



**VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)'NÜN
REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

HÜLYA KUDUĞ

DOKTORA TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Haziran 2017

Her hakkı saklıdır

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)'NÜN
REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

HÜLYA KUDUĞ

TOKAT
Haziran - 2017

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No:2015-127) ve
Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı (Proje No:0356.TGSD.2015-2) tarafından
desteklenmiştir.**

Hülya KUDUĞ tarafından hazırlanan “Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)’nün rekombinant olarak üretilmesi, saflaştırılması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 20 Haziran 2017 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Üye

Prof. Dr. Ahmet YILDIRIM

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

Atatürk Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç Dr. Emel CANPOLAT

Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç Dr. Seçil ERDEN TAYHAN

Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27-07-2017 tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. E. Belen YETİNTAŞ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

27/07/2017

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

HÜLYA KUDUĞ

20 Haziran 2017



ÖZET

DOKTORA TEZİ

VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ(VEGF)'NÜN REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

HÜLYA KUDUĞ

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI:PROF. DR. İSA GÖKÇE

Vasküler endotelyal büyüme faktörleri (VEGF) genel olarak endotel hücre büyümesi, anjiyogenez ve vaskülojeniz gibi fonksiyonlar göstermektedir. VEGF₁₆₅ proteini VEGF ailesi içerisinde en yüksek anjiyojenik etkiye sahip türü olup birçok hücre ve doku türünde bulunmaktadır. VEGF₁₆₅, özellikle VEGF reseptörlerine bağlanarak ve bu reseptörleri aktive ederek endotel hücreleri için mitojenik faktör olarak rol almaktadır. Bu tez çalışmasında, insan VEGF₁₆₅ proteinin (rhVEGF₁₆₅) rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak maya ekspresyon sisteminde üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın üç amacı, VEGF₁₆₅ geninin klonlanması; *Kluyveromyces lactis* sisteminde rekombinant olarak ekspresyonu ve saflaştırılması; endotel hücreleri için biyolojik karakterizasyonunun belirlenmesidir. VEGF₁₆₅ geni *K. lactis* pKLAC2 vektörüne *K. lactis*'e ait α -MF dizisinin alt bölgesine klonlanmıştır. VEGF₁₆₅-pKLAC2 kontsüktü lineer hale getirilip *K. lactis* kompetent hücrelerine tranforme edilmiş ve *K. lactis* genomuna entegrasyonu sağlanmıştır. Transforme hücrelerin seçilimi azot bulunmayan ve asetamid içeren besiyerinde gerçekleştirilmiştir. VEGF₁₆₅ His-etiketi ile eksprese edilmiş ve *K. lactis* kültür ortamına sekresyonu sağlanmıştır. Amonyum sülfat ile çöktürme ve nikel temelli afinite kromatografisi teknikleri saflaştırma amacı ile kullanılmıştır. Saflaştırılmış rhVEGF₁₆₅ SDS-PAGE yöntemi ile kalitatif olarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada üretilen rekombinant VEGF₁₆₅'nin biyolojik olarak aktifliği insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kullanılarak yapılan proliferasyon analizi ile belirlenmiş ve EC₅₀ değeri 3.06 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Ayrıca *in vitro* yara modeli oluşturularak yara iyileşmesi üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

2017, 100 SAYFA

ANAHTAR KELİMELE: Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), rekombinant protein, *K. lactis*

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

PRODUCTION of RECOMBINANT VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR), PURIFICATION and INVESTIGATION of BIOLOGICAL PROPERTIES

HÜLYA KUDUĞ

GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

SUPERVISOR: PROF. DR. İSA GÖKÇE

Vascular endothelial growth factors (VEGFs) generally have functions such as endothelial cell growth, angiogenesis and vasculogenesis. Human VEGF₁₆₅ is the most efficient angiogenic factor variant in the VEGF family and mainly found in many different cells and tissues. Especially, VEGF₁₆₅ plays a role as an endothelial cell mitogenic factor via binding and activating of VEGF receptors. In this study, the expression of human protein VEGF₁₆₅ (rhVEGF₁₆₅) has been achieved using recombinant DNA technology in yeast expression system. The following three aims of this project are focusing on cloning of VEGF₁₆₅ gene, expression and purification of the protein from the yeast *Kluyveromyces lactis* recombinantly and its biological characterization for endothelial cells. The gene VEGF₁₆₅ was cloned into expression vector, pKLAC2 downstream of *K. lactis* α -MF. The VEGF₁₆₅-pKLAC2 construct was linearized and transformed into *K. lactis* competent cells and integrated in its genome by electroporation. The selection of transformed strains was carried out using nitrogen-free medium containing acetamide. VEGF₁₆₅ was expressed with His-tag and secreted in *K. lactis* culture medium. Ammonium sulfate precipitation and the nickel based affinity chromatography were used for purification. Purified VEGF₁₆₅ was qualitatively analyzed by SDS-PAGE. The recombinant VEGF₁₆₅ was functionally active as assessed by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) proliferation assay with EC₅₀ of 3.06 ng/mL. In addition, *in vitro* wound model was created and its effect on wound healing was investigated.

2017, 100 PAGES

KEYWORDS: Vascular endothelial growth factor (VEGF), recombinant protein, *K. lactis*

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunan, öneri ve fikirlerinden yararlandığım hocalarım; Yrd. Doç Dr. Seçil ERDEN TAYHAN ve Yrd. Doç Dr. Emel CANPOLAT'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını destekleyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na (Proje No:2015-127) ve Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı'na (Proje No:0356.TGSD.2015-2) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Rekombinant Protein Laboratuvarı'nda çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme ve sevdiklerime sonsuz teşekkür ederim.

HÜLYA KUDUĞ

20 Haziran 2017

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	6
2.1. Rekombinant Protein Üretimi.....	6
2.2. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri	6
2.3. <i>Kluyveromyces lactis</i>	10
2.3.1. Gıda ve yem endüstrisi uygulamaları	14
2.3.2. İlaç endüstrisinde uygulamalar	14
2.4. <i>K. lactis</i> Protein Ekspresyon Kiti (New England Biolabs).....	15
2.5. Büyüme Faktörleri ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)	21
2.6. VEGF Ailesi ve İzoformları	22
2.7. VEGF Reseptörleri	24
2.8. VEGF Sinyalizasyonu	27
2.8.1. Hücre poliferasyonu ve gen ekspresyonu	27
2.8.2. Hücre canlılığı	28
2.8.3. Migrasyon	28
2.8.4. Reseptör etkileşimi	29
2.9. VEGF ve Embriyogenez	30
2.10. Normal Yetişkin Fizyolojisinde VEGF	31
2.10.1. Yara iyileşmesi	31
2.10.2. Üreme döngüsü.....	32
2.11. Malin Olmayan Hastalıklarda VEGF.....	32
2.11.1. Romatoid artrit (RA)	32
2.11.2. Diyabet ve iskemik retinopatiler.....	33
2.11.3. Sedef hastalığı ve VEGF	34

2.12. Malin Hastalıklar ve VEGF	35
2.12.1. Tümör anjiyojenezi	35
2.12.2. Anjiyojenik anahtarı	35
2.12.3. VEGF'nin otokrin etkileri	36
2.12.4. Tümör lenfatikleri	37
2.12.5. VEGF ve hipoksi	37
2.13. VEGF'nin Kanser Tedavisi Olarak Hedeflenmesi	39
2.13.1. Normalleştirme teorisi	39
2.13.2. Metronomik tedavi: anti-anjiyojenik tedavi olarak kemoterapi	41
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Materyal	42
3.1.1. Kullanılan cihazlar	42
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	43
3.1.3. Kullanılan enzimler	44
3.1.4. Klonlama ve ekspresyon işlemlerinde kullanılan mikroorganizmalar	45
3.1.5. Klonlama ve ekspresyon işlemlerinde kullanılan plazmidler	45
3.1.6. Kullanılan çözeltiler	45
3.1.6.1. Tampon çözeltiler ve hazırlanışları	45
3.1.6.2. Sıvı ve katı besiyerleri	47
3.1.6.3. SDS-PAGE ve gümüş boyamada kullanılan çözeltiler	48
3.1.6.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler	50
3.1.6.5. Protein saflaştırmada kullanılan çözeltiler	50
3.2. Yöntem	51
3.2.1. VEGF ₁₆₅ geninin optimizasyonu ve sentezi	51
3.2.1.1. VEGF ₁₆₅ 'e ait sekans dizisinin elde edilmesi	51
3.2.1.2. Kodon optimizasyonu	51
3.2.1.3. pKLAC2 vektör sistemine göre optimizasyonu	51
3.2.1.4. Optimize edilmiş dizinin yapay olarak sentezi	52
3.2.2. VEGF ₁₆₅ geninin ekspresyon vektörüne klonlanması	52
3.2.2.1. VEGF ₁₆₅ geninin agaroz jelden saflaştırılması	53
3.2.2.2. VEGF ₁₆₅ geninin PCR ile elde edilmesi	55
3.2.2.3. Vektör DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesimi	57
3.2.2.4. Ligasyon	58
3.2.2.5. Rekombinant pKLAC2-VEGF ₁₆₅ vektörünün <i>E.coli</i> DH5α hücrelerine transformasyonu	59
3.2.2.6. Plazmid DNA saflaştırılması	60
3.2.2.7. Plazmid DNA analizi	61
3.2.3. VEGF ₁₆₅ geninin ekspresyonu	62
3.2.3.1. Rekombinant vektörün lineerizasyonu	63
3.2.3.2. Rekombinant vektörün maya hücrelerine elektroporasyon ile transformasyonu	64
3.2.3.3. Genomik DNA izolasyonu	65
3.2.3.4. Genomik DNA'nın PCR ile analizi	66
3.2.3.5. DNA dizi analizi	66
3.2.3.6. Rekombinant VEGF ₁₆₅ 'nin ekspresyonu	67
3.2.4. VEGF ₁₆₅ proteininin saflaştırılması	68

3.2.4.1. Protein çöktürme	68
3.2.4.2. Afinite kromatografisi	69
3.2.4.3. Diyaliz ile tamponun değiştirilmesi	69
3.2.5. VEGF ₁₆₅ proteininin karakterizasyonu	70
3.2.5.1. Spektrofotometri ile kantitatif analiz	70
3.2.5.2. SDS-PAGE ile kalitatif analiz	70
3.2.5.3. Gümüş boyama ile kalitatif analiz	71
3.2.6. VEGF ₁₆₅ proteininin biyoaktivite çalışmaları.....	72
3.2.6.1. Endotel hücreleri için DMEM besi ortamının hazırlanması.....	72
3.2.6.2. Endotel hücrelerin çözülmesi ve kültürü	72
3.2.6.3. Endotel hücrelerin pasajlanması ve dondurulması	73
3.2.6.4. Rekombinant VEGF ₁₆₅ 'nin endotel hücre büyümesine olan etkisi (MTT Testi).....	75
3.2.6.5. <i>In vitro</i> yara iyileşmesi	76
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	78
4.1. Kodon Optimizasyonu	78
4.2. Vektör Optimizasyonu.....	79
4.3. Yapay Gen Sentezi.....	79
4.4. VEGF ₁₆₅ Geninin Agaroz Jelden Saflaştırılması	80
4.5. PCR Optimizasyonu	81
4.6. Vektör DNA'sının Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	82
4.7. Plazmid DNA Analizi	82
4.8. Genomik DNA Analizi	84
4.9. DNA Dizi Analizi	85
4.10. Rekombinant VEGF ₁₆₅ Proteinin Kalitatif ve Kantitatif Analizi.....	87
4.10.1. Spektrofotometrik analiz	87
4.10.2. SDS-PAGE analizi	87
4.10.3. Gümüş boyama.....	88
4.11. Rekombinant VEGF ₁₆₅ 'nin Endotel Hücre Canlılığına Etkisi.....	90
4.12. Yara İyileşmesinin Değerlendirilmesi	93
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	96
6. KAYNAKLAR	
7. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
bç	baz çifti
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ M	Mikromolar
M	Molar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)

