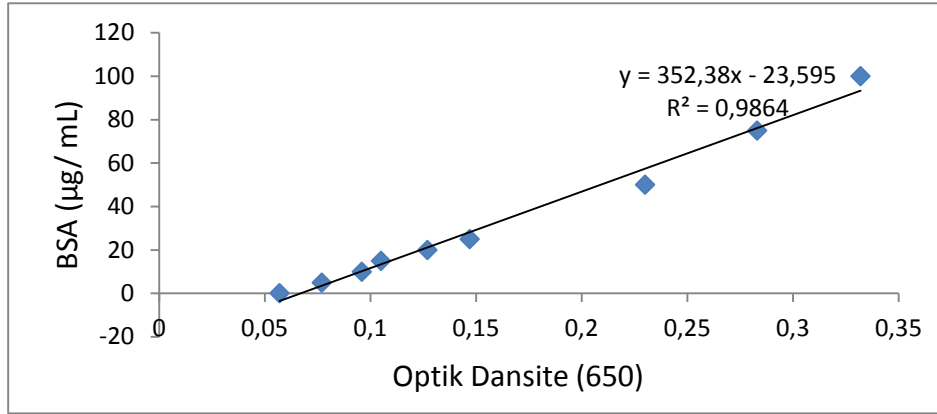
Şekil 4.5. 3B2.1 antikorunun SDS PAGE jel görüntüsü. A-) 3B2.1 antikor B-) İgM izotipinde olduğu bilinen antikor (1) Belirteç (2) İndirgenmemiş koşul (3) İndirgenmiş koşul

İgM izotipindeki 3B2.1 antikorunun SDS PAGE jeldeki görüntüsü ticari olarak satılan ve İgM izotipinde olan bir antikor ile karşılaştırıldı. İgM izotipindeki bir antikor pentamer yapıdadır ve yaklaşık olarak 950 kDa ağırlığındadır. 2-Merkaptoetanol ile kaynatılarak yapılan indirgenme reaksiyonunda ağır ve hafif zincirler arasındaki disülfid bağları kopar. Antikor 72–83 kDa ağır zincirler, 23–28 kDa hafif zincirler olmak üzere parçalara ayrılır. Kullandığımız jel en fazla 400 kDa ağırlığındaki bantları gösterebilen bir jel olduğu için indirgenmemiş koşullardaki İgM antikor bantı gösterilemedi. 3B2.1 antikorunda indirgenmiş koşullarda 25 kDa (hafif zincir) ve 75 kDa (ağır zincir) ağırlığında protein bantları görülürken 50 kDa - 75 kDa arasında da protein bantları görüldü (Şekil 4.5/ A). Aynı ağırlıktaki protein bantları ticari olarak satılan İgM antikorunda da (PharMingen Cat#03082C) gözlemlendi (Şekil 4.5 /B).

4.4. Anti- VEGF-A Antikorlarının Konsantrasyonları

Anti- VEGF-A antikorlarının konsantrasyonları belirlenirken, standart olarak kullanılan sığır serum albüminin (BSA) bilinen konsantrasyonları ve anti-VEGF-A antikorları bölüm 3.2.5. de ayrıntılı olarak belirtilen solüsyonlar ile inkübe edildi. Örneklerden elde edilen optik dansite değerleri 650 nm’de okutuldu (Çizelge 4.1). BSA’nın bilinen konsantrasyonlarından elde edilen optik dansite değerleri ile bir standart grafiği hazırlandı (Şekil 4.6). Standartlardan elde edilen grafik denklemine, örneklerin optik dansite değerleri

ortalaması koyuldu. Elde edilen değerler, örneklerin seyreltilme oranı (1/5) ile çarpılarak örneklerin mililitredeki konsantrasyonları hesaplandı. Yapılan hesaplamalara göre 5D6.5 antikorunun konsantrasyonu 48 µg/ml, 1B4.2 antikorunun konsantrasyonu 64 µg/ml ve 3B2.1 antikorunun konsantrasyonu 70 µg/ml olarak bulundu.



Şekil 4.6. BSA standart eğri grafiği

Çizelge 4.1. Anti-VEGF-A antikorlarının konsantrasyonları

	Optik Dansite Ortalaması	Antikor Konsantrasyonu (µg/mL)
5D6.5	0,094	48 ± 5
1B4.2	0,104	64 ± 3,7
3B2.1	0,107	70 ± 8,7

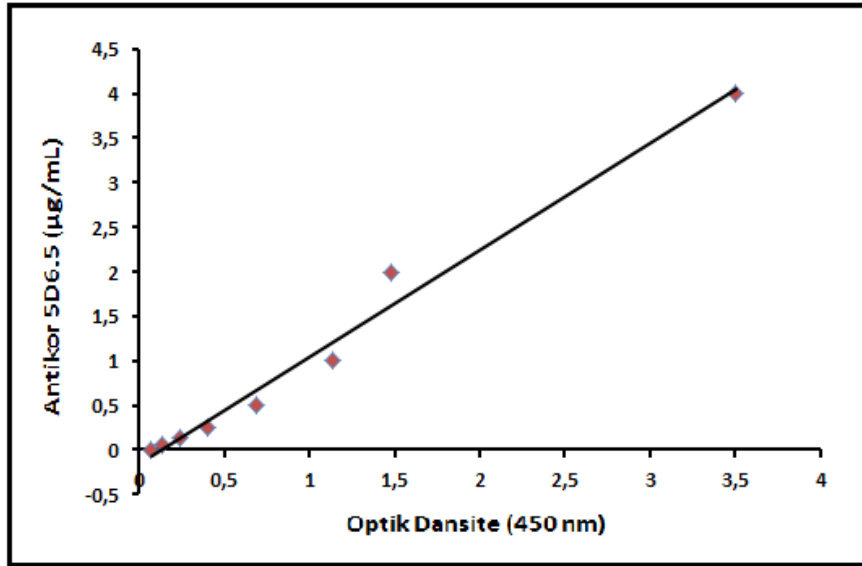
4.5. Anti-VEGF-A Antikorlarının ELİSA İçin Karakterizasyonu

Anti- VEGF-A antikorların ELİSA yönteminde kullanılabilirliğini araştırabilmek için in-house ELİSA yöntemi uygulandı. Bunun için yüksek miktarda protein bağlama kapasitesine sahip, polistiren yapıdaki ELİSA plakları 0,5 µg/mL konsantrasyondaki rhVEGF-A proteini ile kaplandı ve %3 BSA ile bloklama yapıldı. 5D6.5, 1B4.2 ve 3B2.1 antikorlarının 4µg/mL'den

başlayarak azalan seri dilüsyonları (4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.125 µg/mL, 0.062 µg/mL ve 0 µg/mL) kullanıldı. 5D6.5 ve 1B4.2 antikorları için ikincil antikor olarak HRP ile konjuge anti-mouse IgG antikor 1/ 5000 oranında kullanılırken 3B2.1 antikor 3B2.1 antikor için ikincil antikor olarak HRP ile konjuge anti- mouse IgM antikor 1/5000 oranında kullanıldı. TMB ile inkübasyon sonrasında durdurma (*stop*) solüsyonu ilave edildi ve optik dansite değerleri 450 nm’de ölçüldü.

5D6.5 antikorunun ELİSA için karakterizasyonu

5D6.5 antikorunun 4 µg/ml’den başlayan ve seri şekilde azalan dilüsyonları kullanılarak yapılan bu çalışma sonucunda, 450 nm’de okutulan örneklerden elde edilen optik dansite değerleri ortalaması (Çizelge 4.2) ile konsantrasyonlar arasındaki ilişki Şekil 4.7’de görüldüğü gibi grafiklendirildi. 5D6.5 antikorunun konsantrasyon artışına bağlı olarak optik dansite değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır (Şekil 4.7). Bu sonuçlara göre 5D6.5 antikorunun ELİSA yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.



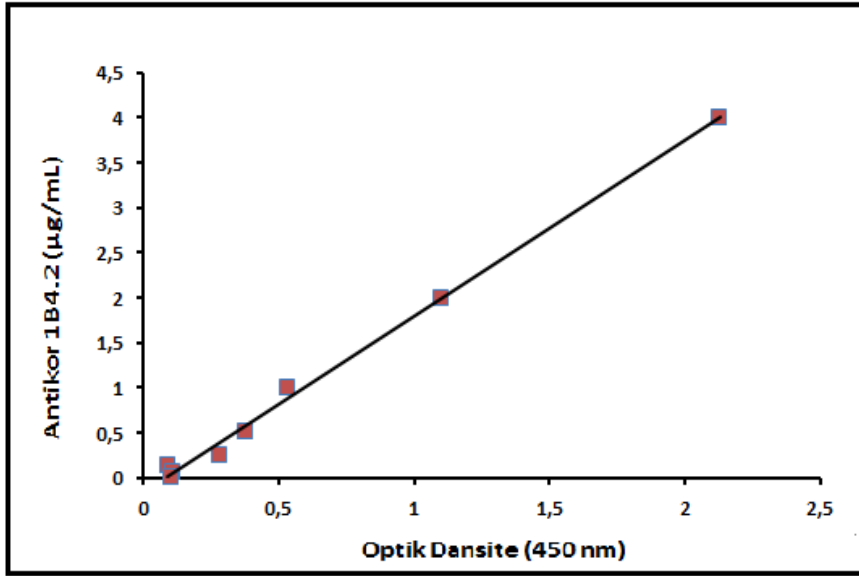
Şekil 4.7. 5D6.5’in konsantrasyona göre optik dansite değişimi (Korelasyon Katsayısı, $R^2=0,9827$)

Çizelge 4.2. 5D6.5 antikorunun ELİSA için karakterizasyonunda elde edilen optik dansite değerlerinin ortalaması ve optik dansite değerlerinin standart sapması

Antikor Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Optik Dansite Ortalaması	Optik Dansite Standart Sapmaları
4 $\mu\text{g/mL}$	3,504	$\pm 0,110$
2 $\mu\text{g/mL}$	1,483	$\pm 0,087$
1 $\mu\text{g/mL}$	1,141	$\pm 0,070$
0.5 $\mu\text{g/mL}$	0,689	$\pm 0,052$
0.25 $\mu\text{g/mL}$	0,403	$\pm 0,023$
0.125 $\mu\text{g/mL}$	0,240	$\pm 0,014$
0.062 $\mu\text{g/mL}$	0,136	$\pm 0,004$
0 $\mu\text{g/mL}$ (İsotip Antikor)	0,073	$\pm 0,005$

1B4.2 antikorunun ELİSA için karakterizasyonu

1B4.1 antikorunun 4 µg/ml'den başlayan ve seri şekilde azalan dilüsyonları kullanılarak yapılan çalışma sonucunda, 450 nm'de okutulan örneklerden elde edilen optik dansite değerleri ortalaması (Çizelge 4.3) ile konsantrasyonlar arasındaki ilişki Şekil 4.8'de görüldüğü gibi grafiklendirildi. 1B4.2 antikorunun konsantrasyon artışına bağlı olarak optik dansite değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır (Şekil 4.8). Bu sonuçlara göre 1B4.2 antikorunun ELİSA yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.



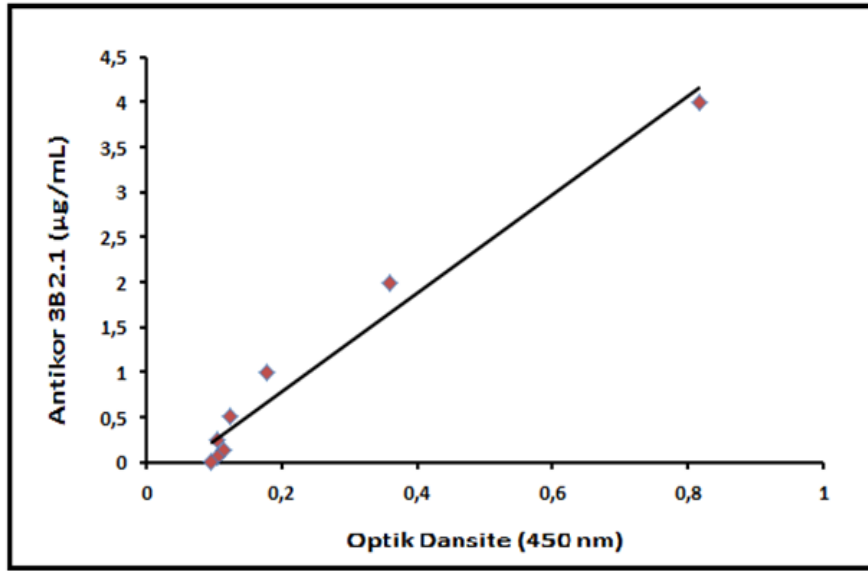
Şekil 4.8. Antikor 1B4.2'in konsantrasyona göre optik dansite değişimi (Korelasyon Katsayısı $R^2=0,996$)

Çizelge 4.3. 1B4.2 antikorunun ELİSA için karakterizasyonunda elde edilen optik dansite değerlerinin ortalaması ve optik dansite değerlerinin standart sapması

Antikor Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Optik Dansite Ortalaması	Optik Dansite Standart Sapmaları
4 $\mu\text{g/mL}$	2,130	$\pm 0,101$
2 $\mu\text{g/mL}$	1,101	$\pm 0,097$
1 $\mu\text{g/mL}$	0,535	$\pm 0,015$
0.5 $\mu\text{g/mL}$	0,379	$\pm 0,019$
0.25 $\mu\text{g/mL}$	0,284	$\pm 0,054$
0.125 $\mu\text{g/mL}$	0,091	$\pm 0,008$
0.062 $\mu\text{g/mL}$	0,110	$\pm 0,006$
0 $\mu\text{g/mL}$ (İsotip Antikor)	0,107	$\pm 0,008$

3B2.1 antikorunun ELİSA için karakterizasyonu

3B2.1 antikorunun 4 µg/ml'den başlayan ve seri şekilde azalan dilüsyonları kullanılarak yapılan bu çalışma sonucunda, 450 nm'de okutulan örneklerden elde edilen optik dansite değerleri ortalaması (Çizelge 4.4) ile konsantrasyonlar arasındaki ilişki Şekil 4.9'da görüldüğü gibi grafiklendirildi. 3B2.1 antikorunun konsantrasyon artışına bağlı olarak optik dansite değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır. Bu sonuçlara göre 3B2.1 antikorunun ELİSA yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.9. Antikor 3B2.1'in konsantrasyona göre optik dansite değişimi (Korelasyon Katsayısı $R^2=0,9701$)

Çizelge 4.4. 3B2.1 antikorunun ELİSA için karakterizasyonunda elde edilen optik dansite değerlerinin ortalaması ve optik dansite değerlerinin standart sapması

Antikor Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Optik Dansite Ortalaması	Optik Dansite Standart Sapmaları
4 $\mu\text{g/mL}$	0,817	$\pm 0,056$
2 $\mu\text{g/mL}$	0,360	$\pm 0,022$
1 $\mu\text{g/mL}$	0,177	$\pm 0,016$
0.5 $\mu\text{g/mL}$	0,123	$\pm 0,017$
0.25 $\mu\text{g/mL}$	0,106	$\pm 0,011$
0.125 $\mu\text{g/mL}$	0,115	$\pm 0,013$
0.062 $\mu\text{g/mL}$	0,105	$\pm 0,016$
0 $\mu\text{g/mL}$ (İsotip Antikor)	0,096	$\pm 0,015$

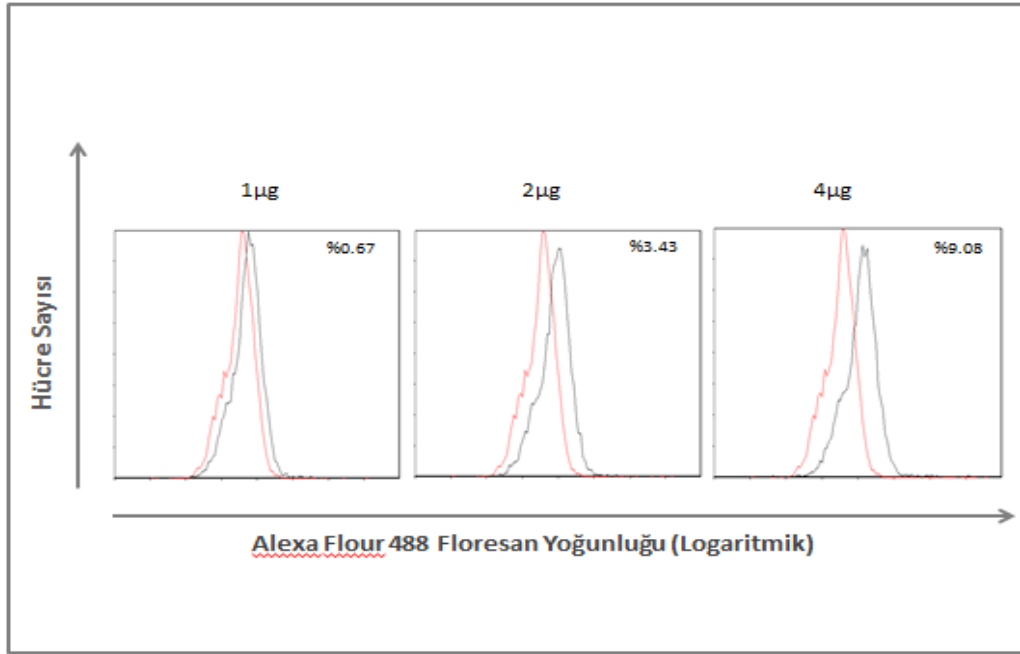
Aynı konsantrasyondaki 5D6.5 antikor, 1B4.2 antikor ve 3B2.1 antikorundan elde edilen optik dansiteler karşılaştırıldığında, 5D6.5 antikorundan elde edilen optik dansite değerleri, diğer antikorlardan elde edilen optik dansite değerlerinden daha yüksektir. 1B4.2 antikorundan elde edilen optik dansite değerleri ise 3B2.1 antikorundan elde edilen değerlerden daha yüksektir. Bu sonuç ELİSA yönteminde 5D6.5 antikorunun diğer antikora oranla daha güçlü bir şekilde rhVEGF-A proteinine bağlandığını gösterirken, en zayıf bağlanmanın 3B2.1 antikorunda gerçekleştiğini göstermektedir.