KısaltmalarAçıklama

α -MF	alfa eşleşme faktör
APS	Amonyumpersülfat
BSA	sığır (bovine) serum albümin
DMSO	dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit

dNTP	deoksiribonükleosit trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	endoplazmik retikulum
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
LB	Luria-Bertani
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
PIPES	piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)
PMSF	fenil metil sülfonil florit
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
rVEGF	rekombinant vasküler endotel büyüme faktörü
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS PAGE	sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SP	sinyal peptidaz
SOB	super optimal broth
TAE	tris-asetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametilenetilendiamin
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Rekombinant protein üretiminde kullanılan konukçu hücre tipleri	7
Şekil 2.2. <i>K. lactis</i> 'te salgı proteinin işlenmesi.....	17
Şekil 2.3. <i>K. lactis</i> ekspresyon kiti ile rekombinant protein üretimi	18
Şekil 2.4. pKLAC2 ekspresyon vektörü	19
Şekil 2.5. pKLAC2 vektörüne ait çoklu klonlama bölgesi	20
Şekil 2.6. İnsan VEGF-A izoformları ve reseptör bölgeleri	23
Şekil 2.7. VEGF reseptörleri ve spesifik ligandları	25
Şekil 2.8. VEGFR2 reseptörü ile VEGF sinyalizasyonu.	27
Şekil 4.1. pET22b-VEGF ₁₆₅ konstrüktü.....	80
Şekil 4.2. Restriksiyon kesimi sonrasında pET22b-VEGF ₁₆₅ 'nin agaroz jel görüntüsü	80
Şekil 4.3. Farklı bağlanma sıcaklıklarında Gradient PCR ürünleri	81
Şekil 4.4. pKLAC2 vektörünün restriksiyon kesim sonrası agaroz jel görüntüsü	82
Şekil 4.5. PCR ile plazmit DNA analizinin jel görüntüsü	83
Şekil 4.6. Restriksiyon enzim kesimi ile plazmit DNA analizinin jel görüntüsü .	83
Şekil 4.7. Farklı restriksiyon enzimleri ile klonlamanın analizi	84
Şekil 4.8. Farklı genomik DNA'ların PCR ile analizi	85
Şekil 4.9. Pozitif genomik DNA'nın dizi analizi kromotogram sonucu.....	85
Şekil 4.10. Pozitif genomik DNA'nın VEGF ₁₆₅ ile karşılaştırılması	86
Şekil 4.11. Pozitif genomik DNA'ya ait amino asit dizisinin VEGF ₁₆₅ ile karşılaştırılması	87
Şekil 4.12. SDS-PAGE jel görüntüsü	88
Şekil 4.13. SDS-PAGE gümüş boyama jel görüntüsü.....	89
Şekil 4.14. VEGF ₁₆₅ 'nin hücre canlılığına olan etkisi	92
Şekil 4.15. VEGF ₁₆₅ 'nin 2. ve 6. günlerde hücre canlılığına olan etkisi.....	92
Şekil 4.16. Yara iyileşmesi mikroskop görüntüleri.....	94
Şekil 4.17. Yara iyileşmesi alan grafiği.....	95

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Protein üretiminde kullanılan farklı hücre sistemlerinin avantaj ve dezavantajları	7
Çizelge 2.2. <i>Kluyveromyces lactis</i> organizmasında üretilen rekombinant proteinler	12
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar.....	42
Çizelge 3.2. Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler	43
Çizelge 3.3. Kullanılan enzimler	44
Çizelge 3.4. Kullanılan klonlama ve ekspresyon vektörleri	45
Çizelge 3.5. Klonlamada ve ekspresyonda kullanılan plazmitler	45
Çizelge 3.6. VEGF ₁₆₅ geninin restriksiyon enzim kesimi	53
Çizelge 3.7. Tasarlanan primerler	55
Çizelge 3.8. VEGF ₁₆₅ geninin restriksiyon enzim kesimi	57
Çizelge 3.9. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri	58
Çizelge 3.10. Plasmid DNA'nın restriksiyon enzim kesimi bileşenleri	61
Çizelge 3.11. Pozitif klonun farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmesi.....	62
Çizelge 3.12. Rekombinant vektör DNA'nın lineerizasyonu	63
Çizelge 3.13. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler	71
Çizelge 3.14. Pozitif kontrol, rekombinant VEGF ₁₆₅ ve negatif kontrolün uygulama konsantrasyonları	76
Çizelge 4.1. Gradient PCR bağlanma sıcaklıkları	81
Çizelge 4.2. MTT analizine ait 570 nm absorbans değerleri	90
Çizelge 4.3. MTT analizine ait 570 nm absorbans değerleri ortalamaları.....	91
Çizelge 4.4. MTT analizi ile elde edilen EC ₅₀ değerleri.....	93
Çizelge 4.5. Yara bölgesi kaplama yüzdeleri	94

1. GİRİŞ

Büyüme faktörleri hücrel aktiviteri endokrin, parakrin, otokrin veya intrakrin mekanizmalarla etkileyebilen ve bu etkiyi çok düşük konsantrasyonlarda gösterebilen protein yapıda molekülledir. Büyüme faktörleri etkilerini ancak o faktöre ait reseptörlere sahip hücreler üzerinde göstermektedir. Genellikle tirozin kinaz yolağının uyarılması ile hücre içinde sinyalizasyon başlamaktadır. Büyüme faktörünün matriksteki çözünürlüğü büyüme faktörünün o bölgedeki konsantrasyonunu değıştirerek hücrenin vereceğı yanıtı etkilemektedir.

Büyüme faktörleri etki gösterdikleri hücre türüne göre sınıflara ayrılmaktadır. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) ailesi özellikle endotel hücreleri için spesifiktir ve Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri süperailisinin bir üyesidir. Vücutta birçok hücre tipinde sentezlenen VEGF, fizyolojik ve patolojik olaylarda önemli etkilere sahiptir. Endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferensiyasyonuna sebep olmaktadır. Damar oluşumu ve gelişiminin iki önemli mekanizması olan vaskülojenez ve anjiyojenez için gerekli ve önemlidir. Bunun yanında vücutta yara iyileşmesi, embriyogenez ve daha birçok kronik inflamatuvar hastalıklarda etki göstermektedir.

VEGF-A VEGF ailesinin bir sınıfı olup altı adet izoforma sahiptir. VEGF₁₆₅ VEGF-A sınıfının en mitojenik özellikte izoformu olup vaskülojenez ve anjiyojenezi tetiklemektedir. Vücuttaki aktif formu, iki adet 165 amino asitten oluşan ve yaklaşık 40 kDa büyüklüğündeki homodimer yapıdadır. Amino ucu reseptör bağlanma bölgesi, karboksil ucu ise heparin bağlanma bölgesi taşımaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisi iki farklı türün DNA'larının birleştirilmesi esasına dayanan modern biyoteknolojinin gelişmesinde büyük katkısı olan bir teknolojidir. Bu

teknoloji hedeflenen bir genin konukçu bir organizmaya aktararak büyük miktarlarda ifadenmesini amaçlamaktadır. Bakteri, maya ya da bazı ökaryotik canlılarda doğal olarak bulunan, halkasal ve çift zincirli DNA molekülleri olan plasmidler, genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak vektör olarak tasarlanmaktadır. Vektörler üretilmek istenilen bir proteine ait genin konukçu bir organizmada ifadenmek üzere kullanıldığı klonlama araçlarıdır. Temel olarak vektörler antibiyotik direnç geni, replikasyon orijini bölgesi ve hedeflenen DNA bölgesinin eklenebileceği çoklu klonlama bölgesinden oluşmaktadır. Çoklu klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon enzim bölgeleri kullanılarak hedeflenen genin vektör DNA'sına klonlanması sağlanmaktadır. Bir genin ifadenmesi için vektör üzerinde promotor bölgesinin alt kısmına klonlanması gerekmektedir. Böylece genin ifade edilmesinin başlangıcı için gerekli olan transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz gibi enzimlerin bağlanmasını sağlanmaktadır. Oluşturulan rekombinant DNA konukçu hücreye kimyasal ya da fiziksel yollarla tranforme edilmektedir. Transforme hücreler rekombinant plasmidin taşıdığı genin ürünü olan proteini ancak bu şekilde ifadelemektedir.

Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi, medikal ve ilaç sektöründe tedavi ve geliştirme amaçlı farklı insan proteinlerinin, hormonlarının, aşıların ve gen terapi ürünlerinin üretimi gibi geniş bir yelpazede kullanıma sahiptir. 1980'li yıllarının başında insülin ve hepatit B yüzey antijenin (HBsAg) rekombinant olarak üretilmesi ile bu alanda büyük bir gelişme katedilmiş ve insan serum albümü gibi tedavi amaçlı birçok proteinin üretimi ile gelişmeler devam etmiştir.

Rekombinant protein üretimi teknolojisinde yüksek verimlilik sağlayan *Escherichia coli* bakterisi, rekombinant protein üretimi için kullanılmış ilk organizma olup kısıtlı post-translasyonel modifikasyonlar gibi dezavantajlara sahip olmasına rağmen günümüzde yaygın olarak kullanılmaya devam edilmektedir. Bakteriyal sistemlere karşı maya ekspresyon sistemleri, sekresyon yollarına sahip olması ve hedef proteinleri doğal formda aktif bir şekilde üretebilmesinden dolayı önemli avantajlara sahiptir.

Kluyveromyces lactis son yıllarda rekombinant protein üretiminde önemli avantajlara sahip olan bir maya ekspresyon sistemidir. *K. lactis*'in yüksek kültür yoğunluğuna hızlı ulaşılabilmesi ve yüksek verimlilikte rekombinant protein üretimini sağlamasından dolayı son yıllarda özellikle gıda ve yem sektöründe endüstriyel ölçekte protein üretimi amaçlı kullanılmaktadır. Günümüze kadar prokimozin, ksilanaz gibi endüstriyel proteinlerin yanı sıra insan serum albümini gibi insan proteinlerinin sekresyon yolu ile yüksek verimde üretimine olanak sağlamıştır. Sahip olduğu avantajlarından dolayı *K. lactis* devam eden çalışmalar ile gittikçe önem kazanan bir sistem olarak düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında insan büyüme faktörlerinden VEGF₁₆₅'nin *K. lactis* organizmasında rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın üç temel amacı bulunmaktadır: VEGF₁₆₅ geninin *K. lactis* ekspresyon vektörü olan pKLAC2 vektörüne klonlanması; klonlanan VEGF₁₆₅ geninin *K. lactis* sisteminde rekombinant olarak ekspresyonu, sekresyonu ve saflaştırılması; elde edilen saf VEGF₁₆₅'nin endotel hücreleri üzerinde proliferasyona olan etkisinin araştırılarak biyolojik aktivitesinin tespit edilmesi. pKLAC2 vektörünün çoklu klonlama bölgesine bulunan restriksiyon enzimleri kullanılarak VEGF₁₆₅ geni bu bölgeye klonlanmıştır. Klonlama *K. lactis*'e ait α -MF dizisinin alt bölgesine gerçekleştirilerek bu sinyal peptidi ile hedef proteinin hücre dışına sekresyonu sağlanmıştır. Ekspresyon öncesinde VEGF₁₆₅-pKLAC2 rekombinant DNA'sı *SacII* enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiştir. Elektroporasyon tekniği ile lineer DNA'nın kompetent *K. lactis* hücrelerine transformasyonu ve *K. lactis* genomuna entegrasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformantların seçilimi azot bulunmayan ve asetamid içeren besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Böylelikle pKLAC2 vektöründe bulunan asetamidaz geninden dolayı azot içermeyen ortamda transforme hücrelerin asetamidi metabolize edebilme yeteneğinden dolayı hücrelerin seçilimi sağlanabilmiştir. Genomik DNA izolasyonu sonrasında PCR metodu ve DNA dizi analizi ile genoma entegrasyon doğrulanmıştır. Pozitif transformantlar seçilerek ekspresyon çalışmaları ile devam edilmiştir. His-etiketli VEGF₁₆₅'nin *K. lactis* kültür ortamına sekresyonu gerçekleştirilmiştir. Rekombinant VEGF₁₆₅ besi ortamından amonyum sülfat ile çöktürme ve sonrasında Nikel temelli afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan protein

spektrofotometrik olarak kantitatif, SDS-PAGE tekniği ile kalitatif olarak analiz edilmiştir. 300 mL maya kültüründen yaklaşık 1.7 mg saf protein elde edilmiştir. Saf proteinin biyolojik aktivitesi *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile tespit edilmiştir. İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kullanılarak yapılan proliferasyon çalışmalarında rekombinant VEGF₁₆₅'nin en etkili olduğu yarı konsantrasyon değeri MTT analizi sonrasında 3.06 ng/ml olarak tespit edilmiştir. *In vitro* oluşturulan yara modeli üzerinde VEGF₁₆₅'nin yara iyileşmesine olan etkisi negatif ve pozitif kontrol sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda VEGF₁₆₅ proteinin bakteriyel ve ökaryotik sistemlerde rekombinant olarak üretildiği gösterilmektedir. Pizarro ve arkadaşları (2010) tarafından rhVEGF₁₆₅ geni *E.coli* pBR322 vektörüne klonlanmış ve *E.coli* 64D1 konukçu hücrelerinde rekombinant olarak üretilmiştir. İnkülyon cisimciklerindeki proteinin yeniden katlanması sağlanarak üç basamaklı saflaştırma prosesi ile protein eldesi gerçekleştirilmiştir.

Kang ve arkadaşları (2013), pBAD-HisA-VEGF₁₆₅ rekombinant vektörünü *E.coli* TOP10 hücrelerinde üretmişler ve afinite kromatografisi ile saflaştırdıktan sonra CPAE (calf pulmonary artery endothelial) hücrelerinde proliferatif etkisini gözlemlemişlerdir. En yüksek aktivite gösterdiği konsantrasyonu 25 ng/mL olarak belirlemişlerdir.

Salimi ve Babashamsi (2016), HeLa hücrelerinden saflaştırdıkları VEGF₁₆₅ genini *E. coli* pET-32a(+) vektörüne klonlandıktan sonra BL21(DE3) *E. coli* suşunda ekspresyonunu indükleme süresini ve sıcaklığının optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

2013 yılında Bang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada VEGF₁₆₅ geni pET-32a(+) vektörüne klonlanmış BL21(DE3) *E.coli* suşunda ekspresyonu sağlanmıştır. İnkülyon cisimciklerinden saflaştırılan proteinin HUVEC üzerinde olan hücre çoğalmasına olan etkisi ve damarlanmaya olan etkisi araştırılmıştır.

VEGF₁₆₅ büyüme faktörü CHO (Chinese hamster ovary) hücrelerinde biyoreaktör kullanılarak rekombinant olarak üretilmiştir. Elde edilen proteinin HUVEC üzerine olan hücre çoğalmasına olan etkisi *in vitro* çalışmalar ile belirlenmiştir (Seong-Baek ve ark., 2007).

Bguyen ve arkadaşları (2016), *E. coli* Origami2 (DE3) hücrelerinde VEGF₁₆₅ proteininin amino ucuna eklenen farklı füzyon proteinleri ile ekspresyon seviyelerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada maltoz bağlanma proteini ile füzyon halde üretilen VEGF₁₆₅'nin memeli hücrelerinde üretilen ile benzer aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

1. KURAMSAL TEMELLER

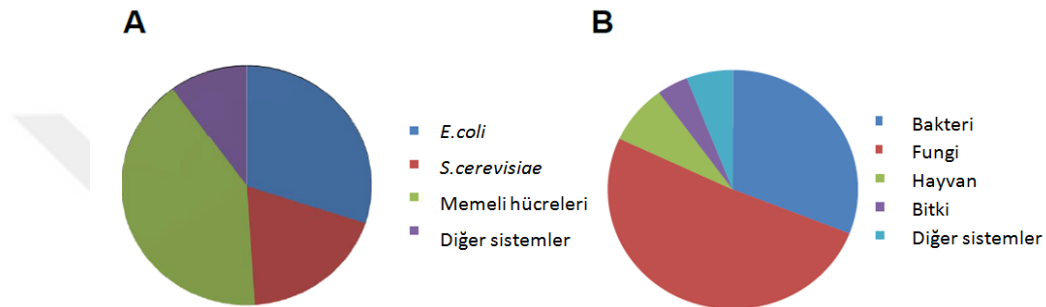
2.1. Rekombinant Protein Üretimi

Enzimleri de içeren protein yapıdaki moleküllerin, hücre sinyal mekanizması, bağışıklık sistem ve hücre yaşam döngüsü gibi fonksiyonel süreçlerde önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Birçok insan proteini önemli etkilere sahip olup farmasötik açıdan büyük potansiyele sahiptir. Bununla birlikte doğal kaynaklardan basit proteinlerin ekstrakte edilmesi yüksek maliyetli alt akım işlemleri, düşük verimlilik ve ekstraksiyon süresince kontaminasyon riskini beraberinde getirmesi gibi birçok nedenden dolayı oldukça sınırlı verim elde edilmesine neden olur (Porro, Sauer ve ark., 2005). İlk rekombinant protein olan insan insülinin *E. coli*'de üretimi ve sonrasında klinik kullanımı için onaylanması (1992) ile rekombinant DNA teknolojisini ve protein mühendisliğini protein üretimi için oldukça verimli ve tercih edilebilir bir teknoloji haline getirmiştir. 300 üzerinde farmasötik protein ve antikor, 100 milyar dolardan fazla satış ve yıllık %15-18 büyüme ile pazarda yerini almaktadır (Langer, 2012; Schröder, 2008). Bunun yanında, 240 kadar monoklonal antikor ve 120 rekombinant proteinin klinik denemeleri devam etmektedir (Walsh, 2010). Buna paralel olarak, endüstriyel enzimlerin toplam pazar bütçesi 2009 yılında 5.1 milyar dolara ulaşmış ve bu rakamın 2013 yılında 6.5 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Freedonia Group 2009).

2.2. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri

Biyoteknolojide rekombinant proteinlere olan talebin artışı güçlü konakçı hücre, verimli ekspresyon sistemleri ve uygun kültür şartları arayışını beraberinde getirmiştir. Pazara sunmak için düşük maliyette en yüksek miktarda üretim genellikle sınırlayıcı olmaktadır (Werner 2004). Bunun yanında proteinin kalitesi, stabilitesi ve verimliliği dikkat edilmesi gereken diğer önemli etkenlerdir. Şimdiye kadar rekombinant proteinler bakteri, maya, ipliksi mantarlar, böcek hücreleri ve serbest hücre sistemleri gibi farklı hücre fabrikalarında üretilmiştir. Şekil 2.1'de görüldüğü üzere farmasötik proteinlerin

neredeyse yarısı mikrobiyal sistemlerde (~%30 *E. coli*, ~%20 *S. cerevisiae*) kalanı ise çoğunlukla memeli hücrelerinde üretilmiştir (Martíez, Liu et al. 2012). Endüstriyel enzimler için bu oran yarıdan fazlası funguslar, %30'u bakterilerde üretim şeklindedir (Demain ve Vaishnav, 2009). Yukarıda bahsedilen her bir organizmanın rekombinant protein üretimi açısından genel ve spesifik özellikleri Çizelge 2.1'de verilmektedir (Demain ve Vaishnav, 2009; Tokmakov ve Kurotani, 2012).



Şekil 2.1. Rekombinant protein üretiminde kullanılan konukçu hücre tipleri

A) Biyofarmasötik proteinler B) Endüstriyel enzimler

Çizelge 2.1. Protein üretiminde kullanılan farklı hücre sistemlerinin avantaj ve dezavantajları

	<i>E.coli</i>	<i>S.cerevisiae</i>	Memeli hücreleri
Avantajlar	Yüksek hücre yoğunluğu Yüksek verimlilik	Yüksek verimlilik ve düşük maliyet GRAS ² nitelik	Yüksek kalitede protein üretimi İnsan proteinlerinin üretilmesi
Dezavantajlar	Kolay kültür koşulları ve modifikasyon Tüm genom sekansına ulaşabilme Düşük maliyet	Kolay kültür koşulları ve modifikasyon Yüksek veriye ulaşabilme Stabil ekspresyon ve sekresyon PTM ¹	Yavaş büyüme ve düşük verimlilik Yüksek maliyetli kültür şartları Virüs kontaminasyonu Fonksiyon çalışmaları için yetersiz

¹ Post-translasyonel modifikasyonlar

² Genel olarak güvenilir-zararsız kabul edilir (GRAS-Generall recognized as safe)

E. coli rekombinant protein üretimi için kullanılmış ilk organizmadır ve günümüzde yaygın olarak kullanılmaya devam edilmektedir. Bu durumun temel sebepleri olarak yüksek verimlilikte protein eldesi, kuru hücre ağırlığının %50'sine ulaşılabilme (Porro ve Gasser, 2011) ve litrede 100 gram biyokütle şeklinde yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılabilme (Tripathi, 2009) olarak bilinmektedir. Bununla birlikte bakteriler plasmid kararsızlığı ve kısıtlı posttranslasyonel modifikasyonlardan dolayı dezavantajlara sahiptir (Porro ve Gasser, 2011). Ek olarak 60 kDa büyüklükten fazla molekül ağırlığına sahip ve zengin S-S içeriğine sahip proteinlerin *E. coli* aracılığı ile çözünür formda üretiminin uygun olmadığı bilinmektedir (Grauslund ve Nordlund, 2008).