4.6. Anti-VEGF-A Antikorlarının Akım Sitometri İçin Karakterizasyonu

1×10^6 HeLa hücresi %4 paraformaldehit ile fikse edildikten sonra %0,1 saponin içeren permeabilizasyon solüsyonu ile hücrelerin yüzeyinde porlar açıldı. %5 BSA içeren permeabilizasyon solüsyonu ile bloklama yapıldı. 5D6.5, 1B4.2 ve 3B2.1 antikorlarının $1 \mu\text{g}$ / 1×10^6 hücre, $2 \mu\text{g}$ / 1×10^6 hücre ve $4 \mu\text{g}$ / 1×10^6 hücre olacak şekilde 3 farklı konsantrasyonu ile uygun izotip antikorları kullanıldı. Primer antikor ile inkübasyon sonrasında hücreler floresan boya ile konjuge edilmiş ikincil antikorlar ile inkübe edildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra hücreler, akım sitometri cihazından geçirilerek analizler yapıldı. Data analizleri FC500, Beckman Coulter analiz programı kullanılarak yapıldı. Analiz işlemi yapılırken izotip antikor ile boyanan örnekten elde edilen floresan yoğunluğuyla, anti-VEGF-A antikorları kullanılarak boyanan örnekten elde edilen floresan yoğunluğu karşılaştırıldı. Örneklerden elde edilen histogramlar birbiri üzerine çakıştırılarak (*overlay*) aradaki fark yüzde (%) cinsinden gösterildi.

5D6.5 antikoru için akım sitometri analizleri

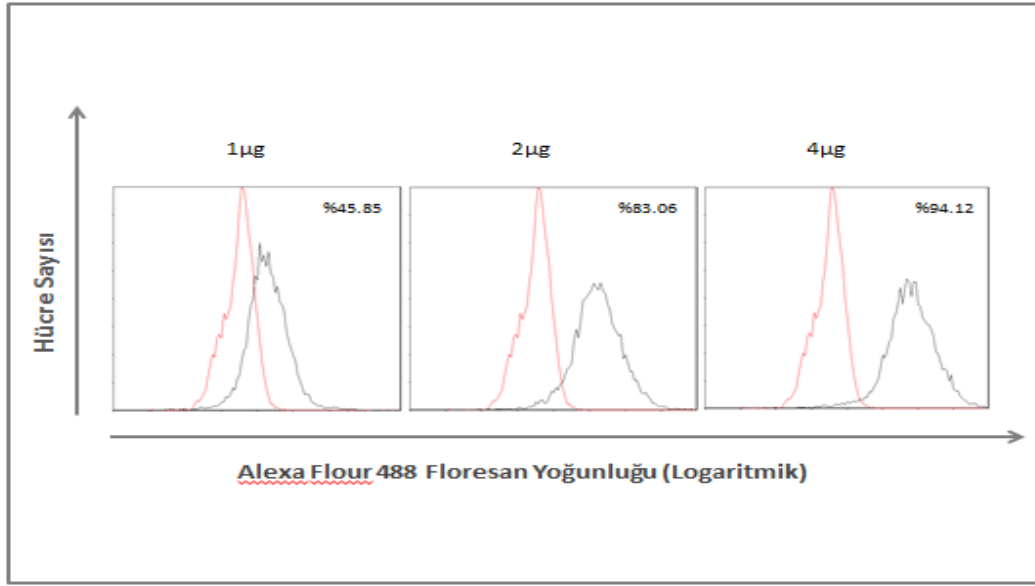
$1 \mu\text{g}$ 5D6.5 antikoru ile boyanan hücrelerde floresan yoğunluğunda izotip kontrole göre farklılık görülmezken, $2 \mu\text{g}$ ve $4 \mu\text{g}$ antikor kullanılarak boyanan hücrelerde floresan yoğunluğunun kontrole göre arttığı görülmüştür. $2 \mu\text{g}$ antikor kullanılan örnekte izotipe oranla %3.43 floresan yoğunluğu artmıştır. $4 \mu\text{g}$ antikor kullanılan örneklerdeki floresan yoğunluğu %9.08 artmıştır (Şekil 4.10). Konsantrasyon artışına bağlı olarak floresan yoğunluğunda artış olmuştur fakat bu artış en yüksek konsantrasyon olan $4 \mu\text{g}$ 'da bile %9.08'da kalmıştır. Bu sonuçlara göre 5D65 antikorunun akım sitometri yönteminde kullanılmasının uygun olmadığı düşünülmektedir.



Şekil 4.10. 5D6.5 antikorunun HeLa hücresindeki VEGF-A ile reaktivitesinin akım sitometri ile analizi (izotip: kırmızı, 5D6.5 antikoru: siyah)

1B4.2 antikoru için akım sitometri analizleri

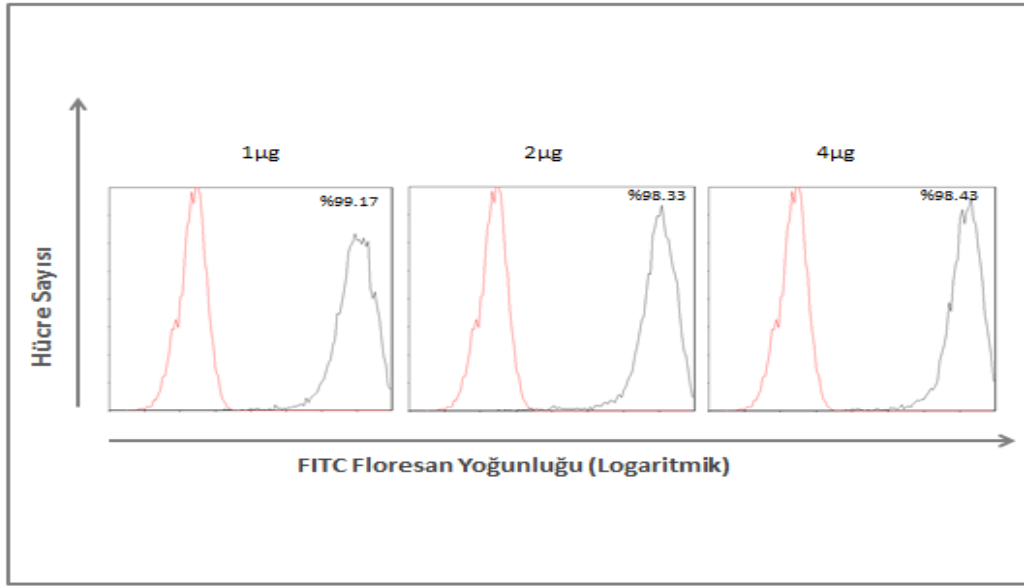
1B4.2 antikorundan elde edilen floresan yoğunluğu, izotip antikoru ile karşılaştırıldığında, 1B4.2 antikor konsantrasyonu artışına bağlı olarak elde edilen floresan yoğunluğunda artış olduğu görülmüştür. 1 µg 1B4.2 antikoru kullanıldığında floresan yoğunluğu artışı %45.85 olmuştur. 2 µg 1B4.2 antikoru kullanıldığında floresan yoğunluğu artışı %83.06 olmuştur. 4 µg 1B4.2 antikoru kullanıldığında floresan yoğunluğu artışı ise %94.12 olmuştur (Şekil 4.11). Bu sonuçlara göre 1B4.2 antikorunun akım sitometri yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.11. 1B4.2 Antikorumun HeLa hücresindeki VEGF-A ile reaktivitesinin akım sitometri ile analizi (izotip: kırmızı, 1B4.2 antikoru: siyah)

3B2.1 antikoru için akım sitometri analizleri

3B2.1 antikorumdan elde edilen floresan yoğunluğu izotip antikoru ile karşılaştırıldığında floresan yoğunluğunda artış olduğu görülmüştür. 1 µg 3B2.1 antikoru kullanıldığında floresan artışı %99.17 olmuştur. 2 µg 3B2.1 antikoru kullanıldığında floresan artışı %98.33 ve 4µg 3B2.1 antikoru kullanıldığında floresan artışı %98.33 olmuştur (Şekli 4.12). Bu sonuçlara göre 3B2.1 antikorumun akım sitometri yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.



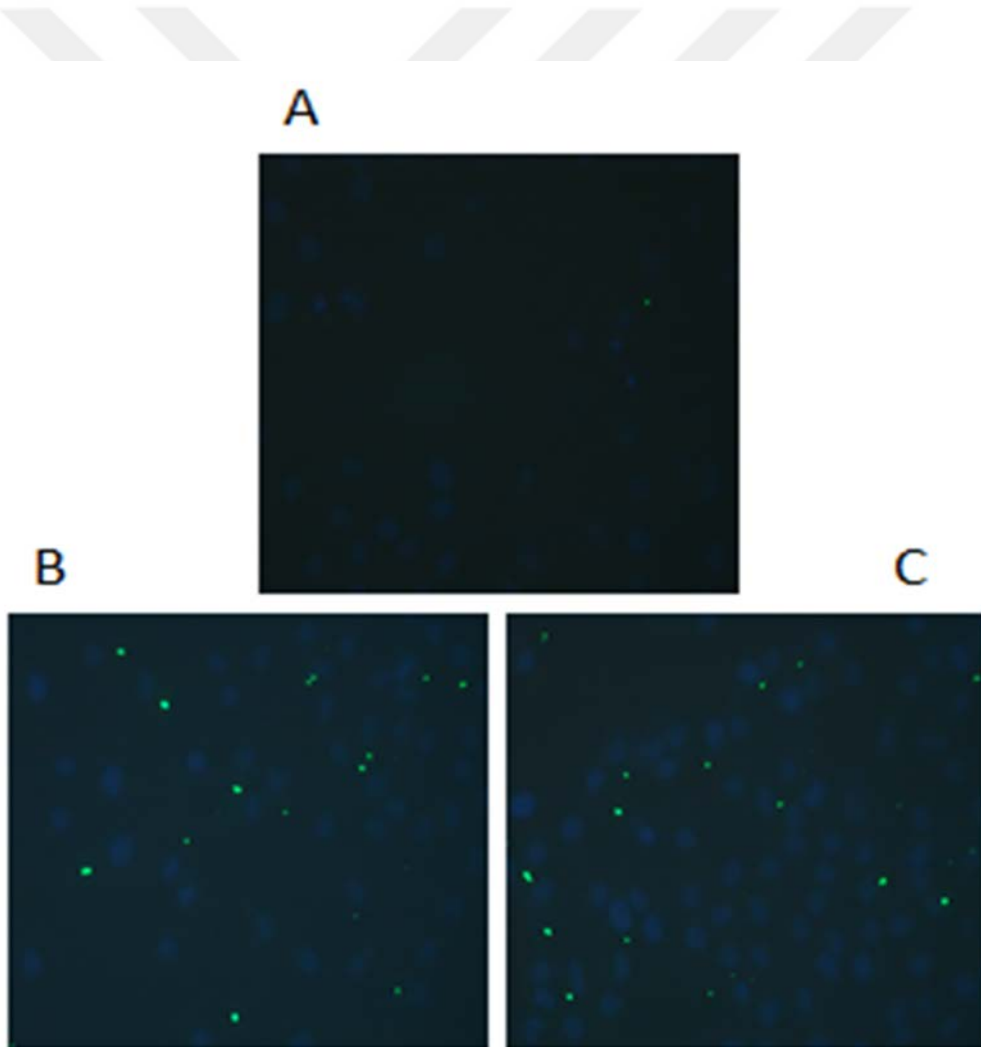
Şekil 4.12. 3B2.1 antikorunun HeLa hücreesindeki VEGF-A ile reaktivitesinin akım sitometri ile analizi (izotip: kırmızı, 3B2.1 antikoru: siyah)

4.7. Anti-VEGF-A Antikorlarının Hücre İçi Boyama Tekniği İçin Karakterizasyonu

Özel boyama slaytları (*chamber slide*) içinde çoğaltılan HeLa hücreleri %4 paraformaldehit ile 10 dk fikse edildi. %0,1 saponin ile hücre yüzeylerinde porlar açıldı. %5 BSA içeren permeabilizasyon solüsyonu ile bloking yapıldıktan sonra 2 µg/ml ve 4 µg/ml konsantrasyondaki 5D6.5, 3B2.1 ve 1B4.2 antikorları ile 4 °C'de 1 gece inkübe edildi. Kontrol grupları için uygun izotip antikorları kullanıldı. İkincil antikorlar olarak floresan boya ile işaretli anti-mouse IgG antikoru ve anti-mouse IgM antikorları, 1/300 oranında kullanıldı. Çekirdek boyaması yapabilmek için %0,5 oranında Hoechst boyası kullanıldı. Boyanmış hücrelerin bulunduğu lam üzerine lamel kapatılarak hücreler floresan mikroskopunda, 2 farklı dalga boyunu aynı anda gösterebilen filtre ile incelendi. Slaytlardaki mavi boyalı kısımlar hücrelerin çekirdeğini gösterirken, yeşil ile boyalı kısımlar VEGF-A proteinini göstermektedir. Örneklerin fotoğrafları 20X'lik objektif kullanılarak çekilmiştir.