Bakteriyal sistemlere kıyasla maya ekspresyon sistemlerinin sekresyon yollarına sahip olması önemli avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte maya sistemleri proteolitik sinyal peptid işlenmesi, disülfid bağı oluşumu, alt ünitelerin yapılandırılması, glikolizasyon, fosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirilebilmekte ve hedef proteinleri doğal formlarda sekrete ederek kolay alt akım işlemleri gerektirmektedir. (Freigassner ve Pichler, 2009). Ayrıca maya ekspresyon sistemleri *E. coli* ile karşılaştırıldığında toksik pirojen kontaminasyonunu elimine etmektedir ve memeli hücrelerinde gerçekleştirilme olasılığı çok yüksek olan mikrobiyal kontaminasyon ve viral inkübasyonlara sebep vermemektedir (Cregg ve Vedvick, 1993; Çelik ve Çalık, 2011). Lifli mantarlar ile karşılaştırıldığında maya sistemleri daha az endojen protein salgılar. Böylece sonraki işlemlerin maliyetini ve proteolitik degradasyon ihtimali azalmaktadır (Mattanovich ve Branduardi, 2012).

Günümüzde geliştirilmiş *P. pastoris* gibi farklı maya suşları dışında mayalar ve ipliksi mantarlar gerçek memeli posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirilememektedirler (Hamilton ve Davidson, 2006; Jacobs ve Geysens, 2009). İleri çalışmalarda *S. cerevisiae* ile insan doğal yapısındaki olduğu şekilde glikozillenmiş proteinlerin üretiminin mümkün olacağı düşünülmektedir (Amano ve Chiba, 2008; Chigira ve Oka, 2008; De Pourcq ve De Schutter, 2010).

Yaklaşık 40'ın üzerinde rekombinant proteininin genetik olarak iyi tanımlanmış olan, fizyolojisi ve fonksiyonel genomik verileri ile ilgili detaylı veri birikiminin

gerçekleştirildiği ve uzun süredir endüstriyel olarak kullanılmakta olan *Saccharomyces cerevisiae* sisteminde üretimi gerçekleştirilmiştir (Hou ve Tyo, 2012; Petronovic ve Tyo, 2010; Giaver ve Chu, 2002). Bunun yanında terapötik proteinlerin oral yolla probiyotik amaçlı kullanımı yakın gelecekte hedeflenmektedir (Blanquet ve Marol-Bonnin, 2001; Omarave Rash, 2010).

Son zamanlarda *P. pastoris* ile yapılan çalışmalarda özellikle genetik mühendisliği çalışmaları ile insan tipi N-glikozillenmiş protein üretebilme yeteneğinin kazandırılması ile rekombinant protein üretiminde gittikçe daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Choi ve Bobrowicz, 2003). *P. pastoris*, *S. cerevisia* 'a göre yüksek hücre yoğunluklarına olanak vererek etanol ve asetat birikimi olmadan büyüme göstermektedir (Heyland ve ark., 2010). Bunun yanında metanol içeren ortamda büyüme gösterebilmesi olası kontaminasyonların oluşmasına engel olmaktadır (Demain ve Vaishnav, 2009). 2009 yılında ilk biyofarmasötik protein olan kallikrein inhibitör proteini *P. pastoris* organizması kullanılarak üretilmiş ve FDA tarafından onaylanmıştır.

Çin Hamsteri Ovaryum (Chinese Hamster Ovary-CHO) rekombinant protein üretiminde en yaygın kullanılan memeli hücresidir ve insan hücrelerine yüksek oranda benzerliğinden dolayı pazardaki terapötik proteinlerin yaklaşık %50'sinin üretimi için kullanılmaktadır. Biyofarmasötik proteinlerin üretiminde memeli sistemlerinin yaygın olarak kullanılmasının temel sebebi insana ait proteinlerin işlenmesinde kesinlikle gerekli olan modifikasyonlardan biri olan glikolizasyona imkan sağlamasıdır (Walsh ve Jefferis, 2006). Memeli hücrelerinde üretilen proteinler genellikle doğru bir şekilde katlanmakta ve glikozillenmektedir ve doğal formdaki insan proteinleri ile neredeyse aynı farmasötik özelliklere sahiptir (Redwan, 2007). Buna karşın bu sistemler zor kültür şartları ve oldukça kısıtlı üretim ve sekresyon kapasitelerinden dolayı yüksek maliyetlidir (Demain ve Vaishav, 2009).

Genel olarak endüstriyel enzim üretimi için yüksek miktara ve verimliliğe ulaşmak temel hedef olarak bilinirken biyofarmasötik üretimde yüksek kalite daha fazla önem arz etmektedir (Porro ve Gasser, 2011). Bakteriyal sistemler genellikle küçük ve daha az disülfid bağı taşıyan glikolizasyona gerek duymayan proteinlerin üretiminde

kullanılırken (Demain ve Vaishav, 2009); mayalar fonksiyon ve aktivite için özel posttranslasyonel modifikasyonlar gerektiren proteinlerin üretiminde kullanılmaktadır (Ferrer-Miralles ve Domingo Espín, 2009). Bunun yanında protein üretimi mikrobiyal sistemlerde başarısız olma durumunda memeli hücresi, böcek hücresi ve serbest hücre sistemleri gibi daha yüksek ökaryotik konukçu sistemleri tercih edilmektedir (Freigasser ve Pichler, 2009).

2.3. *Kluyveromyces lactis*

Kluyveromyces bir maya cinsi olup, özellikle *Kluyveromyces lactis* türü araştırmalarda ve endüstriyel alanda ‘Genel olarak güvenilir-zararsız’ (GRAS-General recognized as safe) kabul edilmesinden dolayı protein üretimi alanında gittikçe önemi artmaktadır (Spohner ve ark., 2015).

Kluyveromyces 1956’da Albert Jan Kluyver (1988-1956) adlı Hollandalı mikrobiyolog tarafından isimlendirilmiştir ve 2003 yılında genomik sekansa göre yapılan parsinomi analizine göre 6 farklı türe sahiptir (Robinson, 2014). En çok kullanılan iki türü olan *K. lactis* ve *K. marxianus* %15-20 DNA sekansı benzerliği göstermekte olup diğer türlerin aksine katı ve sıvı besi ortamında ksiloz, ksilitol, sellobiyoz, laktoz ve arabinozdan yararlanma yeteneğine sahiptir (Nonklong ve ark., 2008).

K. lactis’in yerli ve yaban türünden yaban türü β -galaktosidazı kodlayan LAC4 ve laktoz permeazı kodlayan LAC12’nin susturulmuş olmasından dolayı laktozu metabolize etme yeteneğini kaybetmiştir. Bu yüzden yerli tür *K. lactis* biyoteknolojide daha çok tercih edilmektedir (Naumov ve ark., 2006).

K. lactis kolonileri pulcherrimin pigmentinin sentezine bağlı olarak krem ile pembe tonları arasında renk gösterir. *K. lactis* genomu %40.3 GC içeriğine sahiptir ve 25-35°C sıcaklık aralığında büyüme göstermektedir. *K. lactis*’in tanımlanmış 21 adet türü süt, yağ, yoğurt, peynir ve diğer fermente kuru ürünlerden izole edilmiştir.

K. lactis büyüme ortamına çok az protein salgılar fakat pGKL1 öldürücü toksik proteininin alt birimi gibi büyük proteinlerin sekresyonunu gerçekleştirebilme yeteneğine sahiptir. Örneğin sekresyon yolu ile rekombinant sığır prokimozin üretimini yüksek konsantrasyon seviyelerinde insan serum albüminin sekresyonu takip etmektedir (Fleer ve ark. , 1991). *K. lactis* hızlı bir şekilde yüksek kültür yoğunluğuna ulaşılabilmesi ve yüksek verimlilikte rekombinant protein üretimini sağlamasından dolayı son yıllarda gıda ve yem sektöründe endüstriyel ölçekte protein üretimi amaçlı kullanılmaktadır. 100’den fazla heterolog protein şimdiye kadar *K. lactis* organizmasında başarılı bir şekilde üretilmiştir. 2010 yılı sonrasında yapılmış olan çalışmalar Çizelge 2.2’de belirtilmektedir.

Çizelge 2.2. *Kluyveromyces lactis* organizmasında üretilen rekombinant proteinler

Protein	EC no	Kaynak organizma	Plasmid	Promotor	Sinyal sekans	Ürün		Referans
						Erlen	Fermentör	
Brazzein		<i>Pentadiplandra brazzeana</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	Sc α -faktör	104 mg/L		Jo ve ark., 2013
Cirsin (saposin likedomain)	4.4.23	<i>Cirsium vulgare</i>	LAC4 int.	KI LAC4	KI α -faktör	4 mg/L		Curta ve ark., 2014
C-reaktif protein		İnsan	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	Sc α -faktör			Dortay ve ark., 2011b
Alfa virüs E2 glikoprotein		Sığır virüs İshal virüsü	LAC4 int.	KI LAC4, KI GAL80				Krijger ve ark., 2012
Enterosin A		<i>Enterococcus faecium</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	Sc α -faktör	10.5 mg/L 34148 U/ml		Borrero ve ark.,2012
Esteraz	3.1.1.1	<i>Thermus thermophilus</i>	pKD1	Sc PGK	KT	0.345 U/mL0.29 U/mL		Rocha ve ark.,2011
Floresans protein		<i>Aequorea victoria e GFP</i>	LAC4 int.	Tr CBH1/ KI LAC4	Tr CBH1	7.37 U		Madhavan ve Sukumaran,2015
Glukoz oksidaz	1.1.3.4	<i>Aspergillus niger</i>	pKD1 pKD1 URA3	Sc PGK Km INU1 Km INU1	KT Km INU1 Km INU1	205 U/g 158 U/g 170 U/g		Rocha ve ark.,2010
Glikoprotein V (GP5)		Yüksek patojenik PRRS virüs	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	KI α -faktör			Zhao ve ark., 2014
Glikolat redüktaz	1.1.1.79	<i>Arabidopsis thaliana</i>	pKD1			2 g/L	15 g/L	Koivistoinen ve ark.,2013
GDP- mannoz 3,5-epimeraz	5.1.3.18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI		30 g/L		Rose ve ark.,2013
Hemaglutinin		<i>Avian influenza Virus H5N2</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI				Tsai ve ark., 2011
Heparan sülfat 6-O- sülfotransferaz	2.8.2.x	Domuz	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	Sc α -faktör			Zhou ve ark.,2011
İnülinaz	3.2.1.7	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	pKD1, URA3		Sc α -faktör	391 U/mL		Yu ve ark.,2010
B-Lactoglobulin		Koyun	pKD1	Sc PGK	Doğal	50 mg/L		Rocha ve ark.,2010
Lipaz	3.1.x.x	Serratia sp.	pKD1	KI LAC4	Sc α -faktör	1279.4 U/ml		Siekstele ve ark.,2015

Çizelge 2.2. *Kluyveromyces lactis* organizmasında üretilen rekombinant proteinler (devam)

Protein	EC no	Kaynak organizma	Plasmid	Promotor	Sinyal sekans	Ürün		Referans
						Erlen	Fermentör	
Lipaz A	3.1.1.1	<i>Candida antarctica</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	Sc α -faktör	237.5 mg/L		Morka ve ark., 2014
Lizozim	3.2.1.17	İnsan	rDNA int.	KI GAL7	KT		280,4 U/ml	Ercan ve Demirci, 2015
Nöraminidaz	3.2.1.18	Geflügelpest virüs H5N2	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	KI α -faktör			Tsai ve ark., 2011
Pektin liyaz	4.2.2.10	<i>Penicillium griseoroseum</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	KI α -faktör			Colombo ve ark., 2014
Fosfolipaz A2	3.1.1.4	<i>Lactobacillus casei</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	KI α -faktör	2.16 U/ml		Wang, 2015
Procardosin-B		<i>Cynara cardunculus</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	KI α -faktör	5.5 U/ml		Alkmeida ve ark., 2015
α -L-Ramnosidaz	3.2.1.40	<i>Aspergillus terreus</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	KI α -faktör	200 mg/mL		Spohner ve ark., 2015
Sakazin A		<i>Lactobacillus sakei</i>	LAC4 int.	KI LAC4	KI α -faktör	23 mg/L		Jiménez ve ark., 2013
Tek zincir antikor fragmanı (scFv-ox)			LAC4 int.	KI LAC4, KI GAL80	Sc α -faktör		4,4 mg/L	Krijger ve ark., 2012
Streptavidin/Pektin liyaz kimera		Kimera (<i>Streptomyces avidinii</i> / <i>Penicillium griseoroseum</i>)	LAC4 int.	KI LAC4	KI α -faktör	9.2 U/ml		Colombo ve ark., 2010
Süperoksit dismutaz	1.15.1.1	<i>K. lactis</i>	pKD1	KI ADH4	KT	9.6 U/ml		Raimondi ve ark., 2010
Virüs partikül VP1		Murin Polyomavirus	LAC4 int.	KI LAC4, KI GAL4, KI GAL80				Simon ve ark., 2013
Ksilanaz	3.2.1.8	<i>Bacillus pumilus</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	KI α -faktör	273 U/mL		Thomas ve ak., 2015
		<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	Sc α -faktör	115 U/mL		Zhang ve ark., 2014
		<i>Trichoderma reesei</i>	LAC4 int.	KI LAC4 PBI	KI α -faktör		465U/mL	Fuzi ve ark., 2014

2.3.1. Gıda ve yem endüstrisi uygulamaları

K. lactis laktozu fermente edebilme özelliğinden dolayı süt endüstrisinde doğal (β -galaktosidaz) ve rekombinant (kimozen) üretimde yaygın olarak kullanılmaktadır. β -galaktosidaz laktozsuz süt ve prebiyotik galakto-oligosakkarit üretiminde kullanılmaktadır. *K. lactis* LAC4 ve LAC12 genleri laktozun fermentasyonunu kolaylaştırıldığı için diğer maya türlerine transferi gerçekleştirilmektedir (Domingues ve ark., 2010). *K. lactis* ile üretilen rekombinant sığır kimozen geleneksel rennete göre yüksek aktivite göstermektedir ve peynir endüstrisi için önemli bir protein haline gelmiştir (Almeida ve ark., 2015). *K. lactis* kullanılarak elde edilen diğer ticari proteinler inülinaz, fosfolipaz B, kitinaz ve tatlandırıcı protein brazzeindir (Jo ve ark., 2013). Ayrıca *K. lactis* bebek gıdalarında, fermente süt içeceği olan kefir üretiminde ve laktat, şeker asiti D-ksilonik asit gibi proteinlerin üretiminde kullanılmaktadır (Magalhães ve ark., 2011; Toivari ve ark., 2012).

2.3.2. İlaç endüstrisinde uygulamalar

Süt endüstrisinde başarılı uygulamaların ardından *K. lactis* farmasötik endüstrisinde heterolog proteinlerin büyük ölçekte üretiminde bir ev sahibi olarak gelişme göstermiştir. Örnek olarak otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılan interlökin 1- β 'nin üretimi verilebilir (Fleer ve ark., 1991; Maedler ve ark., 2009). *K. lactis* kullanılarak üretilen rekombinant interferon- α kanser tedavisi, akut ve kronik Hepatit B ve kronik Hepatit C tedavisinde kullanılmaktadır (Musch ve ark., 2004). *K. lactis* ayrıca hematopoetik sistem hastalıklarına karşı mücadele etmek için kullanılan makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF-macrophage colony-stimulating factor) üretiminde kullanılmıştır (Hua ve ark., 1994). Bunların ötesinde *K. lactis* HSA, diyabet tedavisinde insülin prekürsörü olan β -laktoglobulin ve çeşitli antikorların üretiminde uygulamalara sahiptir (Feng ve ark., 1997; Robin ve ark., 2003; Saliola ve ark., 1999; Swennen ve ark., 2002).

K. lactis farklı izoformlarda bulunan insana ait proteinlerin *in vivo* fonksiyon ve komplementasyon analizini kolaylaştırmaktadır. *S.cerevisiae*'da olduğu gibi *K. lactis*

genom duplikasyonu geçirmemekte ve bundan dolayı birçok enzim ve diğer proteinler tek bir formda bulunmaktadır. Bu nedenlerden dolayı *K. lactis* insan hastalıklarının ve hücrel savunma mekanizmalarının araştırılmasında uygun bir organizma olarak görülmektedir (Bharadwaj ve ark., 2010; González Siso ve Cendán, 2012).

2.4. *K. lactis* Protein Ekspresyon Kiti (New England Biolabs)

K. lactis protein ekspresyon kiti bir genin *K. lactis* maya hücresine klonlanması ve ekspresyonun sağlayan bir sistemdir (Şekil 2.1 ve 2.2). Proteinler pKLAC2 ekspresyon vektörü kullanılarak hücre içinde ya da hücre dışına salgılanarak eksprese edilebilmektedir (Şekil 2.3).

K. lactis sisteminde protein sekresyonu için ilgili genin vektör içerisinde yer alan α -mating faktörünün alt bölgesine klonlanması hedef genin α -MF faktörü ile füzyon olarak ekspresyonunu sağlamaktadır (Şekil 2.4). α -MF domaini proteinlerin maya sekresyon yol izi ile taşınmasını yönlendirir. α -MF füzyon proteini endoplazmik retikulumdaki sinyal peptidaz ve golgideki Kex proteaz tarafından ardışık işleme tabi tutulur ve böylece ilgili proteinin büyüme ortamına doğal formda sekresyonu sağlanır (Şekil 2.1).

K. lactis'te ekspresyon *E.coli* transkripsiyonel aktivitesi giderilmiş LAC4 promotörü ($P_{LAC4-PBI}$) kontrolünde gerçekleşmektedir. α -MF domainindeki sinyal peptit füzyon proteini ER lümenine yönlendirir ve sinyal peptidaz (SP) ile kesilerek uzaklaştırılmaktadır. Salgı vezikülleri füzyon proteini golgiye taşır ve burada Kex-endoproteaz α -MF prodomainin keserek istenilen protein işlenmiş formda salgılanmaktadır. İlgili protein daha sonra veziküller aracılığı ile proteinin hücreden salınacağı plasma membranına taşınmaktadır.

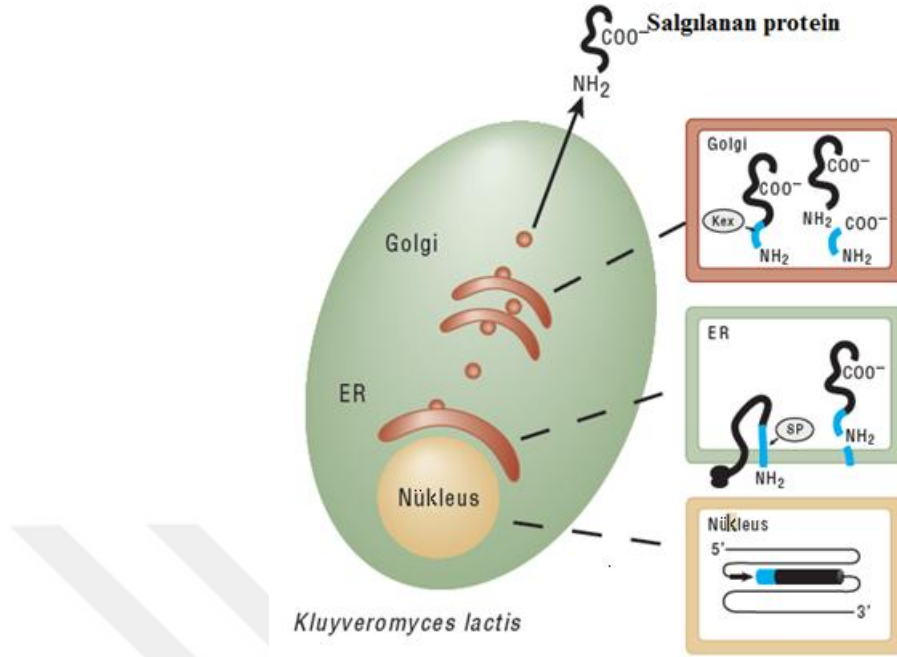
İlgili geni taşıyan pKLAC2 vektörü ekspresyon için öncelikle *SacII* ya da *BstXI* enzimleri kullanılarak lineer ekspresyon kaseti oluşturulur. Bu ekspresyon kaseti *K. lactis* genomundaki LAC4 lokusuna homolog rekombinasyon ile entegre olur. pKLAC2

vektöründeki fungal asetamidaz geni (*amdS*) asetamid içeren azotsuz minimal besiortamında, entegre halde ekspresyon kaseti taşıyan maya hücrelerinin seçilimini sağlamaktadır. Sadece *amdS* eksprese eden hücrelerde asetamidin amonyağa çevrimi ile hücrelerin azot ihtiyacı karşılanmaktadır. Böylece ekspresyon kasetinin çoklu kopyaları daha fazla rekombinant protein üretimine olanak sağlamaktadır. *K. lactis* protein ekspresyon kiti ile sağlanan *K. lactis* GG799 hücreleri endüstriyel bir izolat olup okzotrof değildir, hızlı büyüme ile yüksek hücre yoğunluğuna ulaşarak heterolog proteinleri etkin bir şekilde ekspresyonunu sağlamaktadır.

K. lactis ekspresyon kiti ile ökaryotik ve prokaryotik proteinlerin sekresyonu gerçekleştirilebilmektedir. Hücrelerden normal şartlar altında salgılanan proteinler (sitokinler, serum albuminler, antikor fragmentleri ve glikosidazlar vb.) yüksek verimlilikte *K. lactis* 'te üretilmektedir. Çalkalamalı flasklar kullanılarak litrede 10-50 mg verimliliğe ulaşılabilir. Yüksek yoğunluklu fermentasyon koşullarında verim daha da artırılabilir. SDS-PAGE ve protein boyama, Western Blotlama teknikleri ile kültür ortamından salınan rekombinant protein analiz edilebilir. Salgılanan protein hücre içerisinde posttranslasyonel modifikasyonlara (asparagin bağlı glikolizasyon gibi) uğramaktadır.