5D6.5 antikorunun immünofloresan boyama için karakterizasyonu

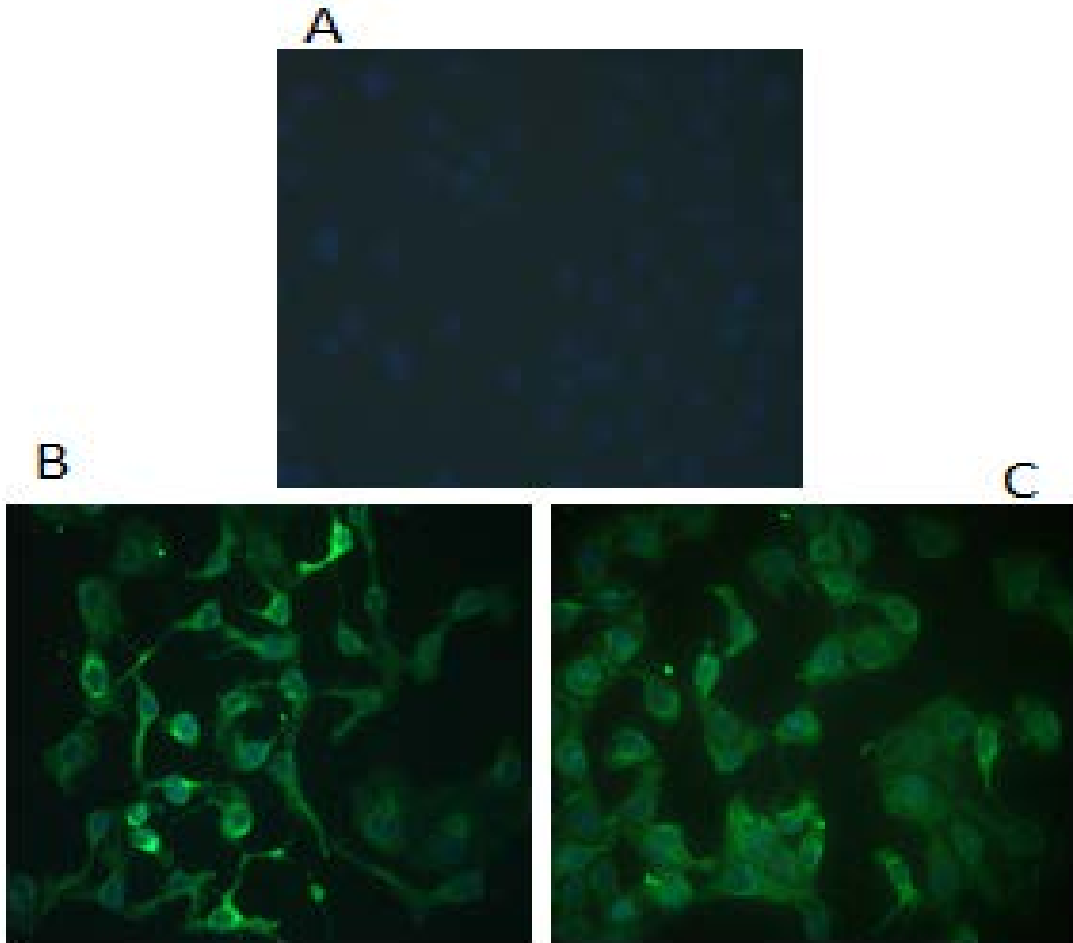
Kontrol grubu olarak izotip antikorunun kullanıldığı örnekte sadece mavi renkteki çekirdek boyaması görülmüştür (Resim 4.2/A). 2 µg/ml (Resim 4.2/B) ve 4 µg/ml (Resim 4.2/C) 5D6.5 antikorunu kullanan örneklerde de sadece Hoechst boyası ile çekirdekler mavi renkte boyanmıştır. Bu örneklerde preparattın bazı bölgelerinde görülen yeşil boyanmaların antijene spesifik olmayan kalıntı boya (*artefact*) olduğu düşünülmektedir. 2 µg/ml ve 4 µg/ml 5D6.5 antikorunu kullanılarak yapılan boyamalarda, kontrol grubuna göre bir farklılık görülmemesi bu antikorun hücre içi boyamada kullanmak için uygun bir antikor olmadığını göstermektedir.



Resim 4.2. 5D6.5 antikorunu ile yapılan immünofloresan boyama görüntüleri (A) kontrol grubu, (B) 2 µg/ml antikor kullanılarak yapılan boyama, (C) 4 µg/ml antikor kullanılarak yapılan boyama (objektif 20x)

1B4.2 antikorunun immünofloresan boyama için karakterizasyonu

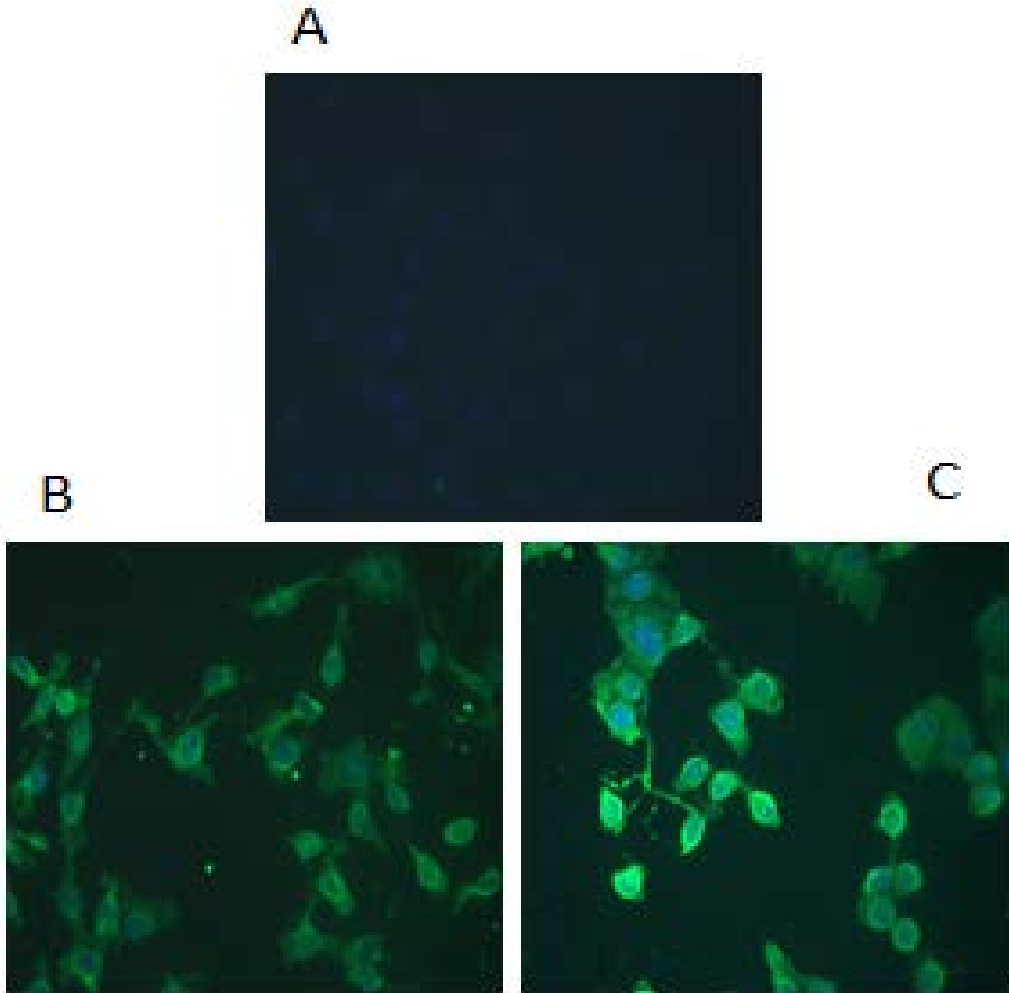
Kontrol grubu olarak izotip antikorunun kullanıldığı örnekte (Resim 4.3/A) sadece mavi renkteki çekirdek boyaması görülmüştür. 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Resim 4.3/B) ve 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Resim 4.3/C) 1B4.2 antikoru kullanılarak boyanan örneklerde ise mavi renkteki çekirdek boyamasının yanı sıra yeşil renk boyama olduğu da görülmüştür. Kontrol grubundan farklı olarak 1B4.2 antikoru ile boyanan örneklerde yeşil reklı floresan boyamanın olması bu antikoru hücre içi boyamada kullanılabileceğini göstermektedir.



Resim 4.3. 1B4.2 antikoru ile yapılan immünofloresan boyama görüntüleri (A) kontrol grubu, (B) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antikor kullanılarak yapılan boyama, (C) 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antikor kullanılarak yapılan boyama (objektif 20x)

3B2.1 antikorunun immünofloresan boyama için karakterizasyonu

Kontrol grubu olarak izotip antikorunun kullanıldığı örnekte (Resim 4.4/A) sadece mavi renkteki çekirdek boyaması görülmüştür. 2 $\mu\text{g/ml}$ (Resim 4.4/B) ve 4 $\mu\text{g/ml}$ (Resim 4.4/C) 3B2.1 antikoru kullanılarak boyanan örneklerde ise mavi renkteki çekirdek boyamasının yanı sıra yeşil renk boyama olduğu da görülmüştür. Kontrol grubundan farklı olarak 3B2.1 antikoru ile boyanan örneklerde yeşil rekli floresan boyamanın olması bu antikoru hücre içi boyamada kullanılabileceğini göstermektedir.

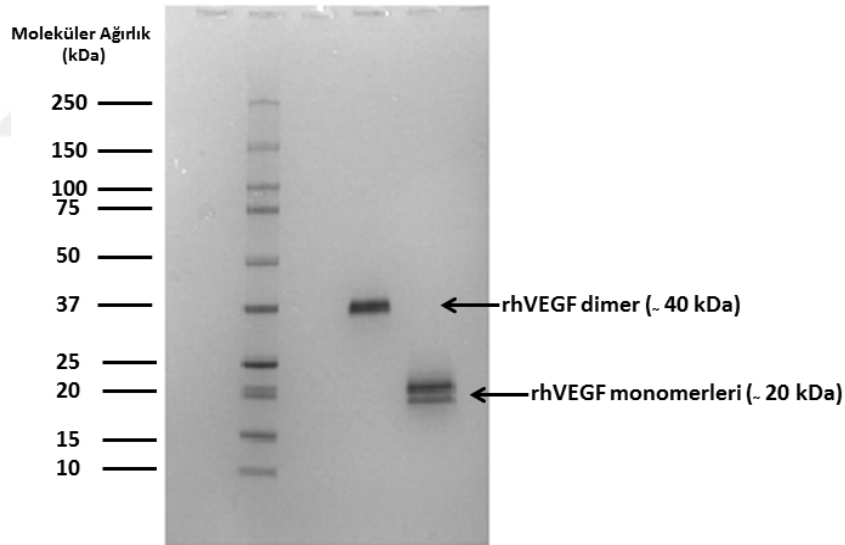


Resim 4.4. 3B2.1 antikoru ile yapılan immünofloresan boyama görüntüleri (A) kontrol grubu, (B) 2 $\mu\text{g/ml}$ antikor kullanılarak yapılan boyama, (C) 4 $\mu\text{g/ml}$ antikor kullanılarak yapılan boyama (objektif 20X)

4.8. Anti-VEGF-A Antikorlarının Western Blot İçin Karakterizasyonu

rhVEGF-A proteinin SDS-PAGE’de görüntülenmesi

Western blot çalışmalarında kullanılan rhVEGF-A proteininin saflığının ve moleküler ağırlığının belirlenebilmesi için rhVEGF-A proteini SDS-PAGE jelde yürütülmüştür. rhVEGF-A indirgenmiş ve indirgenmemiş koşullarda SDS-PAGE jele yüklenmiş 200 voltta yürütülmüştür. Jel coomassie brilliant blue boyası ile 20 dk boyanmış ve fazla boya yıkama solüsyonu ile uzaklaştırılmıştır. Jeldeki her kuyucuğa 1 µg rhVEGF-A proteini yüklenmiştir. Jelde indirgenmemiş koşullardaki rhVEGF-A proteini 37 kDa civarında görülürken, indirgenmiş haldeki protein, iki bant halinde 20 kDa (VEGF-A monomerleri) civarında görülmüştür (Şekil 4.13)



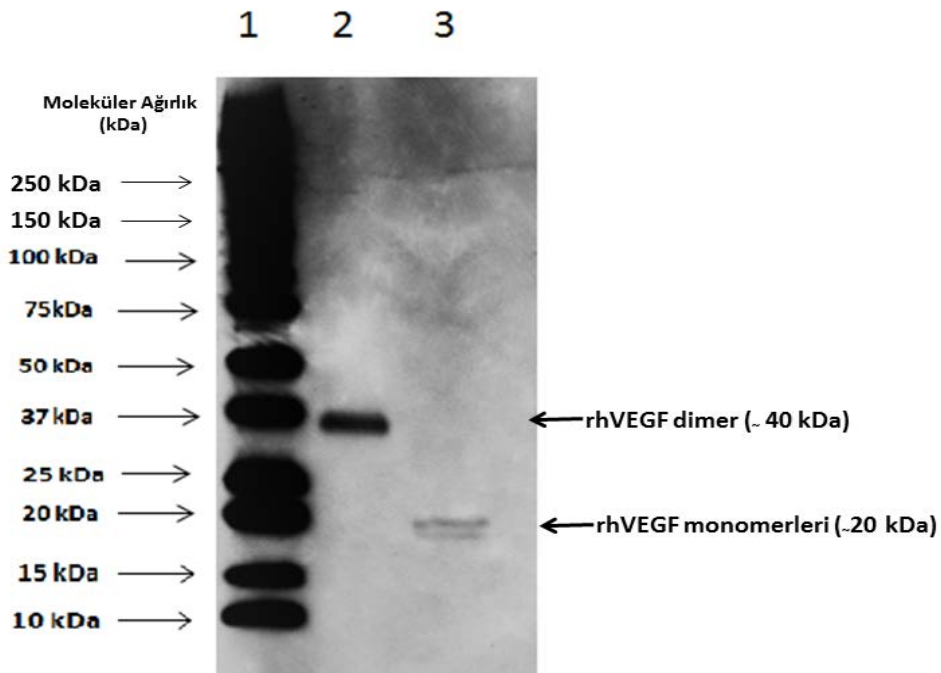
Şekil 4.13. rhVEGF-A proteinin SDS-PAGE jeldeki görüntüsü (1) belirteç (2) indirgenmemiş rhVEGF-A proteini (3) indirgenmiş rhVEGF-A proteini

5D6.5, 3B2.1, 1B4.2 antikorlarının western blot yönteminde uygunluğunu test etmek amacıyla SDS-PAGE jel’e 1 µg rhVEGF-A yüklendi ve jelde yürütüldü. Jel PVDF membrana tranfer edildi ve ardından bloklama işlemi yapıldı. 5D6.5, 3B2.1 ve 1B4.2 antikorlarının konsantrasyonları 4 µg/ml olacak şekilde %3 süt tozu içeren PBS içerisinde hazırlandı. Membranlar hazırlanan solüsyon içinde 1 gece 4 °C’de inkübe edildi. Yıkama işlemlerinin

ardından 5D6.5 ve 1B4.2 antikorları ile inkübe edilen membranlar, 1/5000 oranında HRP ile konjuge anti-mouse İgG ikincil antikor, 3B2.1 antikor ile inkübe edilen mebran ise HRP ile konjuge anti- mouse İgM ikincil antikor ile inkübe edildi. Yıkama işlemlerinin ardından ECL substrat kullanılarak, bantlar röntgen filmlerinde görüntülendi.