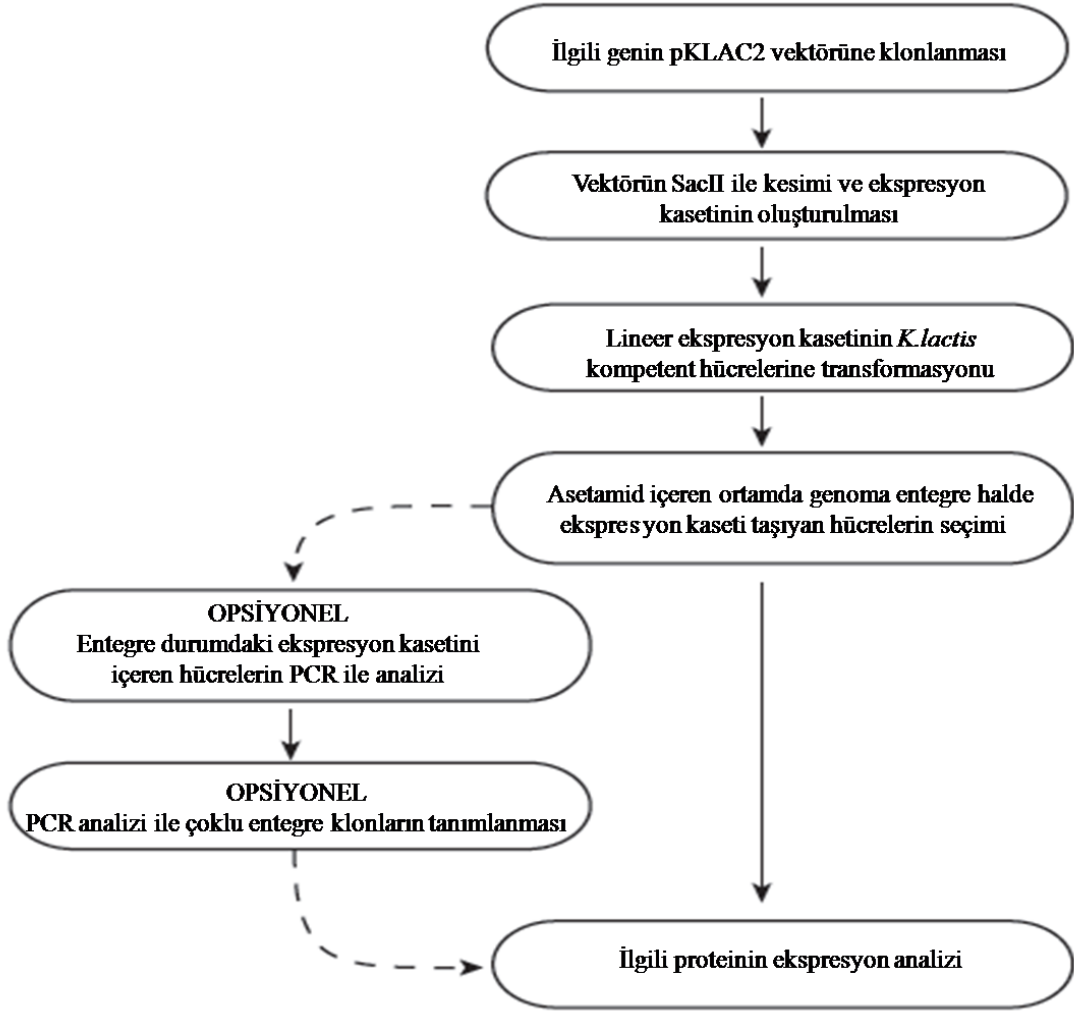
K. lactis ekspresyon sisteminin rekombinant protein üretiminde sağladığı avantajlar şunlardır:

- Rekombinant proteinlerin yüksek seviyede ve ölçülebilir nitelikte ekspresyonu
- Kısa sürede yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılabilme
- Çoklu proteinlerin eş zamanlı ekspresyonu
- Hızlı ve kolay transformasyon
- Yüksek maliyetli antibiyotik gereksinimi olmaması

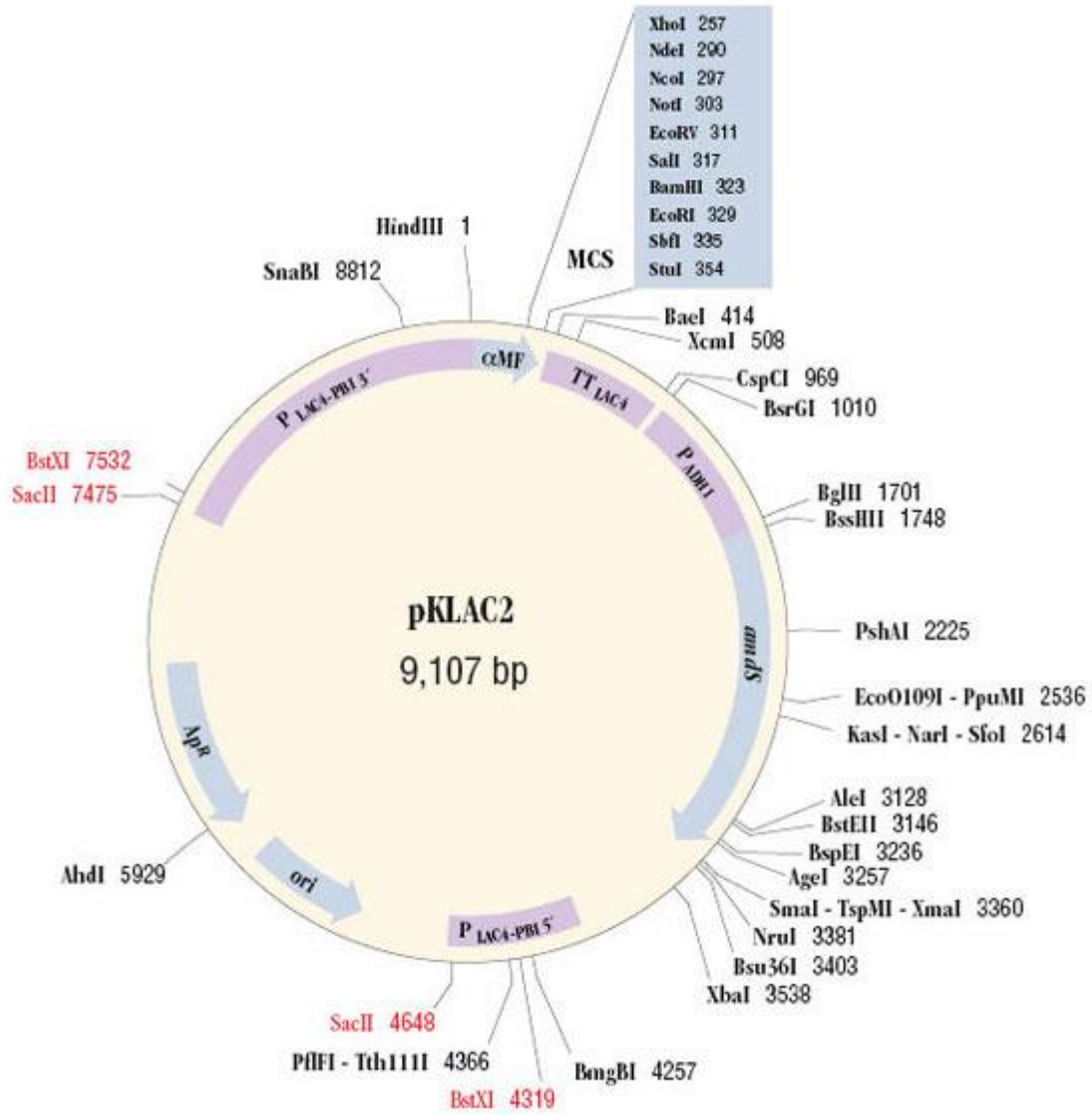


Şekil 2.2. *K. lactis*'te salgı proteinin işlenmesi

Şekil 2.2'de görüldüğü üzere çekirdekte ilgili gen (siyah) ve α-MF füzyon olarak maya genomuna entegre halde bulunmaktadır. Siyah ok ile gösterilmiş olan $P_{LAC4-PBI}$ promotoru altında ekspresyon gerçekleşmektedir. (ER: endoplasmik retikulum; SP: sinyal peptidaz)



Şekil 2.3. *K. lactis* ekspresyon kiti ile rekombinant protein üretimi



Şekil 2.4. pKLAC2 ekspresyon vektörü

pKLAC2 9107 bp büyüklüğünde bir ekspresyon vektörüdür. LAC4 promotoru ($P_{LAC4-PBI}$) β -laktamaz (Ap^R) ve PMB1 origin DNA'sı ile ayrılmıştır ve bu DNA'lar *E.coli*'de büyümeyi sağlar. α -mating faktör sekresyon sekansı (α -MF), MCS (multiple cloning site-çoklu klonlama bölgesi) ve LAC4 transkripsiyon terminatörü (TT) promotorun 3' ucunun ardından gelmektedir. Maya promotoru P_{ADH1} seçici markör gen asetamidazin (*amdS*) ekspresyonunu sağlamaktadır. *SacII* ve *BstXI* *K. lactis* genomuna LAC4 promotoruna entegre olabilen lineer DNA fragmenti elde etmek için gereklidir.

	#S1274 LAC4mt Promoter Sequencing Primer	
9009	GAATTGTGAGCGGATAACAAGCTCAACACTTGAAATTTAGGAAAGAGCAGAATTTGGCAA	9068
	HindIII	
9069	AAAAAATAAAAAAAAAATAAACACATACTCATCGAGAAGCTTGAAAAAATGAAATTC	22
	M K F	
23	TCTACTATATTAGCCGCATCTACTGCTTTAATTTCCGTTGTTATGGCTGCTCCAGTTTCT	82
	S T I L A A S T A L I S V V M A A P V S	
	#S1275 α -Mating Factor Sequencing Primer	
83	ACCGAAACTGACATCGACGATCTTCCAATATCGGTTCCAGAAGAGCCTTGATTGGATTTC	142
	T E T D I D D L P I S V P E E A L I G F	
143	ATTGACTTAACCGGGGATGAAGTTTCCTTGTTGCCTGTTAATAACGGAACCCACACTGGT	202
	I D L T G D E V S L L P V N N G T H T G	
	XhoI	
203	ATTCTATTCTTAACACCACCATCGCTGAAGCTGCTTTCGCTGACAAGGATGATCTCGAG	262
	I L F L N T T I A E A A F A D K D D L E	
	NdeI NcoI NotI EcoRV Sall	
263	AAAAGAGAGGCTGAAGCTAGAAGAGCTCATATGTCCATGGGCGGCCGATATCGTCGAC	322
	K R E A E A R R A H M S M G G R D I V D	
	BamHI EcoRI SbfI StuI	
323	GGATCCGAATTCCTGCAGGTAATTAAATAAAGGCCTTGAATCGAGAATTATACCTAGA	382
	G S E F P A G N *	
383	TAAGTATGTACTTACAGGTATATTTCTATGAGATACTGATGTATACATGCATGATAATAT	442
443	TTAAACGGTTATTAGTGCCGATTGTCTTGTGCGATAATGACGTTCTATCAAAGCAATAC	502
	#S1276 pKLAC1 Reverse Sequencing Primer	

Şekil 2.5. pKLAC2 vektörüne ait çoklu klonlama bölgesi

Şekil 2.5'te görüldüğü şekilde pKLAC2 α -mating sekresyon lider sekansı (mavi) ve $P_{LAC4-PBI}$ promotorunun ardından gelen çoklu klonlama bölgesi içermektedir. Çoklu restriksiyon bölgesine ait restriksiyon enzimleri şekil üzerinde gösterilmiştir. Yarım ok ile belirtilen sekanslar NEB tarafından tedarik edilen vektöre spesifik sekanslama primerlerine aittir. Bu primerler ile ilgili genin genoma çoklu ya da tekli entegrasyonu analiz edilebilmektedir.

2.5. Büyüme Faktörleri ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

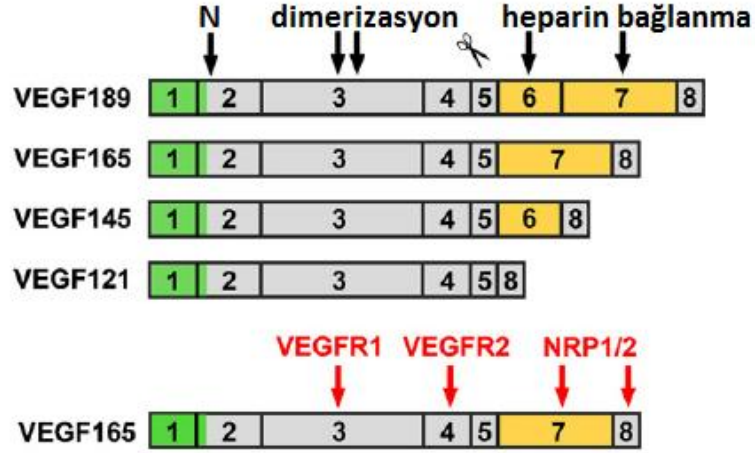
Son yıllarda büyüme faktörleri ve onların fonksiyonları üzerine önemli çalışmalar yapılmaktadır. Büyüme faktörlerinin biyolojik ve fenotipik etkileri onlarca yıl öncesinde yapılan çalışmalar ile tanımlanmıştır. Fonksiyonlarının aydınlatılması ve işlevlerinin tanımlanması ile büyüme faktörlerinin insan hastalıklarına karşı teröpatik potansiyelinin araştırılması son yıllarda ivme kazanmıştır. Temel olarak hücre farklılaşması, hücre göçü ve morfogenezinde etkili olan büyüme faktörlerinin tümör oluşumundaki farklılaşma süreçleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Farklılaşma mekanizması antagonistik etkiden tümör oluşumu (tümör başlangıcı gelişimi, invazyon ve metastaz) olarak görünse de büyüme faktörlerinin geniş spektrumdaki fonksiyonları farklılaşmanın negatif ve pozitif düzenlenmesi, hücre poliferasyonu ve kanser gelişimi olarak birleştirilebilir. Bununla bağlantılı olarak sinyal iletiminin düzenlenmesi hücrenin hücre dışı çevreden aldığı uyarılara bağlı olarak gerçekleşir. Sonuç olarak büyüme faktörleri tümör oluşumunun yanı sıra hücre hareketliliği, kanser hücrelerinin yayılımı, birikimi ve metastatik lezyonların büyümesinde önemli etkilere sahiptir (Sherbet G.V.,2011)

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), ilk olarak 34-42 kDa büyüklüğüne sahip olan ve deride vasküler geçirgenliği arttıran homodimer yapıda bir protein olarak tanımlanmıştır. Daha sonra bu protein kobay domuzlarına ait karaciğer kanser hücreleri kültüründe kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra vasküler geçirgenlik faktörü (vascular permeability factor-VPF) olarak tanımlanmıştır. VPF hücreler arası vasküler geçirgenlikten ve katı ve asit tümörlerde plazma proteinlerince zengin sıvının birikiminden sorumlu faktör olarak bilinmektedir. 1989 yılında Ferrara ve Henzel sığır foliküler hipofiz hücrelerinden elde ettikleri bir büyüme faktörü tanımlamışlardır ve VEGF olarak isimlendirmişlerdir. Sekanslama sonuçları ile VEGF'nin VPF ile aynı olduğu belirtilmiştir. VEGF' endotel hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması için gerekli olduğu belirtilmiştir (Leung ve ark., 1989).

2.6. VEGF Ailesi ve İzofomları

VEGF ailesi VEGF-A (genel olarak VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve placentel büyüme faktörlerini (placental growth factor-PLGF) kapsamaktadır. Bu glikoproteinler platelet kaynaklı büyüme faktörünü (Platelet derived growth factor-PDGF) de içeren yapısal büyüme faktörü süper ailesine aittir. VEGF, PDGF ailesine yapısal ve fonksiyonel benzerliğinden dolayı tirozin kinaz reseptörlerine karşı yüksek afiniteye sahiptir. VEGF ve PDGF reseptörleri alt aileleri evrimsel olarak bağlantılı reseptörlerdir (Neufeld ve ark., 1999).

İnsan VEGF-A, 8 farklı ekzon içerebilmektedir ve alternatif ekzon uç birleştirme mekanizması ile en az 5 farklı izoform yapısı göstermektedir. En yaygın olarak bilinen izoformları 121, 145, 165, 189 ve 206 amino asitten oluşmaktadır (sırasıyla VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆) (Tischer ve ark., 1991) (Şekil 2.6). 148, 162 ve 183 amino asitten oluşan izoformları da (VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂ ve VEGF₁₈₃) mevcuttur. VEGF₁₆₅ daha çok VEGF_{165b} olarak tanımlanmaktadır. Uç birleştirme ile mekanizması sonucu oluşan farklı varyantlar heparin ya da heparin sülfata olan bağlanma özelliklerine göre farklılık gösterirler. Ekzon 1-5 tarafından kodlanan amino asitler tüm izoformlarda korunmuş olarak bulunurken ekzon 6 ve 7'de alternatif uç birleştirme mekanizması işlev göstermektedir. Bu ekzonlar reseptöre bağlanmayı ve çözünürlüğü etkileyen 2 farklı heparin bağlanma domaini kodlamaktadır. Ekzon 6 kodlayan izoformlar (VEGF₁₄₅, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆) hücre yüzeyine sıkı bir bağlanma gösterirler. Ekzon 6 taşımayan izoformlar difüzlenebilen yapıya sahiptirler. Ekzon 6 içermeyen VEGF₁₆₅ orta derecede, Ekzon 6 ve 7 içermeyen VEGF₁₂₁ ise yüksek derecede difüzlenebilen özelliği gösterebilmektedir (Hoeben ve ark., 2004).



Şekil 2.6. İnsan VEGF-A izoformları ve reseptör bölgeleri (Raimondi ve Ruhrberg, 2013)

VEGF₁₆₅ insanda en yaygın olarak bulunan ve anjiyojenez üzerinde en etkili izoformdur. Heparin ve ekstraselüler matsriksin ikisine de bağlanma gösterir. VEGF_{165b} daha sık görülen varyantı olup VEGF₁₆₅ ile aynı amino asit sayısına sahiptir fakat karboksil ucunda ekzon 8 tarafından kodlanan 6 amino asit farklılık göstermektedir. VEGF₁₆₅'nin karboksil terminal bölgesi mitojenik sinyal için önemlidir ve bu bölgede meydana gelen değişiklik fonksiyonel olarak değişime sebep olmaktadır. VEGF'nin diğer izoformlarının aksine VEGF_{165b} bir endojenik inhibitördür ve VEGF tarafından indüklenen proliferasyonu ve endotelial hücrelerin göçünü azaltan bir etkiye sahiptir. VEGFR-2 (Flk-1/KDR) reseptörüne bağlanma gösterse de VEGF_{165b} bağlanması, reseptör fosforilasyonu ve sinyal yollarının aktivasyonu ile sonuçlanmamaktadır (Woolard ve ark., 2004).

VEGF-B; yüksek heparin bağlanma özelliği gösteren bir büyüme faktörüdür ve yapısal olarak VEGF-A ve PLGF'ye benzemektedir. Kalp, iskelet kası ve pankreasta yoğun olarak bulunur ve endotelial hücre fonksiyonunu parakrin yol ile düzenlemektedir (Shintani ve ark., 2004).

VEGF-C; PC3 prostat kanseri hücrelerinden izole edilmiştir ve VEGF reseptör 3 (VEGFR-3)'ün spesifik aktivatörü olarak tanımlanmıştır. VEGFR-3'e bağlanmaktadır,

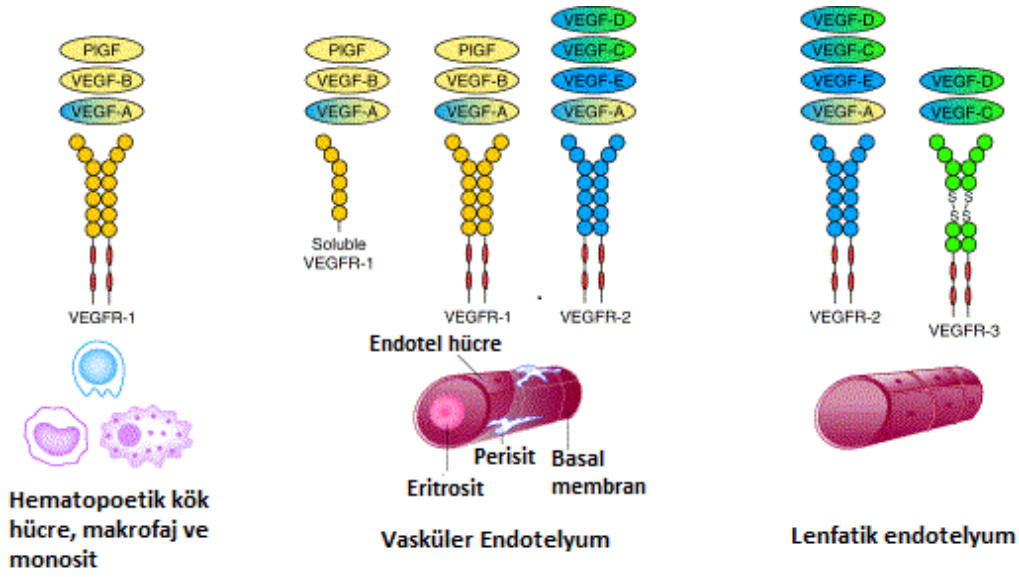
VEGFR-2 ve VEGFR-3 'ün tirozin fosforilasyonunu indüklemektedir (Houkov ve ark, 1996). Erişkinde en fazla kalp, plesenta, over ve ince bağırsak dokusunda bulunur. Hiperplazi ve lenfatik kanallarının ön oluşumunu teşvik eder (Güzel, 2015).

VEGF-D; VEGFR-2 ve VEGFR-3'e ligand olarak bağlanmaktadır. VEGF-C ile birlikte lenfatik endotelial hücreleri için mitojenik olmakla birlikte bu hücrelerin VEGFR-3'e bağlanması ile canlılığını desteklemektedir (Makinen ve ark., 2001).

VEGF-E; Orf virüs tarafından kodlanmaktadır ve VEGF-A ile %20-25 homoloji göstermektedir. VEGFR-2 reseptörüne bağlanıp aktive ederken VEGFR-1' e bağlanma göstermez ve anjiyogenez için potansiyel bir stimulatördür (Meyee ve ark., 1999).