5D6.5'in Western blot için karakterizasyonu

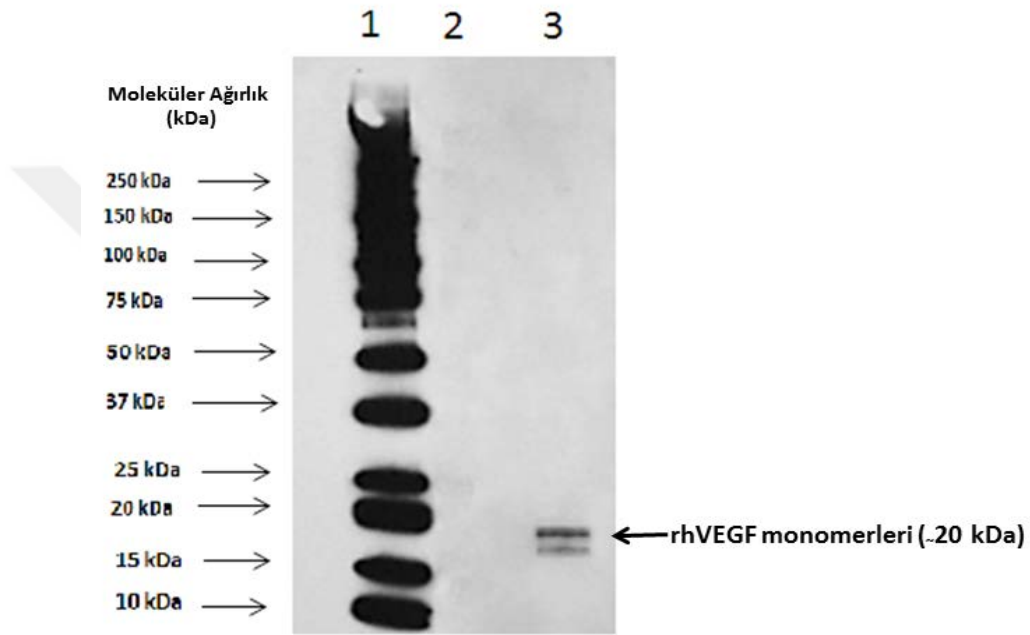
5D6.5 antikor, rhVEGF-A'nın hem indirgenmeyen hem de indirgenen formlarına bağlanma özelliği gösterdi. İndirgenmemiş formdaki rhVEGF-A yaklaşık 37 kDa civarında görülürken, indirgenmiş rhVEGF-A, çift bant halinde yaklaşık 20 kDa civarında (VEGF-A monomerleri) görüldü. Bu bantlar rhVEGF-A'nın SDS-PAGE jeldeki görüntüsü (Şekil 4.14) ile birebir aynı olarak görüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 5D6.5 antikor ile yapılan Western blot görüntüsü (1) belirteç (2) indirgenmemiş rhVEGF-A (3) indirgenmiş rhVEGF-A

3B2.1'in Western blot için karakterizasyonu

3B2.1 antikoruna ile yapılan western blot çalışmasında, 3B2.1 antikoruna rhVEGF-A proteininin indirgenmiş koşullardaki yaklaşık 20 kDa ağırlığındaki monomerlerine bağlanmıştır (Şekil 4.15). 3B2.1 antikorunun rhVEGF-A proteininin indirgenmemiş formuna bağlanamadığı görüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.15. 3B2.1 antikoruna ile yapılan Western blot görüntüsü (1) belirteç (2) indirgenmemiş rhVEGF-A (3) indirgenmiş rhVEGF-A

1B4.2'nin Western blot için karakterizasyonu

1B4.2 antikoruna kullanılarak yapılan western blot çalışmasında bu antikoruna rhVEGF-A proteininin hem indirgenmiş hem de indirgenmemiş formuna bağlanamadığı görüldü.

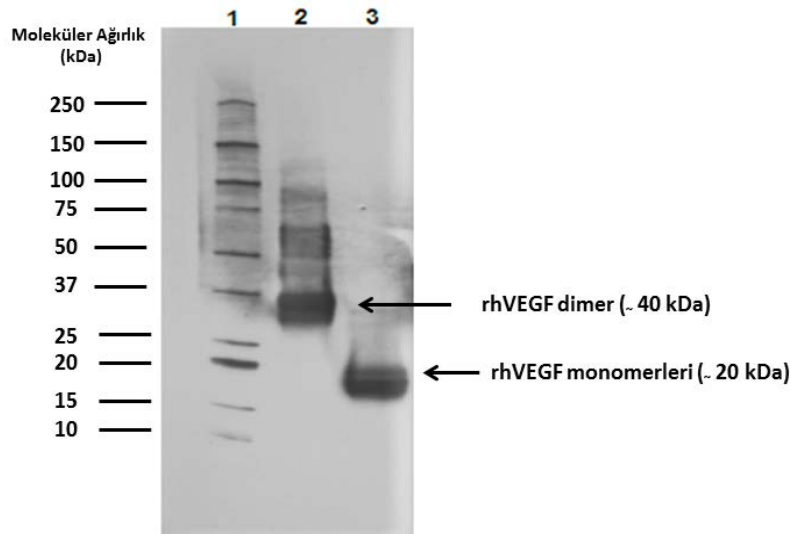
4.9. Hücre Lizatlarındaki VEGF-A'nın Anti-VEGF-A Antikorları ile Gösterilmesi

Anti VEGF-A antikorlarının hücrede sentezlenen VEGF-A'ya bağlanıp bağlanamadığını görebilmek için HeLa ve MCF-7 hücreleri kullanıldı. Bu hücreler RİPA liziz solüsyonu ile liziz edildikten sonra immünopresipitasyon için Bevacizumab lizatların içerisine ilave edildi. Bevacizumab VEGF-A'ya bağlandığı bilinen ve antianjiyogenik bir ajan olarak kanser

tedavisinde kullanılan İgG yapısında insanlaştırılmış bir monoklonal antikordur. Hücre lizatları ve Bevacizumab içeren grupların yanı sıra sadece RİPA liziz solüsyonu ve Bevacizumab içeren yani içerisinde hücre lizatı olmayan bir grup daha yapıldı. Örnekler Bevacizumab ile inkübe edildikten sonra protein A/G ile çöktürüldü. İnkübasyon sonrası Protein A/G ortamdan uzaklaştırıldı ve örnekler SDS-PAGE jelde yürütüldü. Jel PVDF membrana transfer edildi. Membran 5D6.5, 3B2.1, 1B4.2 antikorlarının 4 µg/ml konsantrasyonu ile inkübe edildi. Yıkama işlemlerinin ardından 1/2500 oranında ikicil antikor kullanılarak inkübasyon yapıldı. İnkübasyon sonrası yıkanan membranda ECL substrat kullanılarak görüntüleme işlemi yapıldı.

Bevacizumab'ın in-vitro şartlarda rhVEGF-A proteinine bağlanabilirliğinin gösterilmesi

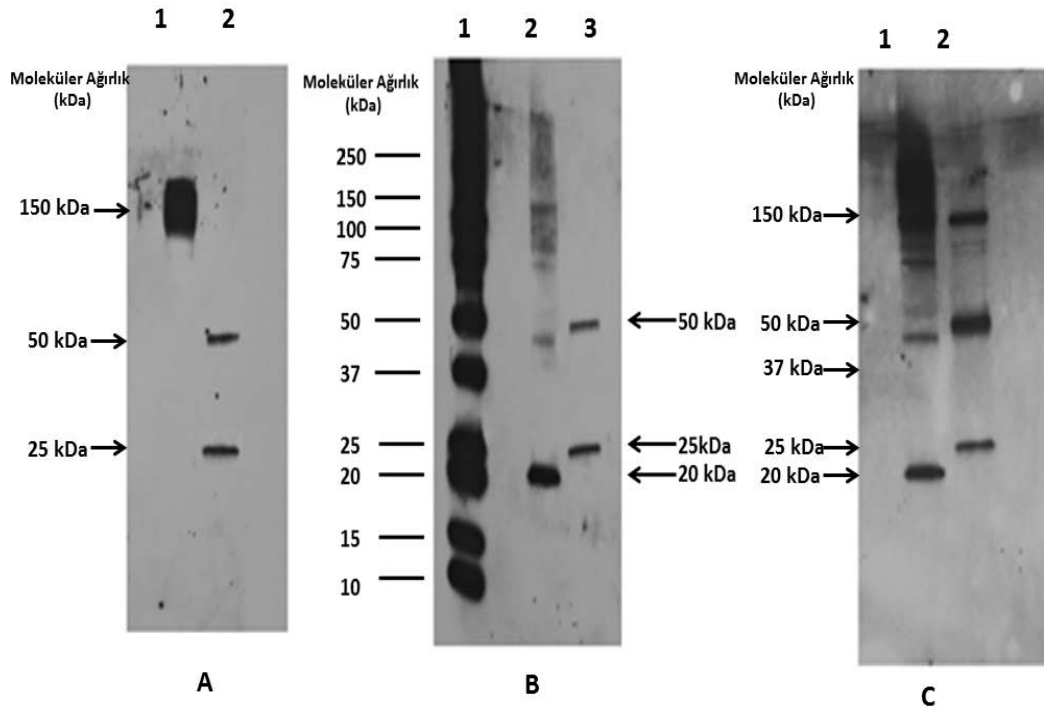
İmmünpresipitasyon işlemi için kullanılan Bevacizumab'ın VEGF-A'ya özgül olarak bağlandığı bilinmekle birlikte pozitif kontrol amaçlı olarak Bevacizumab'ın in-vitro koşullarda rhVEGF-A'ya bağlandığı gösterildi (Şekil 4.16). Bunun için rhVEGF-A proteinini SDS-PAGE jelde yürütüldükten sonra PVDF membrana transfer edildi. İlk olarak membran Bevacizumab ile inkübe edildi. Ardından HRP ile konjuge ikincil antikor ile inkübe edilen membrandaki bantlar kemilüminesans madde kullanılarak görüntülendi. rhVEGF-A proteinini indirgenememiş koşullarda yaklaşık 37 kDa ağırlığında görülürken, indirgenmiş koşullarda 20 kDa civarında görüldü (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Bevacizumab kullanılarak yapılan Western blot görüntüsü (1) belirteç (2) indirgenmemiş rhVEGF-A (3) indirgenmiş rhVEGF-A

5D6.5 antikorunun Western blot için karakterizasyonu

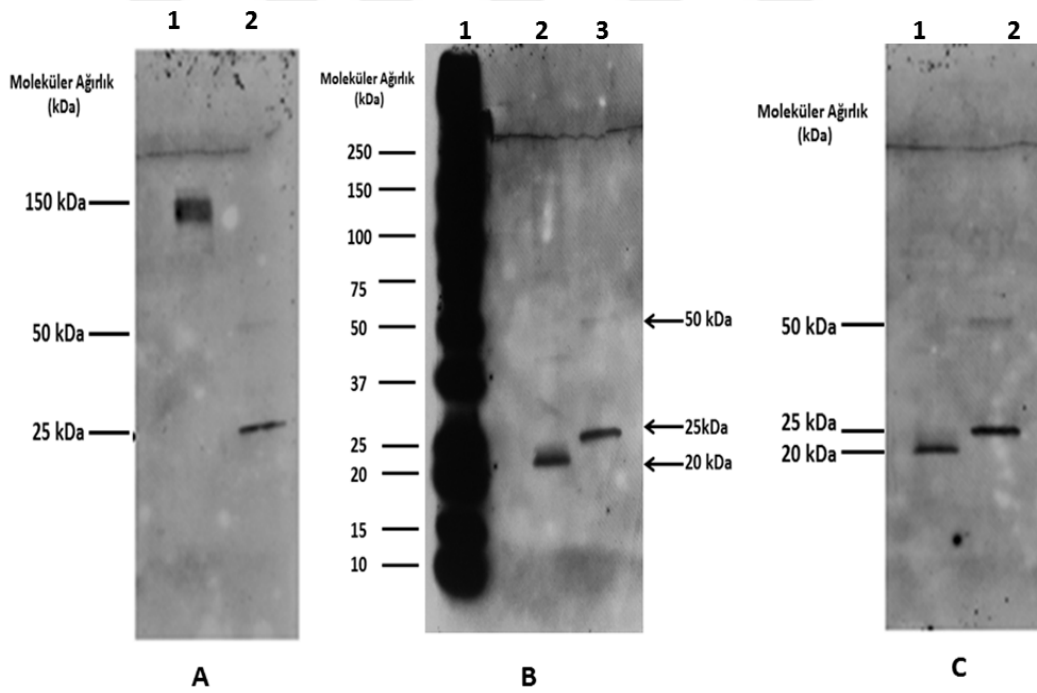
HeLa ve MCF-7 hücreleri kullanılarak yapılan Western blot çalışmasında, sadece RİPA solüsyonu ve Bevacizumab bulunan örnekte beklenildiği üzere sadece İgG antikor bantları görüldü (Şekil 4.17. A). Bu grupta indirgenmemiş koşullarda 150 kDa'luk bir İgG protein banti görülürken, indirgenmiş koşullarda 50 kDa'luk ağır zincir ve 25 kDa'luk hafif zincir bantları görüldü (Şekil 4.17. A). HeLa hücreleri kullanılan örnekte indirgenmemiş koşullarda yaklaşık 40 kDa (dimer VEGF-A) ve 20 kDa civarında bantlar görüldü. İndirgenmiş örnekte sadece immünprespitasyonda kullanılan Bevacizumab'dan kaynaklı 50 kDa ve 25 kDa'luk antikor bantları görüldü (Şekil 4.17. B). MCF-7 hücreleri kullanılan örnekte de HeLa hücrelerinde olduğu gibi indirgenmemiş koşullarda yaklaşık 40 kDa (dimer VEGF-A) ve 20 kDa bantlar görüldü. İndirgenmiş koşullarda Bevacizumab'dan kaynaklı 50 kDa ve 25 kDa ağırlığında protein bantları görüldü. (Şekil 4.17. C).



Şekil 4.17. Hücre lizatları ile 5D6.5 antikorunu kullanılarak yapılan Western blot görüntüsü (A) Sadece RİPA solüsyonu ve Bevacizumab içeren örnek (B) HeLa hücresi kullanılarak yapılan western blot görüntüsü (C) MCF-7 hücresi kullanılarak yapılan western blot görüntüsü. A ve C görüntülerinde 1 numara indirgenmemiş örnekleri gösterirken 2 numara indirgenmiş örnekleri göstermektedir. B görüntüsünde 1 numara belirteci, 2 numara indirgenmemiş örneği, 3 numara indirgenmiş örneği göstermektedir

1B4.2 antikorunun Western blot için karakterizasyonu

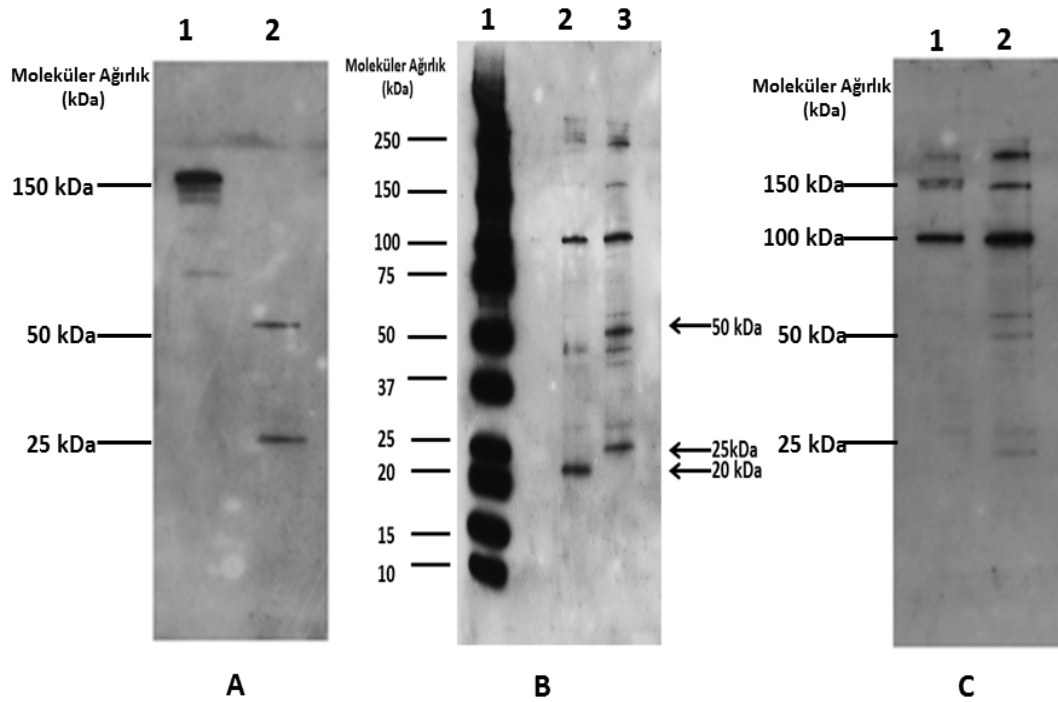
Sadece RiPA solüsyonu ve Bevacizumab olan örnekte indirgenmemiş koşullarda Bevacizumab'dan kaynaklı 150 kDa'luk bir IgG protein bantı görülürken, indirgenmiş koşullarda Bevacizumab'ın parçalanması sonucu meydana gelen 50 kDa'luk ağır zincir ve 25 kDa'luk hafif zincir bantları görüldü (Şekil 4.18. A). HeLa hücreleri kullanılan örnekte indirgenmemiş koşullarda yaklaşık 20 kDa civarında protein bantı görüldü. İndirgenmiş örnekte sadece Bevacizumab'dan kaynaklı 50 kDa ve 25 kDa'luk bantlar görüldü (Şekil 4.18. B). MCF-7 hücreleri kullanılan örnekte indirgenmemiş koşullarda yaklaşık 20 kDa civarında bant görülürken, indirgenmiş örnekte sadece Bevacizumab'dan kaynaklı 50 kDa ve 25 kDa ağırlığında bantlar görüldü (Şekil 4.18. C).



Şekil 4.18. Hücre lizatlarında 1B4.2 antikorunu kullanarak yapılan Western blot görüntüsü (A) Sadece RiPA solüsyonu ve Bevacizumab içeren örnek (B) HeLa hücresi kullanarak yapılan western blot görüntüsü (C) MCF-7 hücresi kullanarak yapılan western blot görüntüsü. A ve C görüntülerinde 1 numara indirgenmemiş örnekleri gösterirken 2 numara indirgenmiş örnekleri göstermektedir. B görüntüsünde 1 numara belirteci, 2 numara indirgenmemiş örneği, 3 numara indirgenmiş örneği göstermektedir

3B2.1 antikorunun Western blot için karakterizasyonu

Sadece RİPA solüsyonu ve Bevacizumab olan örnekte indirgenmemiş koşullarda 150 kDa'luk bir İgG protein bantı görülürken, indirgenmiş koşullarda 50 kDa ağır zincir ve 25 kDa hafif zincir bantları görüldü (Şekil 4.19. A). HeLa hücreleri kullanılan örnekte indirgenmemiş koşullarda yaklaşık 40 kDa (dimer VEGF-A) , 20 kDa ve 100 kDa (özgül olmayan bağlanma) civarında bantlar görüldü. İndirgenmiş örnekte Bevacizumab'dan kaynaklı 50 kDa ve 25 kDa'luk bantlar ile birlikte 100 kDa (özgül olmayan bağlanma) ağırlığında bantlar görüldü (Şekil 4.19. B). MCF-7 hücreleri kullanılan örnekte ise indirgenmemiş koşullarda özgül olmayan 100 kDa ağırlığında protein bantı ve indirgenmiş koşullarda Bevacizumab'dan kaynaklı 50 kDa ve 25 kDa ağırlığında bantlar ile 100 kDa ağırlığında protein bantı (özgül olmayan bağlanma) görüldü (Şekil 4.19. C)



Şekil 4.19. Hücre lizatlarında 3B2.1 antikorunu kullanarak yapılan Western blot görüntüsü (A) Sadece RİPA solüsyonu ve Bevacizumab içeren örnek (B) HeLa hücresi kullanılarak yapılan western blot görüntüsü (C) MCF-7 hücresi kullanılarak yapılan western blot görüntüsü. A ve C görüntülerinde 1 numara indirgenmemiş örnekleri gösterirken 2 numara indirgenmiş örnekleri göstermektedir. B görüntüsünde 1 numara belirteci, 2 numara indirgenmemiş örneği, 3 numara indirgenmiş örneği göstermektedir

Çizelge 4.5. Anti-VEGF-A antikorlarının in vitro yöntemlerde antijene bağlanabilirliğinin derecelendirilmesi (+++ İyi, ++ Orta, + Zayıf, - Başarısız)

	5D65	1B4.2	3B2.1
ELİSA	+++	++	+
AKIM SİTOMETRİ	+	++	+++
İMMÜNOFLORESAN BOYAMA	-	+++	+++
WESTERN BLOT	+++	+	+

5. TARTIŞMA

1971 yılında Folkman ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada tümör hücrelerinden salgılanan ve “tümör anjiyogenik faktör” (TAF) adı verilen bir molekül bulunmuştur. Bu molekülün tümör büyümesini anjiyogenez aracılığı ile hızlandırdığı görülmüş ve anjiyogenezin inhibisyonu sağlandığı takdirde tümör büyümesinin durdurulabileceği görüşü yine bu çalışma ile ortaya atılmıştır [137]. Ardından 1989 yılında Ferrara ve Henzel tarafından VEGF-A keşfedilmiş ve saflaştırılmıştır [50, 197]. VEGF-A endotel hücrelere spesifik, glikoprotein yapısında bir büyüme faktörüdür. Endotel hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonunda diğer anjiyogenez aktivatörlerinden çok daha önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca vasküler geçirgenliği de arttırmaktadır. Hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogenezde VEGF-A’nın başrol oyuncusu olması, onu anjiyogenez ile ilgili yapılan çalışmalarda hedef molekül haline getirmiştir [156].

Antikorlar bilim insanları için çok güçlü bir araştırma alanı olmuş ve olmaya da devam edecektir. Gelişen teknoloji ile birlikte artık klinikte de hem diagnostik hem de terapötik amaçlı olarak kullanılmaktadır [180]. Hem bilimsel amaçlı çalışmalarda hem de kanser tedavisinde antianjiyogenik bir ajan olarak kullanılmak üzere, VEGF-A molekülüne karşı monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. VEGF-A’ya karşı ilk monoklonal antikor 1992 yılında Ferrara ve arkadaşları tarafından hibridoma tekniği kullanılarak elde edilmiştir [198]. Daha sonraki süreçte bu antikor insanlaştırılmış ve faz çalışmaları tamamlandıktan sonra 2004 yılında FDA tarafından metaztatik koleraktal kanser tedavisinde kemoterapi ile birlikte kullanılmasına onay verilmiştir. Günümüzde Bevacizumab bazı kanser türlerinde kemoterapi ile birlikte antianjiyogenik bir ajan olarak kullanılırken, bazılarında ise palyatif tedavi amaçlı olarak kullanılmaya devam edilmektedir [154].

Çalışmamızda daha önceden Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Araştırma Laboratuvarında VEGF-A’ya karşı geliştirilen 3 farklı monoklonal antikorun moleküler ve immünolojik karakterizasyonu in vitro yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Bu antikorlar 5D6.5, 3B2.1 ve 1B4.2 olarak adlandırıldı. Antikorlar afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılmış ve saflaştırılan antikorların, ELİSA, akım sitometri, immünofloresan boyama ve Western blot yöntemlerindeki kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Çalışmamızda Anti-VEGF-A antikorlarının saflaştırılması aşamasında afinite kromatografisi yöntemi kullanılmıştır. Afinite kromatografisi monoklonal antikorların saflaştırılmasında en çok kullanılan yöntemlerden biridir [199]. Saflaştırma için öncelikle doğru kolonların seçilmesi gereklidir. İgG izotipinde olan antikorların saflaştırılmasında daha çok protein G kolonu kullanılmaktadır. Protein G, antikorların Fc kısmına bağlanır. pH değişimine bağlı olarak protein G ve Fc arasındaki bağ kopararak antikor saf halde elde edilir [12]. Bizim çalışmamızda da 5D6.5 ve 1B4.2 antikorları, İgG izotipinde antikorlar olduğu için bu antikorların saflaştırılmasında protein G kolonu kullanılmıştır. 3B2.1 antikoru İgM izotipinde olduğu için saflaştırma aşamasında, İgM izotipindeki antikorların saflaştırılmasında daha iyi sonuç veren thiophilic dolgu maddesi olan bir kolon seçilmiştir. Afinite kromatografisi ile elde edilen antikorların saflıklarına, SDS-PAGE yöntemi kullanılarak bakılmıştır. İgG izotipindeki antikorlar indirgenmemiş koşullarda 150 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. İndirgeyici bir ajan ile muamele edilip yüksek sıcaklığa maruz bırakılan antikorların ağır zincir ve hafif zincirleri arasındaki disülfüt bağları kopar ve molekül 52–58 kDa'luk γ ağır zincirler ve 23–28 kDa λ/κ hafif zincirler olmak üzere parçalara ayrılır. İgM izotipindeki antikorlar ise indirgenmemiş koşullarda pentamer halde 950 kDa'dur. İndirgenmiş koşullarda ise 72–83 kDa μ ağır zinciri, 23–28 kDa λ/κ hafif zinciri olmak üzere parçalara ayrılır [200, 201]. SDS PAGE jelde yürütülen 5D6.5 ve 1B4.2 antikorlarında indirgenmemiş koşullarda beklendiği gibi 150 kDa ağırlığında protein bantları, indirgenmiş koşullarda 50 kDa ve 25 kDa ağırlığında protein bantları görülmüştür. 3B2.1 antikorunun indirgenmiş formunda ise 75 kDa ve 25 kDa'luk bantlar ile 50 kDa -75 kDa arasında da bantlar görülmüştür. Bu yüzden başka bir İgM antikoru ile karşılaştırma yapabilmek için ticari olarak satılan İgM izotipinde bir antikor, SDS-PAGE jelde yürütülmüş ve bu antikorda da ekstra protein bantları olduğu görülmüştür.

Anti-VEGF-A antikorlarının ELİSA yönteminde kullanılabilirliğinin test edilebilmesi için yüksek protein bağlama kapasitesine sahip olan mikropalaklar rhVEGF-A ile kaplanmıştır. Kaplama yapılırken kullanılan rhVEGF-A'nın konsantrasyonu belirlenmesinde, daha önce VEGF-A'ya karşı antikor yapan araştırmacıların yayınlarından yola çıkılmıştır. Örneğin Sullivan ve arkadaşları VEGF-A'ya karşı geliştirdikleri monoklonal antikorları ELİSA yönteminde test ederken plakları 0,5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki rhVEGF-A ile kaplamış, Yan-Da Lai ve arkadaşları da yine VEGF-A'ya karşı geliştirdikleri antikorları test ederken

plakları 1 µg/ml (100 µl/kuyucuk) konsantrasyondaki rhVEGF-A ile kaplamışlardır. VEGF-A'ya karşı ilk monoklonal antikoru yapan Ferrara ve arkadaşları ise hibridoma klonlarını tararken 2 µg/ml (50 µl/ kuyucuk) konsantrasyondaki rhVEGF-A ile plakları kaplamışlardır [198, 202, 203]. Bizim çalışmamızda plaklar 0,5 µg/ml (100 µl/kuyucuk) konsantrasyondaki rhVEGF-A ile kaplanmıştır. 5D6.5, 3B2.1 ve 1B4.2 antikorlarının en yüksek konsantrasyonu 4 µg/ml olacak şekilde seri dilüsyonları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre antikor konsantrasyonu artışı ile doğru orantılı olarak optik dansite değerlerinin de arttığı görülmüştür. Optik dansite değeri artışı en çok 5D6.5 antikorunda meydana gelmiştir. Optik dansite artışında ikinci sırayı 1B4.2 antikoru, üçüncü sırayı da 3B2.1 antikoru almıştır. Bu sonuçlara göre ELİSA testinde bu üç antikorun, aynı konsantrasyonda farklı sonuçlar vermesinin nedeni olarak iki olasılık olduğu düşünülmüştür. Birincisi, üç antikorunda farklı epitoplara bağlanma durumu, ikinci ise aynı epitopa bağlanıp farklı afiniteye sahip olma durumudur.

Her antikor ELİSA testinde kullanmak için uygun olmayabilir. Bunun nedenlerinden biri, antijen ile plakların tabanına kaplama yapılırken, antijenin üç boyutlu yapısı değişebilir. Bu yüzden antikor spesifik epitopuna bağlanamaz. Diğer bir neden ise proteinin üç boyutlu yapısı düşünüldüğünde, antikorun bağlandığı spesifik epitop, proteinin daha internal kısmında kalmış olabilir. Böyle bir durumda antikor epitopuna bağlanamayabilir. Bu yüzden ELİSA testi yaparken uygun antikor seçimi önemlidir.

Bu çalışmada 5D6.5 ve 1B4.2 antikorları, 3B2.1 antikoruna oranla daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek optik dansite değerlerine ulaşmıştır. Bu yüzden ELİSA testinde bu antikorları kullanırken tercih sırasında öncelik 5D6.5 ve 1B4.2 antikorlarına verilebilir.

Çalışmamızda Anti-VEGF-A antikorlarının hücre içi boyamalarda, akım sitometri ve immünofloresan boyama yönteminde kullanımını test etmek için HeLa (serviks kanseri) hücre serisi kullanılmıştır. Bu hücre serisi VEGF-A üretmekle birlikte pek çok çalışmada, serviks kanserinde VEGF-A gen ifadenmesinin artış ve azalışına neden olan koşulların veya moleküllerin araştırılmasında kullanılmaktadır[204-206]. Bizim çalışmamızda akım sitometri yönteminde HeLa hücrelerinde hücre içi boyama yapabilmek için antikorların 1 µg, 2 µg ve 4 µg konsantrasyonu kullanılmıştır. Analiz işlemi için izotip kontrolün floresan

yoğunluğu ile karşılaştırma yapılmıştır. 5D6.5 antikorunu kullanılarak boyanan örneklerde, antikor konsantrasyonu artışına bağlı olarak floresan yoğunluğu artmış olsa da, artış oranı en yüksek konsantrasyon olan 4 µg'da bile %9.03'de kalmıştır. 1B4.2 antikorunu ile boyanan örneklerdeki floresan yoğunluğu artışı konsantrasyona bağlı olarak artmış, floresan yoğunluğu 4 µg konsantrasyonda %94.12 oranında görülmüştür. 3B2.1 antikorunun kullanılan üç konsantrasyonunda da meydana gelen floresan artışı %90'nın üzerinde olmuştur. Bu sonuçlar 5D6.5 antikorunun hücre içindeki VEGF-A'ya bağlanma oranının diğer antikorlara göre çok daha düşük olduğunu göstermektedir. İndirek immüno floresan boyamada da akım sitometrisindeki ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada da 5D6.5 antikorunu hücre içinde bulunan VEGF-A proteinine bağlanamazken, diğer iki antikor hücre içindeki VEGF-A proteinine bağlanabildiği görülmüştür.

Chen ve arkadaşları VEGF-A'ya karşı yaptıkları monoklonal antikorları western blot yönteminde test ederken rekombinant VEGF-A proteinini kullanmış ve antikor konsantrasyonunu 5 µg/ml olarak belirlemişlerdir [207]. Bizim çalışmamızda da Anti-VEGF-A antikorlarının Western blot yönteminde kullanılabilirliğini test edilebilmek için ilk olarak antikorların rhVEGF-A proteinine bağlanıp bağlanmadığı araştırılmıştır. Western blot çalışmalarında bazı durumlarda antikorların bağlandığı epitop proteinin üç boyutlu yapısı bozularak yani protein denatüre edilerek ortaya çıkarılabilir. Bazı durumlarda ise proteinlerin üç boyutlu yapısı bozulduğunda antikorun bağlandığı epitop da bozulabilir. Bu yüzden Western blot çalışmalarımızda, örneklerimizi denatüre edilmiş ve denatüre edilmemiş bir şekilde test ettik. Elde edilen sonuçlara göre 5D6.5 antikorunu rhVEGF-A proteinin hem denatüre edilmiş, hem de edilmemiş yapısına bağlanabilirken, 3B2.1 antikorunu sadece denatüre formdaki rhVEGF-A proteinine bağlanabilmiştir. 1B4.2 antikorunu ise rhVEGF-A proteinine bağlanamamıştır. Rekombinant proteinler ile hücrede sentezlenen naif proteinler arasında bazı yapısal farklılıklar olabilmektedir. Bu yüzden çalışmamızda hücre lizatları da kullanılarak antikorların naif proteinlere bağlanabilirliği de test edilmiştir. Bunun için HeLa hücresi ile birlikte, VEGF-A ürettiği bilinen bir meme kanseri hücre serisi olan MCF-7 hücre serisi kullanılmıştır [208, 209]. Western blot çalışmasında hücre içerisindeki VEGF-A'yı daha saf bir şekilde gösterebilmek için ilk olarak immünpresipitasyon yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda rhVEGF-A proteinini kullanılarak yapılan Western blot sonuçları ve hücre lizatları kullanılarak yapılan Western blot

sonuçları arasında farklılıklar olduğu görülmüştür. Örneğin 5D6.5 antikoru rekombinant proteinde hem indirgenmiş hem de indirgenmemiş formlardaki VEGF-A'ya bağlanırken, HeLa ve MCF-7 hücre lizatlarında sadece indirgenmemiş formdaki ~40 kDa'luk VEGF-A'ya bağlanmıştır. Kullanılan her iki hücre serisinde de indirgenmemiş formda yaklaşık ~20 kDa ağırlığında bantlar olduğu da görülmüştür. 1B4.2 antikoru rekombinant proteine bağlanamazken, hücre lizatlarının indirgenmemiş formunda, 5D6.5 antikorunda da olduğu gibi ~20 kDa ağırlığında protein bantları görülmüştür. 3B2.1 antikoru rekombinant proteinin sadece indirgenmiş formuna bağlanabilirken, HeLa hücre lizatında indirgenmemiş formda yaklaşık ~40 kDa'luk (VEGF-A) bantı ile yine diğer antikorlarda olduğu gibi indirgenmemiş formda ~20 kDa'luk bir bant görülmüştür. MCF-7 hücrelerinde her iki koşulda da VEGF-A proteinin moleküler ağırlığına uygun bantlar görülmemiştir. VEGF-A dimerik yapıda bir proteindir. 20-22 kDa büyüklüğünde iki monomerin disülfid bağları ile bağlanması sonucu 37-42 kDa ağırlığında dimerik bir protein meydana gelir. Aktif formu dimerik halidir [42, 49, 50]. VEGF-A ile yapılan bazı western blot çalışmalarında 20-22 kDa'luk bantlar ile birlikte 37-42 kDa'luk bantlar aynı örnekte birlikte görülebilmektedir. Örneğin Kitaguchi ve arkadaşlarının ratların akciğerinde endoplazmik retikulum stresinin araştırılması ile ilgili yapmış oldukları bir çalışmada, örneklerin SDS-PAGE jele yükleme koşulları hakkında bir bilgi verilmemekle birlikte aynı örnekte VEGF-A proteininin hem dimer (42 kDa) hem de monomer (21 kDa) formları gösterilmiştir[210]. Bizim çalışmamızda ise test ettiğimiz üç antikorda da indirgenmemiş koşullarda yaklaşık ~20 kDa'luk bantlar görüldü. Western blot işleminden önce VEGF-A proteinine özgül olarak bağlanan Bevacuzumab ile immünprespitasyon yapılması, VEGF-A'nın monomer halinin 20-22 kDa olması ve de üç antikordan da benzer sonuçların elde edilmesi, hücre lizatlarında görülen ~20 kDa'luk bantların hücreler içindeki VEGF-A monomerleri olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmalar neticesinde, VEGF-A'ya karşı yeni geliştirilmiş olan bu üç antikorun moleküler ve immünolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Bu antikorların, antikor antijen reaksiyonuna dayanan ELİSA, immünofloresan, akım sitometrisi ve Western blot yöntemlerinde hangi koşullarda kullanılabileceği anlaşılmıştır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

VEGF-A anjiyogenezi tetikleyen en önemli büyüme faktörüdür. Patolojik bazı hastalıklarda anjiyogenezin artıyor olması VEGF-A'yı önemli bir hedef haline getirmiştir. 1989 yılında keşfedilmesinden sonra VEGF-A hakkında binlerce araştırılma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. VEGF-A'ya karşı özgül olarak geliştirilen antikorlar, yapılan bu bilimsel çalışmalarda kullanılan önemli birer araç olmuştur. Hatta bu antikorların bazıları, gelişmiş teknolojik yöntemler ile modifiye edilerek (insanlaştırılarak) anjiyogenezin inhibisyonunda tedavi amaçlı olarak günümüzde kullanılmaktadır. Bu çalışmada VEGF-A'ya karşı geliştirilmiş üç yeni monoklonal antikorun moleküler ve immünolojik karakterizasyonu in vitro yöntemler kullanılarak araştırıldı.

5D6.5 antikorunun karakterizasyonu sonucu elde edilen bilgiler şöyledir.

ELİSA yönteminde düşük konsantrasyonlarda bile yüksek optik dansite değerleri vermektedir. Bundan dolayı ELİSA yönteminde kullanılabileceği düşünülmektedir.

İndirek immünfloresan boyama yönteminde 5D6.5 antikoru ile boyanan örnekler ve kontrol grubu arasında herhangi bir fark görülmemiştir. Bu yüzden indirek immünfloresan boyama yönteminde kullanımı için uygun olmadığı düşünülmektedir.

Akım sitometri yönteminde antikor konsantrasyonu artışına bağlı olarak floresan yoğunluğunda artış olduğu görülmüşse de bu artış çok düşük düzeyde kalmıştır. Akım sitometri yönteminde kullanımı uygun olmayabilir.

Western blot yönteminde rhVEGF-A proteinine bağlanabilmiştir. HeLa ve MCF-7 hücre lizatlarında ise sadece indirgenmemiş örneklerde yaklaşık 40 kDa ve 20 kDa'luk bantlar görülmüştür. Western blot çalışmalarında kullanımının uygun olduğu düşünülmektedir.

1B4.2 antikorunun karakterizasyonu sonucu elde edilen bilgiler şöyledir.

Antikor konsantrasyonu artışı ile doğru orantılı olarak optik dansite değerleri de artmıştır. ELİSA yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

İndirek immünfloresan boyama yönteminde, 1B4.2 antikorunun 2 µg/ml ve 4 µg/ml konsantrasyonları hücre içindeki VEGF-A'ya bağlanabilmiştir. İndirek immünfloresan boyama yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Akım sitometri yönteminde antikor konsantrasyonu artışına bağlı olarak floresan yoğunluğunda da artış olduğu görülmüştür. Bu yüzden 1B4.2 antikorun akım sitometrisi yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Western blot yönteminde rhVEGF-A'ya bağlanamamıştır. HeLa ve MCF-7 hücre lizatlarında ise sadece indirgenmemiş örneklerde yaklaşık 20 kDa'lık monomer VEGF-A olduğu düşünülen protein bantları görülmüştür. Western blot yönteminde antijene bağlanabilirliğinin zayıf olduğu düşünülmektedir.

3B2.1 antikorunun karakterizasyonu sonucu elde edilen bilgiler şöyledir.

Antikor konsantrasyonu artışı ile doğru orantılı olarak optik dansite değerleri de artmıştır. ELİSA yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

İndirek immünfloresan boyama yönteminde, 3B2.1 antikorunun 2 µg/ml ve 4 µg/ml konsantrasyonları hücre içindeki VEGF-A'ya bağlanabilmiştir. İndirek immünfloresan boyama yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Akım sitometrisi yönteminde, 3B2.1 antikoru ile boyanan örneklerdeki floresan yoğunluk artışı, izotip kontrole göre yüksektir. Bu yüzden 3B2.1 antikorun akım sitometrisi yönteminde kullanılmasının uygun olduğu düşünülmektedir.

Western blot yönteminde rhVEGF-A'nın sadece indirgenmiş formuna bağlanabilmektedir. MCF-7 hücrelerinde ise indirgenmiş ve indirgenmemiş formlarında protein bantı görülememiştir. HeLa hücre lizatlarında ise indirgenmemiş örneklerde 40 kDa ve 20 kDa'luk bantlar görülmüştür. Western blot yönteminde antijene bağlanabilirliğinin zayıf olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre bu üç anti-VEGF-A antikorun, deneysel çalışmalarda hangi in-vitro yöntemlerde kullanılabileceği öğrenilmiş oldu. Şimdiye kadar yaptığımız bu çalışmaların pek çoğunda görüldü ki bu antikorlar VEGF-A proteinine özgül olarak

bağlanabiliyor. Bu durum, bu antikorların potansiyel bir antianjiyogenik ajan olabileceğini düşündürmektedir. Bu düşünce doğrultusunda bundan sonraki aşamalarda bu antikorların in vitro ve in vivo koşullarda antianjiyogenik etkisinin araştırılması planlanmaktadır. İn vitro olarak yapılması planlanan çalışmalar arasında bu antikorların nötralizan etkisinin araştırılması bulunmaktadır. Bu doğrultuda VEGF-A reseptörü (VEGFR-2) eksprese eden ve VEGF-A uyarımına bağlı olarak proliferasyon yapan hücre serileri olan endotel hücre serileri kullanılarak, antikorların bu hücrelerin proliferasyonuna etkileri araştırılabilir. İn vitro çalışmalarda nötralizan etkisi olduğu gösterilen antikorların, bir sonraki aşama olan in vivo çalışmalarda, tümör anjiyogenezi üzerine etkileri araştırılabilir. İn vivo çalışmalarda farelerde tümör modelleri oluşturulabilir ve anti-VEGF-A antikorları verilen farelerdeki tümörün büyüme ve metastaz özellikleri incelenebilir. Bu çalışmalardan elde edilecek sonuçlar doğrultusunda, bu antikorların antianjiyogenik özellikleri hakkında bilgiler elde edilmiş olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Roskoski, R. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 62(3), 179-213.
2. Gacche, R. N., ve Meshram, R. J. (2014). Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1846(1), 161-179.
3. Yamazaki, Y., ve Morita, T. (2006). Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular Diversity*, 10(4), 515-527.
4. McFee, R. M., Rozell, T. G., ve Cupp, A. S. (2012). The balance of proangiogenic and antiangiogenic VEGFA isoforms regulate follicle development. *Cell and Tissue Research*, 349(3), 635-647.
5. Takahashi, H., ve Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 109(3), 227-241.
6. Otrrock, Z. K., Makarem, J. A., ve Shamseddine, A. I. (2007). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 38(3), 258-268.
7. Vempati, P., Popel, A. S., ve Mac Gabhann, F. (2014). Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Reviews* 25(1), 1-19.
8. Pinto, M. P., Sotomayor, P., Carrasco-Avino, G., Corvalan, A. H., ve Owen, G. I. (2016). Escaping Antiangiogenic Therapy: Strategies Employed by Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 17(9).
9. Li, Y. L., Zhao, H., ve Ren, X. B. (2016). Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? *Cancer Biology Medicine*, 13(2), 206-214.
10. Chu, B. F., ve Otterson, G. A. (2016). Incorporation of Antiangiogenic Therapy Into the Non-Small-Cell Lung Cancer Paradigm. *Clinical Lung Cancer*, 17(6), 493-506.
11. McMahon, G. (2000). VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist*, 5 Suppl 1, 3-10.
12. T Mak, Tak W., ve Saunders, M. (2004). *The Immune Response Basic and Clinical Principles* (Birinci Baskı). USA: ELSEVIER Academic Press, 94-108.13.
13. Pier, GB., Lyczak, JB., ve Wetzler, ML. (2004). *Immunology, Infection and Immunity* (Birinci Baskı). USA: ASM Pres, 113-145.

14. Poul, WE. (2003). *Fundamental Immunology* (Beşinci Baskı). USA: LIPPINCOTT WILLIAMS and WOLTERS KLUWER, 125-187.
15. Abbas, AK., Lichtman, AH., ve Pillai, S. (2012). *Cellular and Molecular Immunology* (Yedinci Baskı). USA: ELSEVIER Saunders, 89-107.
16. Ustaçelebi, Ş. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (Birinci Baskı). TÜRKİYE: GÜNEŞ Kitapevi, 137-142.
17. Stanfield, R. L., ve Wilson, I. A. (2014). Antibody Structure. *Microbiol Spectr*, 2(2).
18. Male, D., Brestoff J., Roth, DB., ve Roitt, I. (2006). *Immunology* (Yedinci Baskı). USA: ELSEVIER, 59-86.
19. Stites, D., Terr Al., ve Parslow, TG. (1997). *Medical Immunology* (Dokuzuncu Baskı) USA: APPLETON and LANGE, 95-114.
20. Mix, E., Goertsches, R., ve Zett, U. K. (2006). Immunoglobulins--basic considerations. *Journal of Neurology*, 253 Suppl 5, V9-17.
21. Goldsby, RA., Kindt, TJ., ve Osborne, BA. (2000). *Kuby Immunology* (Dördüncü Baskı). USA: FREEMAN, 83-113.
22. Janeway, CA., Travers, P., Walport, Mark., ve Shlomchik, MJ. (2001). *Immunobiology* (Beşinci Baskı). USA: GARLAND PUBLISHING, 114-144.
23. Parham, P. (2005). *The Immune System* (İkinci Baskı). USA: GARLAND SCIENCE, 37-45.
24. Schroeder, H. W., Jr., ve Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S41-52.
25. Salemi, S., Markovic, M., Martini, G., ve D'Amelio, R. (2015). The expanding role of therapeutic antibodies. *International Reviews of Immunology*, 34(3), 202-264.
26. Klein, J. (1990). *Immunology*. USA: Blackwell Scientific Publication, 102-159.
27. Sela-Culang, I., Kunik, V., ve Ofran, Y. (2013). The structural basis of antibody-antigen recognition. *Frontiers in Immunology* 4, 302.
28. Sela-Culang, I., Ofran, Y., ve Peters, B. (2015). Antibody specific epitope prediction-emergence of a new paradigm. *Current Opinion in Virology*, 11, 98-102.
29. Forsstrom, B., Axnas, B. B., Rockberg, J., Danielsson, H., Bohlin, A., ve Uhlen, M. (2015). Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*, 10(3), e0121673.
30. Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25(4), 581-611.

31. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., ve Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal*, 13(1), 9-22.
32. Carmeliet, P., ve Collen, D. (2000). Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 902, 249-262; discussion 262-244.
33. Ng, Y., Krilleke, D., ve Shima, D. (2006). VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research*, 312(5), 527-537.
34. Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., ve Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling — in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 359-371.
35. Takahashi, S. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 34(12), 1785-1788.
36. Stuttfeld, E., ve Ballmer-Hofer, K. (2009). Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*, 61(9), 915-922.
37. Kipryushina, Y. O., Yakovlev, K. V., ve Odintsova, N. A. (2015). Vascular endothelial growth factors: A comparison between invertebrates and vertebrates. *Cytokine Growth Factor Reviews*, 26(6), 687-695.
38. Goel, H. L., ve Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 871-882.
39. Ellis, L. M., ve Hicklin, D. J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer*, 8(8), 579-591.
40. Smith, G. A., Fearnley, G. W., Harrison, M. A., Tomlinson, D. C., Wheatcroft, S. B., ve Ponnambalam, S. (2015). Vascular endothelial growth factors: multitasking functionality in metabolism, health and disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(4), 753-763.
41. Crafts, T. D., Jensen, A. R., Blocher-Smith, E. C., ve Markel, T. A. (2015). Vascular endothelial growth factor: Therapeutic possibilities and challenges for the treatment of ischemia. *Cytokine*, 71(2), 385-393.
42. Hoeben, A. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews*, 56(4), 549-580.
43. Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., ve Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587), 983-985.
44. Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 29(6), 789-791.

45. Ferrara, N. (2011). From the discovery of vascular endothelial growth factor to the introduction of avastin in clinical trials - an interview with Napoleone Ferrara by Domenico Ribatti. *The International Journal of Developmental Biology* 55(4-5), 383-388.
46. Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*, 2(10), 795-803.
47. Connolly, D. T. (1991). Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *Journal of Cellular Biochemistry*, 47(3), 219-223.
48. Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J. J., Siegel, N. R., Leimgruber, R. M., ve Feder, J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(5), 1470-1478.
49. Gospodarowicz, D., Abraham, J. A., ve Schilling, J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86(19), 7311-7315.
50. Ferrara, N., ve Henzel, W. J. (2012). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. 1989. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(3), 540-547.
51. Fearnley, G. W., Smith, G. A., Abdul-Zani, I., Yuldasheva, N., Mughal, N. A., Homer-Vanniasinkam, S., Kearney, M. T., Zachary, I. C., Tomlinson, D. C., Harrison, M. A., Wheatcroft, S. B., ve Ponnambalam, S. (2016). VEGF-A isoforms program differential VEGFR2 signal transduction, trafficking and proteolysis. *Biology Open*, 5(5), 571-583.
52. Bates, D. O., Mavrou, A., Qiu, Y., Carter, J. G., Hamdollah-Zadeh, M., Barratt, S., Gammons, M. V., Millar, A. B., Salmon, A. H., Oltean, S., ve Harper, S. J. (2013). Detection of VEGF-A(xxx)b isoforms in human tissues. *PLoS One*, 8(7), e68399.
53. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., ve Abraham, J. A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(18), 11947-11954.
54. Harper, S. J., ve Bates, D. O. (2008). VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature Reviews Cancer*, 8(11), 880-887.
55. Finley, S. D., ve Popel, A. S. (2012). Predicting the effects of anti-angiogenic agents targeting specific VEGF isoforms. *The AAPS Journal*, 14(3), 500-509.
56. Hilmi, C., Guyot, M., ve Pages, G. (2012). VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *Journal of Nucleic Acids*, 2012, 162692.

57. Dehghanian, F., Hojati, Z., ve Kay, M. (2014). New Insights into VEGF-A Alternative Splicing: Key Regulatory Switching in the Pathological Process. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 6(4), 192-199.
58. Arcondeguy, T., Lacazette, E., Millevoi, S., Prats, H., ve Touriol, C. (2013). VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Research*, 41(17), 7997-8010.
59. Bates, D. O. (2011). An unexpected tail of VEGF and PlGF in pre-eclampsia. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1576-1582.
60. Bates, D. O., Cui, T. G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D., Peat, D., Gillatt, D., ve Harper, S. J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 62(14), 4123-4131.
61. Lodomery, M. R., Harper, S. J., ve Bates, D. O. (2007). Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Letters*, 249(2), 133-142.
62. Biselli-Chicote, P. M., Oliveira, A. R., Pavarino, E. C., ve Goloni-Bertollo, E. M. (2012). VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 138(3), 363-370.
63. Peiris-Pages, M. (2012). The role of VEGF 165b in pathophysiology. *Cell Adhesion and Migration*, 6(6), 561-568.
64. Qiu, Y., Hoareau-Aveilla, C., Oltean, S., Harper, S. J., ve Bates, D. O. (2009). The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 6), 1207-1213.
65. Rennel, E. S., Hamdollah-Zadeh, M. A., Wheatley, E. R., Magnussen, A., Schuler, Y., Kelly, S. P., Finucane, C., Ellison, D., Cebe-Suarez, S., Ballmer-Hofer, K., Mather, S., Stewart, L., Bates, D. O., ve Harper, S. J. (2008). Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice. *European Journal of Cancer*, 44(13), 1883-1894.
66. Woolard, J., Wang, W. Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., Cui, T. G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J. D., Whittles, C. E., Mushens, R. E., Gillatt, D. A., Ziche, M., Harper, S. J., ve Bates, D. O. (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Research*, 64(21), 7822-7835.
67. Woolard, J., Bevan, H. S., Harper, S. J., ve Bates, D. O. (2009). Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation*, 16(7), 572-592.

68. Muhl, L., Moessinger, C., Adzemovic, M. Z., Dijkstra, M. H., Nilsson, I., Zeitelhofer, M., Hagberg, C. E., Huusko, J., Falkevall, A., Yla-Herttuala, S., ve Eriksson, U. (2016). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-B and its receptor (VEGFR1) in murine heart, lung and kidney. *Cell and Tissue Research*, 365(1), 51-63.
69. Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K., ve Eriksson, U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93(6), 2576-2581.
70. Bry, M., Kivela, R., Leppanen, V. M., ve Alitalo, K. (2014). Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. *Physiological Reviews*, 94(3), 779-794.
71. Li, X., Kumar, A., Zhang, F., Lee, C., ve Tang, Z. (2012). Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends in Molecular Medicine* 18(2), 119-127.
72. Li, X., Lee, C., Tang, Z., Zhang, F., Arjunan, P., Li, Y., Hou, X., Kumar, A., ve Dong, L. (2009). VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adhesion and Migration*, 3(4), 322-327.
73. Li, X., Tjwa, M., Van Hove, I., Enholm, B., Neven, E., Paavonen, K., Jeltsch, M., Juan, T. D., Sievers, R. E., Chorianopoulos, E., Wada, H., Vanwildemeersch, M., Noel, A., Foidart, J. M., Springer, M. L., von Degenfeld, G., Dewerchin, M., Blau, H. M., Alitalo, K., Eriksson, U., Carmeliet, P., ve Moons, L. (2008). Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 28(9), 1614-1620.
74. Hagberg, C. E., Falkevall, A., Wang, X., Larsson, E., Huusko, J., Nilsson, I., van Meeteren, L. A., Samén, E., Lu, L., Vanwildemeersch, M., Klar, J., Genove, G., Pietras, K., Stone-Elander, S., Claesson-Welsh, L., Yla-Herttuala, S., Lindahl, P., ve Eriksson, U. (2010). Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature*, 464(7290), 917-921.
75. Hosooka, T., Nomura, K., ve Ogawa, W. (2013). Vascular endothelial growth factor-B as a therapeutic target to prevent ectopic fat deposition. *Journal of Diabetes Investigation* 4(6), 525-527.
76. Chen, J. C., Chang, Y. W., Hong, C. C., Yu, Y. H., ve Su, J. L. (2012). The role of the VEGF-C/VEGFRs axis in tumor progression and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 88-107.
77. Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., ve Alitalo, K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal*, 15(2), 290-298.
78. Paavonen, K., Horelli-Kuitunen, N., Chilov, D., Kukk, E., Pennanen, S., Kallioniemi, O. P., Pajusola, K., Olofsson, B., Eriksson, U., Joukov, V., Palotie, A., ve Alitalo, K.

- (1996). Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. *Circulation*, 93(6), 1079-1082.
79. Secker, G. A., ve Harvey, N. L. (2015). VEGFR signaling during lymphatic vascular development: From progenitor cells to functional vessels. *Developmental Dynamics*, 244(3), 323-331.
 80. Wang, C. A., ve Tsai, S. J. (2015). The non-canonical role of vascular endothelial growth factor-C axis in cancer progression. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6), 718-724.
 81. Morfoisse, F., Renaud, E., Hantelys, F., Prats, A. C., ve Garmy-Susini, B. (2015). Role of hypoxia and vascular endothelial growth factors in lymphangiogenesis. *Molecular and Cellular Oncology*, 2(4), e1024821.
 82. Sleeman, J., Schmid, A., ve Thiele, W. (2009). Tumor lymphatics. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 285-297.
 83. Lohela, M., Bry, M., Tammela, T., ve Alitalo, K. (2009). VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 154-165.
 84. Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., ve Persico, M. G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 88(20), 9267-9271.
 85. Ribatti, D. (2008). The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis*, 11(3), 215-221.
 86. Dewerchin, M., ve Carmeliet, P. (2012). PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(8).
 87. Kim, K. J., Cho, C. S., ve Kim, W. U. (2012). Role of placenta growth factor in cancer and inflammation. *Experimental and Molecular Medicine*, 44(1), 10-19.
 88. Autiero, M., Luttun, A., Tjwa, M., ve Carmeliet, P. (2003). Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7), 1356-1370.
 89. Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S. J., Tobisu, K., Kakizoe, T., Tsukamoto, T., Kumamoto, Y., Sugimura, T., ve Terada, M. (1994). Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Research*, 54(15), 4233-4237.

90. Wei, S. C., Liang, J. T., Tsao, P. N., Hsieh, F. J., Yu, S. C., ve Wong, J. M. (2009). Preoperative serum placenta growth factor level is a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, 52(9), 1630-1636.
91. De Falco, S. (2012). The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Experimental and Molecular Medicine* 44(1), 1-9.
92. Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H. J., ve Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal*, 18(2), 363-374.
93. Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., ve Shibuya, M. (1998). A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31273-31282.
94. Komori, Y., Nikai, T., Taniguchi, K., Masuda, K., ve Sugihara, H. (1999). Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). *Biochemistry*, 38(36), 11796-11803.
95. Ferrara, N., Gerber, H. P., ve LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669-676.
96. Roskoski, R., Jr. (2008). VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375(3), 287-291.
97. Falcon, B. L., Chintharlapalli, S., Uhlik, M. T., ve Pytowski, B. (2016). Antagonist antibodies to vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) as anti-angiogenic agents. *Pharmacology and Therapeutics*, 164, 204-225.
98. Guo, S., Colbert, L. S., Fuller, M., Zhang, Y., ve Gonzalez-Perez, R. R. (2010). Vascular endothelial growth factor receptor-2 in breast cancer. *Biochimica Biophysica Acta*, 1806(1), 108-121.
99. Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., ve Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical Journal*, 437(2), 169-183.
100. Claesson-Welsh, L. (2016). VEGF receptor signal transduction - A brief update. *Vascular Pharmacology*, 86, 14-17.
101. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., ve Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92(6), 735-745.

102. Raimondi, C., ve Ruhrberg, C. (2013). Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumours. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 24(3), 172-178.
103. Guo, H. F., ve Vander Kooi, C. W. (2015). Neuropilin Functions as an Essential Cell Surface Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(49), 29120-29126.
104. Lampropoulou, A., ve Ruhrberg, C. (2014). Neuropilin regulation of angiogenesis. *Biochemical Society Transactions* 42(6), 1623-1628.
105. Hu, C., ve Jiang, X. (2016). Role of NRP-1 in VEGF-VEGFR2-Independent Tumorigenesis. *Targeted Oncology*, 11(4), 501-505.
106. Plein, A., Fantin, A., ve Ruhrberg, C. (2014). Neuropilin regulation of angiogenesis, arteriogenesis, and vascular permeability. *Microcirculation*, 21(4), 315-323.
107. Hu, C., ve Jiang, X. (2016). Role of NRP-1 in VEGF-VEGFR2-Independent Tumorigenesis. *Targeted Oncology*.
108. Shibuya, M. (2013). VEGFR and type-V RTK activation and signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10), a009092.
109. Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), 389-395.
110. Jeltsch, M., Leppanen, V. M., Saharinen, P., ve Alitalo, K. (2013). Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(9).
111. Simons, M., Gordon, E., ve Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
112. Patten, I. S., Rana, S., Shahul, S., Rowe, G. C., Jang, C., Liu, L., Hacker, M. R., Rhee, J. S., Mitchell, J., Mahmood, F., Hess, P., Farrell, C., Koulisis, N., Khankin, E. V., Burke, S. D., Tudorache, I., Bauersachs, J., del Monte, F., Hilfiker-Kleiner, D., Karumanchi, S. A., ve Arany, Z. (2012). Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy. *Nature*, 485(7398), 333-338.
113. Wu, F. T., Stefanini, M. O., Mac Gabhann, F., Kontos, C. D., Annex, B. H., ve Popel, A. S. (2010). A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(3), 528-552.
114. Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M. M., Shibuya, M., Alitalo, K., ve Eriksson, U. (1998). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95(20), 11709-11714.
115. Claesson-Welsh, L. (2016). VEGF receptor signal transduction - A brief update. *Vascular Pharmacology*.

116. Shibuya, M., ve Claesson-Welsh, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research*, 312(5), 549-560.
117. Gordon, K., Spiden, S. L., Connell, F. C., Brice, G., Cottrell, S., Short, J., Taylor, R., Jeffery, S., Mortimer, P. S., Mansour, S., ve Ostergaard, P. (2013). FLT4/VEGFR3 and Milroy disease: novel mutations, a review of published variants and database update. *Human Mutation*, 34(1), 23-31.
118. Lee, S. H., Jeong, D., Han, Y. S., ve Baek, M. J. (2015). Pivotal role of vascular endothelial growth factor pathway in tumor angiogenesis. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 89(1), 1-8.
119. Pages, G., ve Pouyssegur, J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovascular Research* 65(3), 564-573.
120. Rahimi, N. (2012). The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Molecular cancer therapeutics*, 11(3), 538-548.
121. Krock, B. L., Skuli, N., ve Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer*, 2(12), 1117-1133.
122. Chung, A. S., ve Ferrara, N. (2011). Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 563-584.
123. Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., ve Carmeliet, P. (2009). Regulation of Angiogenesis by Oxygen and Metabolism. *Developmental Cell*, 16(2), 167-179.
124. Sands, M., Howell, K., Costello, C. M., ve McLoughlin, P. (2011). Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B expression in the hypoxic lung. *Respiratory Research*, 12, 17.
125. Pugh, C. W., ve Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine*, 9(6), 677-684.
126. Ferrara, N. (1999). Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International*, 56(3), 794-814.
127. Goldman, C. K., Kim, J., Wong, W. L., King, V., Brock, T., ve Gillespie, G. Y. (1993). Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Molecular Biology of the Cell*, 4(1), 121-133.
128. Ruohola, J. K., Valve, E. M., Karkkainen, M. J., Joukov, V., Alitalo, K., ve Harkonen, P. L. (1999). Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 149(1-2), 29-40.

129. Botelho, M. C., Soares, R., ve Alves, H. (2015). Progesterone in Breast Cancer Angiogenesis. *SM Journal of Reproductive Health Infertility*, 1(1).
130. Rak, J., Yu, J. L., Klement, G., ve Kerbel, R. S. (2000). Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *The Journal of Investigative Dermatology*, 5(1), 24-33.
131. Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D., ve Kerbel, R. S. (1995). Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Reviews*, 14(4), 263-277.
132. Rak, J., Mitsushashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., ve Kerbel, R. S. (1995). Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Research*, 55(20), 4575-4580.
133. Dvorak, H. F. (2015). Tumor Stroma, Tumor Blood Vessels, and Antiangiogenesis Therapy. *The Cancer Journal*, 21(4), 237-243.
134. Saharinen, P., Eklund, L., Pulkki, K., Bono, P., ve Alitalo, K. (2011). VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends in Molecular Medicine*, 17(7), 347-362.
135. Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C., ve Marini, F. C. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*, 18(1), 84.
136. Bergers, G., ve Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 401-410.
137. Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182-1186.
138. Chekhonin, V. P., Shein, S. A., Korchagina, A. A., ve Gurina, O. I. (2013). VEGF in tumor progression and targeted therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 13(4), 423-443.
139. Kerbel, R. S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 21(3), 505-515.
140. Bagley, R. G. (2016). Commentary on Folkman: "Tumor Angiogenesis Factor". *Cancer Research*, 76(7), 1673-1674.
141. Hida, K., Maishi, N., Torii, C., ve Hida, Y. (2016). Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells. *International Journal of Clinical Oncology*, 21(2), 206-212.
142. Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *The New England Journal of Medicine*, 358(19), 2039-2049.

143. Erez, N. (2013). Cancer: Angiogenic awakening. *Nature*, 500(7460), 37-38.
144. Michiels, C., Tellier, C., ve Feron, O. (2016). Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1866(1), 76-86.
145. Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., ve Sharma, V. (2015). Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(6), XE01-XE05.
146. Farhang Ghahremani, M., Goossens, S., ve Haigh, J. J. (2013). The p53 family and VEGF regulation: "It's complicated". *Cell Cycle*, 12(9), 1331-1332.
147. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., ve Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes and Development*, 14(1), 34-44.
148. Krishna Priya, S., Nagare, R. P., Sneha, V. S., Sidhanth, C., Bindhya, S., Manasa, P., ve Ganesan, T. S. (2016). Tumour angiogenesis-Origin of blood vessels. *International Journal of Cancer*, 139(4), 729-735.
149. Claesson-Welsh, L., ve Welsh, M. (2013). VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of Internal Medicine*, 273(2), 114-127.
150. Gerber, H. P., Dixit, V., ve Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13313-13316.
151. Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*, 9 Suppl 1, 2-10.
152. Vasudev, N. S., ve Reynolds, A. R. (2014). Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17(3), 471-494.
153. Al-Husein, B., Abdalla, M., Trepte, M., Deremer, D. L., ve Somanath, P. R. (2012). Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Pharmacotherapy*, 32(12), 1095-1111.
154. Ferrara, N., Hillan, K. J., ve Novotny, W. (2005). Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(2), 328-335.
155. Bzowska, M., Mezyk-Kopec, R., Prochnicki, T., Kulesza, M., Klaus, T., ve Bereta, J. (2013). Antibody-based antiangiogenic and antilymphangiogenic therapies to prevent tumor growth and progression. *Acta Biochimica Polonica*, 60(3), 263-275.
156. Ferrara, N., ve Adamis, A. P. (2016). Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*.

157. Lin, Z., Zhang, Q., ve Luo, W. (2016). Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: Challenges and future directions. *European Journal of Pharmacology*.
158. Jayson, G. C., Kerbel, R., Ellis, L. M., ve Harris, A. L. (2016). Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet*, 388(10043), 518-529.
159. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., ve Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991-998.
160. Voron, T., Marcheteau, E., Pernot, S., Colussi, O., Tartour, E., Taieb, J., ve Terme, M. (2014). Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Frontiers in Oncology* 4, 70.
161. Marti, L. C., Pavon, L., Severino, P., Sibov, T., Guilhen, D., ve Moreira-Filho, C. A. (2014). Vascular endothelial growth factor-A enhances indoleamine 2,3-dioxygenase expression by dendritic cells and subsequently impacts lymphocyte proliferation. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 109(1), 70-79.
162. Laxmanan, S., Robertson, S. W., Wang, E., Lau, J. S., Briscoe, D. M., ve Mukhopadhyay, D. (2005). Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(1), 193-198.
163. Legitimo, A., Consolini, R., Failli, A., Orsini, G., ve Spisni, R. (2014). Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 10(11), 3224-3235.
164. Ohm, J. E., ve Carbone, D. P. (2001). VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunologic Research*, 23(2-3), 263-272.
165. Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., ve Carbone, D. P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*, 92(11), 4150-4166.
166. Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D. P., ve Gabrilovich, D. I. (1998). Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *Journal Immunology*, 160(3), 1224-1232.
167. Greten, T. F., Manns, M. P., ve Korangy, F. (2011). Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *International Immunopharmacology*, 11(7), 802-807.
168. Gabrilovich, D. I., ve Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(3), 162-174.
169. Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A. F., Tartour, E., ve Taieb, J. (2013). VEGFA-VEGFR

- pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Research*, 73(2), 539-549.
170. Terme, M., Tartour, E., ve Taieb, J. (2013). VEGFA/VEGFR2-targeted therapies prevent the VEGFA-induced proliferation of regulatory T cells in cancer. *Oncoimmunology*, 2(8), e25156.
 171. Zhao, Y., Wu, T., Shao, S., ve Shi, B. (2016). Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, 5(2), e1004983.
 172. Ohm, J. E., Gabrilovich, D. I., Sempowski, G. D., Kisseleva, E., Parman, K. S., Nadaf, S., ve Carbone, D. P. (2003). VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood*, 101(12), 4878-4886.
 173. Voron, T., Colussi, O., Marcheteau, E., Pernot, S., Nizard, M., Pointet, A. L., Latreche, S., Bergaya, S., Benhamouda, N., Tanchot, C., Stockmann, C., Combe, P., Berger, A., Zinzindohoue, F., Yagita, H., Tartour, E., Taieb, J., ve Terme, M. (2015). VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(2), 139-148.
 174. Watnick, R. S. (2012). The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(12), a006676.
 175. Riabov, V., Gudima, A., Wang, N., Mickley, A., Orekhov, A., ve Kzhyshkowska, J. (2014). Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Frontiers in Physiology*, 5, 75.
 176. Gomes, F. G., Nedel, F., Alves, A. M., Nor, J. E., ve Tarquinio, S. B. (2013). Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sciences*, 92(2), 101-107.
 177. Corliss, B. A., Azimi, M. S., Munson, J. M., Peirce, S. M., ve Murfee, W. L. (2016). Macrophages: An Inflammatory Link Between Angiogenesis and Lymphangiogenesis. *Microcirculation*, 23(2), 95-121.
 178. Baay, M., Brouwer, A., Pauwels, P., Peeters, M., ve Lardon, F. (2011). Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 565187.
 179. Ott, P. A., Hodi, F. S., ve Buchbinder, E. I. (2015). Inhibition of Immune Checkpoints and Vascular Endothelial Growth Factor as Combination Therapy for Metastatic Melanoma: An Overview of Rationale, Preclinical Evidence, and Initial Clinical Data. *Front Oncol*, 5, 202.
 180. Ghaemimanesh, F., Bayat, A. A., Babaei, S., Ahmadian, G., Zarnani, A. H., Behmanesh, M., Jeddi-Tehrani, M., ve Rabbani, H. (2015). Production and Characterization of a Novel Monoclonal Antibody Against Human Sortilin. *Monoclonal Antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, 34(6), 390-395.

181. Zheng, X., Li, Y., Zhao, J., Wang, D., Xia, H., ve Mao, Q. (2016). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Human Nuclear Protein FAM76B. *PLoS One*, 11(3), e0152237.
182. Lisitsyn, N. A., Chernyi, A. A., Nikitina, I. G., Karpov, V. L., ve Beresten, S. F. (2014). Methods of protein immunoanalysis. *Molecular Biology (Mosk)*, 48(5), 718-727.
183. Reen, D. J. (1994). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods in Molecular Biology*, 32, 461-466.
184. Hornbeck, P. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assays. *Current protocols in immunology*, Chapter 2, Unit 2 1.
185. Gan, S. D., ve Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of investigative dermatology*, 133(9), e12.
186. Shah, K., ve Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine, (Lond)*, 77(7), C98-101.
187. Kumar, V. (2000). Immunofluorescence and enzyme immunomicroscopy methods. *Journal of immunoassay*, 21(2-3), 235-253.
188. Aoki, V., Sousa, J. X., Jr., Fukumori, L. M., Perigo, A. M., Freitas, E. L., ve Oliveira, Z. N. (2010). Direct and indirect immunofluorescence. *Anais brasileiros de dermatologia*, 85(4), 490-500.
189. Beutner, E. H. (1961). Immunofluorescent Staining: The Fluorescent Antibody Method. *Bacteriological reviews*, 25(1), 49-76.
190. Harper, D. R., Kit, M. L., ve Kangro, H. O. (1990). Protein blotting: ten years on. *Journal of virological methods*, 30(1), 25-39.
191. Kurien, B. T., ve Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293.
192. MacPhee, D. J. (2010). Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 61(2), 171-177.
193. Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., ve Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian journal of medicine and science in sports*, 27(1), 4-25.
194. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., ve Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176.
195. Deniz, G. (2007). Flow Sitometri ve Klinik Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences*, 3(43), 73-80.
196. Hülya, Ö., ve Hasibe, A. (2013). Akım Sitometri ve Temel Özellikleri. *Selçuk Pediatri*, 1(1), 12-15.

197. Ferrara, N., Leung, D. W., Cachianes, G., Winer, J., ve Henzel, W. J. (1991). Purification and cloning of vascular endothelial growth factor secreted by pituitary folliculostellate cells. *Methods in Enzymology*, 198, 391-405.
198. Kim, K. J., Li, B., Houck, K., Winer, J., ve Ferrara, N. (1992). The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors*, 7(1), 53-64.
199. Denizli, A. (2011). Purification of Antibodies by Affinity Chromatography. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 39 (1), 1–18.
200. Liu, H., Gaza-Bulseco, G., Chumsae, C., ve Newby-Kew, A. (2007). Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE. *Biotechnology Letters*, 29(11), 1611-1622.
201. Rizner, T. L. (2014). Teaching the structure of immunoglobulins by molecular visualization and SDS-PAGE analysis. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 42(2), 152-159.
202. Sullivan, L. A., Carbon, J. G., Roland, C. L., Toombs, J. E., Nyquist-Andersen, M., Kavlie, A., Schlunegger, K., Richardson, J. A., ve Brekken, R. A. (2010). r84, a novel therapeutic antibody against mouse and human VEGF with potent anti-tumor activity and limited toxicity induction. *PLoS One*, 5(8), e12031.
203. Lai, Y. D., Wu, Y. Y., Tsai, Y. J., Tsai, Y. S., Lin, Y. Y., Lai, S. L., Huang, C. Y., Lok, Y. Y., Hu, C. Y., ve Lai, J. S. (2016). Generation of Potent Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Neutralizing Antibodies from Mouse Phage Display Library for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 17(2), 214.
204. Chen, H., Zou, Y., Yang, H., Wang, J., ve Pan, H. (2014). Downregulation of FoxM1 inhibits proliferation, invasion and angiogenesis of HeLa cells in vitro and in vivo. *International journal of oncology*, 45(6), 2355-2364.
205. Zhao, Y., You, W., Zheng, J., Chi, Y., Tang, W., ve Du, R. (2016). Valproic acid inhibits the angiogenic potential of cervical cancer cells via HIF-1 α /VEGF signals. *Clinical and Translational Oncology*, 18(11), 1123-1130.
206. Li, L., Cheng, F. W., Wang, F., Jia, B., Luo, X., ve Zhang, S. Q. (2014). The activation of TLR7 regulates the expression of VEGF, TIMP1, MMP2, IL-6, and IL-15 in Hela cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 389(1-2), 43-49.
207. Chen, J. H., Wang, X. C., ve Sato, J. D. (1999). Monoclonal antibodies against vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165): neutralization of biological activity and recognition of the epitope. *Biochemistry and Molecular Biology International* 47(2), 161-169.
208. Weigand, M., Hantel, P., Kreienberg, R., ve Waltenberger, J. (2005). Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis*, 8(3), 197-204.

209. Timoshenko, A. V., Chakraborty, C., Wagner, G. F., ve Lala, P. K. (2006). COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer. *British Journal of Cancer*, 94(8), 1154-1163.
210. Kitaguchi, Y., Taraseviciene-Stewart, L., Hanaoka, M., Natarajan, R., Kraskauskas, D., ve Voelkel, N. F. (2012). Acrolein induces endoplasmic reticulum stress and causes airspace enlargement. *PLoS One*, 7(5), e38038.





ÖZGEÇMİŞ

1. KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: MELEK YAMAN

Doğum Yeri: ANKARA

Doğum Tarihi: 03.03.1984

Telefon: 0554 907 50 25

E-mail: yamanmelek84@hotmail.com

Yabancı Dil: İngilizce

2. ÖĞRENİM BİLGİLERİ

2009- : (Doktora) Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı (Ankara)

2007-2009 : (Yüksek Lisans) Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Ankara)

2003-2007 : (Lisans) Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (Ankara)

3- BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

I) Uluslararası SCI/SCIE indeksleri tarafından taranan hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1- Bagriacik EU, Yaman M, Haznedar R, Sucak G, Delibasi T. TSH- induced Gene Expression Involves Regulation of Self-Renewal And Differentiation-Related Genes in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. J Endocrinol. 2011 Nov 29.

2- Bagriacik EU, Baykaner MK, Yaman M, Sivrikaya G, Durdağ E, Emmez H, Fincan GO, Börcek AO, Seçen AE, Ercan S. Establishment of a primary pleomorphic xanthoastrocytoma cell line: in vitro responsiveness to some chemotherapeutics. Neurosurgery. 2011 May 27.

3- Bayram M, Taskaya A, Bagriacik EU, İlhan MN, Yaman M. The effect of maternal serum sFAS/sFASL system on etiopathogenesis of preeclampsia and severe preeclampsia. J Matern Fetal Neonatal Med. 2012 Aug 22

4- Demirci U, Yaman M, Buyukberber S, Coskun U, Baykara M, Uslu K, Ozet A, Benekli M, Bagriacik EU. Prognostic importance of markers for inflammation, angiogenesis and apoptosis in high grade glial tumors during temozolomide and radiotherapy. Int Immunopharmacol. 2012 Dec;14(4):546-9. 2012 Aug 29.

5 -Bedirli N, Akyürek N, Kösem B, Yaman M, Çavunt Bayraktar A, Kurtipek Ö, Kavutçu M. Thoracic epidural anesthesia with bupivacaine attenuates systemic inflammatory response and lung impairment associated with cerulein-induced pancreatitis in rats. Turk J Med Sci 2012; 42 (2): 217-227

6- Baykara M, Yaman M, Buyukberber S, Tufan G, Demirci U, Benekli M, Coskun U, Ozet A, Umit Bagriacik E. Clinical and prognostic importance of XIAP and USP8 in advanced stages of non-small cell lung cancer. J BUON.2013;18(4):921-7

II) Uluslararası SCI/SCIE dışı indeksler tarafından taranan hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Bayram M, Bostanci MS, Celtemen MB, Bagriacik EU, Yaman M, Civil F. Maternal Inflammatory Response in Severe Preeclamptic and Preeclamptic Pregnancies. J Clin Gynecol Obstet 2012;1(2-3):40-45

III) Ulusal Dergilerde Yer Alan Yayınlar

1- Seyer A, Yaman M, Khalil I, Biter G, Yalçın B, Kalkancı A, Kuştimur S. Çeşitli besi yerlerinde candida türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. (2009) 39 (3-4): 69-72

IV) Ulusal Ve Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler.

1-Bedirli N, Akyürek N,Kösem B, Yaman M, Cavuntbayraktar A, Kurtipek Ö, Kavutçi M. Akut pankreatit oluşturulan ratlarda torakal epidural anestezinin akciğer hasarına etkisi. Sözlü sunum S44, Türk anesteziyoloji ve reanimasyon derneği 44.ulusal kongresi Ekim 2010, Antalya

2- Demirci U, Bağrıaçık EU, Büyükberber S, Coşkun U, Yaman M, Benekli M. Yüksek gradeligial tümörlerde inflamasyon, apoptoz ve anjiyogenez belirteçlerinin prognostik önemi. Poster P:28, VII. Ulusal tıbbi onkoloji kongresi Eylül 2010, Antalya

3- Yaman M, Bağrıaçık EU . Western Blot ve immünofloresan yöntemleri ile insan mezenkimal kök hücrelerinde tiroid stimüle edici hormon reseptörü ekspresyonunun araştırılması. Poster, 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi Nisan 2011, Marmaris

4- Bağrıaçık EU, Yaman M. Tiroid stimüle edici hormonun mezenkimal kök hücrelerde bazı kemokin ve büyüme faktörü gen ekspresyonuna etkisi. Poster, 21. Ulusal İmmünoloji Kongresi Nisan 2011, Marmaris

5- Bagriacik EU, Yaman M, Savas D, Uslu K. COL2A1 gene expression Is modulated by TSH In bone marrow-derived mesenchymal stem cells. The Journal of Immunology, 2011, 186, 153.12)

6- U.Demirci, M. Yaman, S. Buyukberber, O. Ekinici, S. Ozkan, U. Coskun, M. Benekli, A. Ozet, Ü.E. Bagriacik. Expression and clinical importance of e-cadherin, dysadherin and chemokine ligand 2 (CCL2) in renal cell carcinoma (RCC) Annals of Oncology 2012 september (vol:23 suppl: 9 838P)

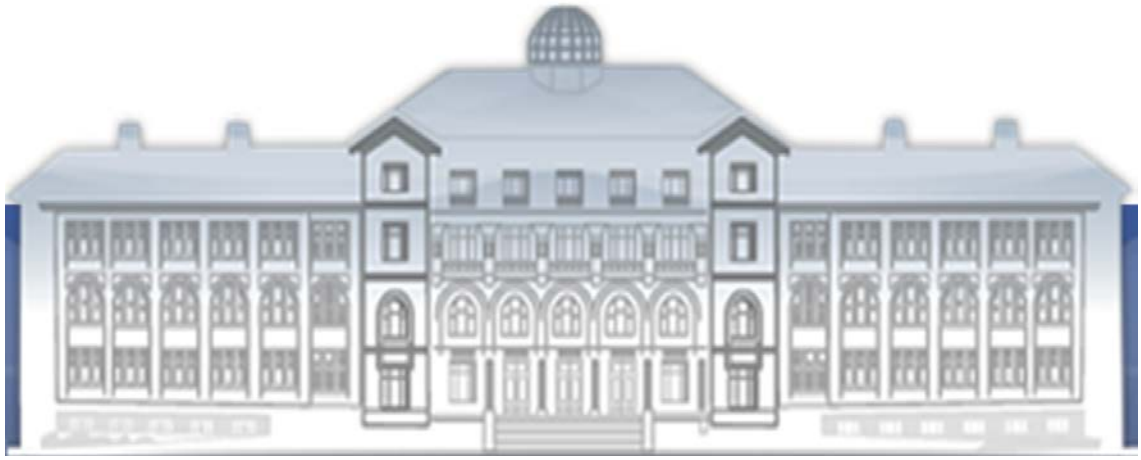
7- Demirci U, Yaman M, Bagriacik EU. Effects of acute doxorubicin exposure on caspase-mediated apoptosis in cardiomyocytes. J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; abstr e12036)

8- Tan G, Yaman M, Örüklü N, Sağlam N, Bağrıaçık EU. In vitro cytotoxicity of gold ions and gold nanoparticles on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells . Journal of Biotechnology 208 (2015) S5–S120

9- Tan G, Sağlam N, Yaman M, Örüklü N, Bağrıacık EU. Toxic effects of gold nanoparticles and gold ions in human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biotechnology* 208 (2015) S5–S120

10- Bağrıacık EU, Bağrıacık Y, Örüklü N, Yaman M. Development and characterization of monoclonal antibodies specific for human leptin. *Journal of Biotechnology* 208 (2015) S5–S120

11- Bağrıacık EU, Örüklü N, Yaman M, Bağrıacık Y. Development of a quantitative immunoassay for measuring surface antigen of hepatitis B virus in human serum and plasma by using two new monoclonal antibodies. *Journal of Biotechnology* 208 (2015) S5–S120



GAZİ GELECEKTİR..