2.7. VEGF Reseptörleri

VEGF, flt-1 (VEGFR-1), Flk-1/KDR (VEGFR-2) ve flt-4 (VEGFR-3) olmak üzere 3 tane tirozin kinaz reseptörüne bağlanmaktadır. VEGFR-1 ve VEGFR-2 temel olarak vasküler endotelial hücrelerde bulunurken, VEGFR-3 lenfatik endotelial hücrelerde bulunmaktadır. Bu reseptörler ekstraselüler domain, transmembran bölgesi ve tirozin kinaz sekansı içermektedir (Shibuya ve ark. 1990, Therman ve ark. , 1991). Son zamanlarda nörofilin (NRP-1) nöronal arabulucu moleküller için reseptör olup VEGF₁₆₅ için spesifik reseptör izoformu olarak etki gösterir (Soker ve ark., 1998) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. VEGF reseptörleri ve spesifik ligandları (Cross ve ark., 2003)

VEGFR-1(flt-1); 180 kDa büyüklüğünde transmembran proteini olup VEGF-A, VEGF-B ve PlGF'ye yüksek afinite göstermektedir. Alternatif uç birleştirme ile VEGF inhibitörü olarak etki gösteren daha küçük büyüklükte çözünür yapıda formu (soluble flt-1, sVEGFR-1) bulunmaktadır (Tanaka ve ark., 1997). VEGFR-2'ye göre VEGF'e olan afinitesi 10 kat fazladır fakat tirozin kinaz aktivitesi 10 kat daha düşüktür. VEGF'nin daha mitojenik reseptör olan VEGFR-2'ye bağlanmasını önleyen tuzak reseptör olarak işlev göstermektedir (Park ve ark., 1994). Endotel hücrelerine ek olarak monosit, osteoblast, makrofaj, perisit, hematopoetik kök hücre, vasküler düz kas hücreleri ve son zamanlarda karaciğer kanseri hücrelerinde tespit edilmiştir (Barleon ve ark., 1996; Zachary ve Gliki, 2001; Ishida ve ark., 2001; Fan ve ark., 2005). VEGF sinyalizasyonunun sadece VEGFR-1 ekspresyonunun olduğu hücrelerde gerçekleşmesi mitojenik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir ve sVEGFR-1 VEGF'nin VEGFR-1'e bağlanmasını önleyerek düzenleyici olarak etki göstermektedir (Wey ve ark., 2005).

VEGFR-2 (KDR/flk-1); ilk olarak insan endotel hücresi cDNA kütüphanesinde tanımlanmıştır (Therman ve ark., 1991). 230 kDa büyüklüğünde bir glikoprotein olup VEGF, VEGF-C ve VEGF-D'ye bağlanmaktadır ve VEGF'ye VEGFR-1'den daha düşük bir afinite ile bağlanma gerçekleştirmektedir. Endotel hücresi, hematopoetik kök hücre, megakaryositler, retinal öncül hücreler ve vasküler düz kas hücrelerinde eksprese

edilmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda VEGFR-2, küçük hücreli olmayan akciğer karsinoma hücresi (NSCLC- non-small cell lung carcinoma), göğüs kanseri, nöroblastoma ve mide kanseri hücreleri gibi tümör hücre hatlarında gözlenmiştir (Neufeld ve ark., 1999; Ishida ve ark., 2001; Price ve ark., 2001; Meister ve ark., 1999; Tian ve ark., 2001)

VEGFR-3(flt-4); 170 kDa büyüklüğünde glikoprotein olup ilk olarak eritro lösemi ve plasental cDNA kütüphanesinden klonlanmıştır. VEGF-C'nin tam uzunluktaki olgun izoformuna bağlanmaktadır ve embriyonik endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir fakat ekspresyonu kan damarlarının gelişim sürecinde azalırken yetişkin dokuların lenfatik endotelyumunda kısıtlanmaktadır (Kaipainen ve ark., 1995).

Nörofilin-1(NRP-1); semaforin/kollapsin ailesinin nöronal rehber mediatörü olarak nöronal hücrelerde reseptör olarak tanımlanmıştır. NRP-1 endotel hücrelerinde VEGF spesifik reseptör izoformu olarak eksprese edilmektedir. Tirozin kinaz domaini taşımamaktadır ve diğer reseptörlerin VEGF sinyalizasyonuna aracılık etmektedir (Soker ve ark., 1996). NRP-1 sinyal dönüştürmede Flt-1 ve Flk-1/KDR ile ilişkilendirilmiştir. Flk-1/KDR ile reseptör kompleksi oluşturarak VEGF₁₆₅'e bağlanmayı arttırmaktadır. İlginç olarak VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin eksprese edilmediği bazı tümör hücrelerinde bulunmaktadır ve bu hücrelerin daha sonra NRP eksprese ettiği gösterilmektedir. MDA-MB-231 göğüs kanseri hücreleri, akciğer, pankreas, mide ve kolon kanseri hücrelerinde eksprese edildiği bilinmektedir (Bar ve ark., 2005; Lantuejoul ve ark., 2003; Parikh ve ark., 2003, 2004; Akagi ve ark., 2003).

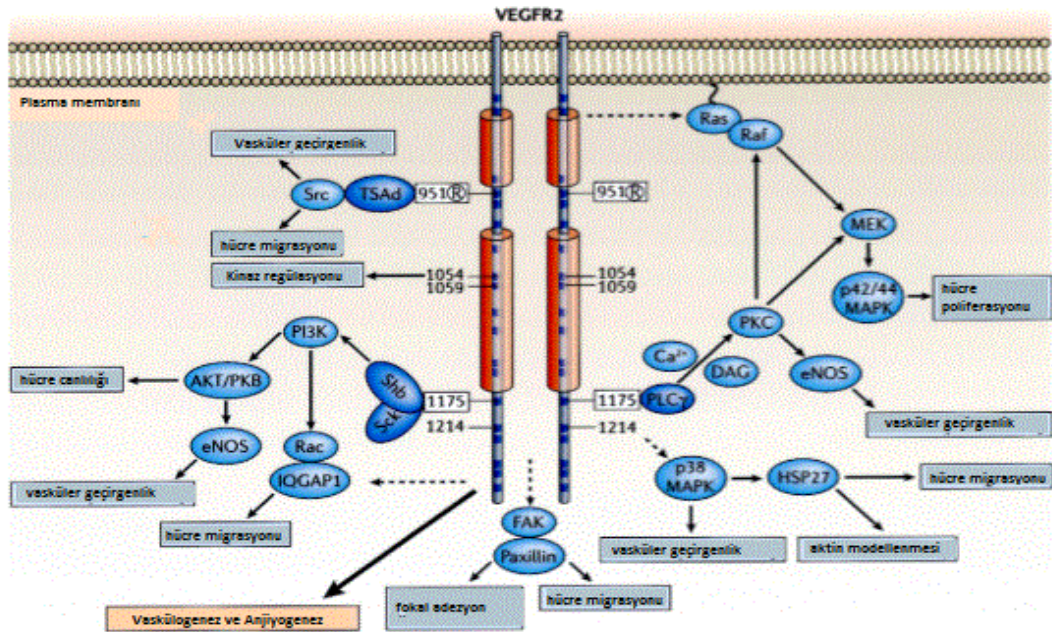
Nörofilin-2(NRP-2); VEGF'e bağlanmaktadır ve NRP-1 gibi sitoplazmik domaine sahip değildir. VEGF₁₆₅'e bağlanırken, VEGF₁₂₁ ve NRP-1'nin aksine VEGF₁₄₅'e bağlanma göstermemektedir. Plesental büyüme faktörünün heparin bağlayan formuna bağlanırken ayrıca VEGFR-1 ile etkileşmektedir (Gluzman ve ark., 2000).

2.8. VEGF Sinyalizasyonu

VEGF'nin temel fonksiyonları canlılığı desteklemek, proliferasyonu uyarmak ve anjiyogeneze katkıda bulunan endotel hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu arttırmaktır. VEGF, bu fonksiyonları tirozin kinaz reseptörleri ile etkileşerek ve alt bölge proteinlerine ileterek gerçekleştirmektedir (Byrne ve ark., 2005).

2.8.1. Hücre proliferasyonu ve gen ekspresyonu

VEGF, VEGFR-2 ve ekstraselüler düzenlenmiş kinaz-1/2(ERK-1/2-extracellular-regulated kinase-1/2) aracılığı ile DNA sentezi ve proliferasyonunu stimüle etmektedir. ERK-1/2 aktivasyonu Ras-Raf-MEK-ERK yol izi ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.8). Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) yol izi VEGF'e cevap olarak hücre proliferasyonu ile ilişkilidir. Panreatik aortik endotel hücrelerinde VEGF'nin VEGFR-2 ekspresyonu ile MAPK yolizini aktive ettiği gösterilirken bu aktivasyonun VEGFR-1 ekspresyonu ile gerçekleşmediği belirtilmiştir (Kroll ve Waltenberger, 1997).



Şekil 2.8. VEGFR2 reseptörü ile VEGF sinyalizasyonu (Roskoski Jr., 2007).

2.8.2. Hücre canlılığı

Serum miktarının azalması gibi stres koşullarında VEGF VEGFR-2 reseptörüne bağlanarak fosfatidil inositol kinaz (PI3-Kinaz) yol izini ve Akt/protein kinaz B (PKB) fosforilasyonunu aktive etmektedir. Akt antiapoptatik sinyalde bulunan bir serin kinaz olup serum bakımından yetersiz HUVEC'nin canlı kalmasını desteklemektedir. PI3-K inhibitörü olan wortmannin inhibitörü kullanılması ile Akt aktivasyonu engellenmekte ve VEGF aracılı canlılık tamamen bloke edilmektedir. VEGF'nin VEGFR-1'e bağlanması bu yolizini aktive etmezken VEGF aracılı canlılığa etki göstermemektedir (Gerber ve ark.,1998).

Endotel spesifik adezyon molekülü $\alpha v\beta 3$ gibi integrin/hücre reseptörleri VEGF sinyal iletiminde rol oynamaktadır. Hücre adezyon molekülü VE-Kaderin VEGFR-2 ile etkileşerek β -katenin ile kompleks oluşturmaktadır ve PI3-Kinaz hücre canlılığını desteklemektedir. VE-Cad genindeki bir bozukluk farelerde endotel hücrelerinin canlılık sinyallerine cevap vermesine engel olmuştur. VEGFR-1'nin VE-Cad kompleksi ile ilişkisi olmadığı bilinmektedir (Carmeliet ve ark., 1999).

2.8.3. Migrasyon

VEGF, endotel hücreleri için kimyasal olarak çekici olup migrasyon ve invazyonda rol oynamaktadır. Endotel hücrelerine ek olarak VEGF, vasküler düz kas hücreleri, monositler, mononükleer fagositler ve polimorfonükleer hücrelerin ve göğüs, lösemi gibi bazı tümör hücrelerin migrasyonunu stimüle etmektedir (Hoeben ve ark., 2004; Barleon ve ark., 1996). VEGFR-1, VEGF-2 ve NRP reseptörleri VEGF aracılı migrasyon ve invazyon ile ilişkilendirmektedir. VEGF hücre migrasyonunu fokal adezyon kinaz (FAK) ve Paxillin ve PI3 Kinaz/Akt yol izi aracılığı ile hücre migrasyonunu uyarmaktadır. FAK aktivasyonu VEGFR-2'nin C terminal bölgesi ile gerçekleştirilmektedir. P38/MAPK stres yol izi ile VEGF aktivasyonu hücre migrasyonu ile ilişkilendirilmiştir ve p38 inhibitörleri migrasyonu azaltmaktadır. VEGF mutantları kullanılarak yapılan çalışmalarda VEGFR-1 ile gerçekleştirilemeyen p38 fosforilasyonun VEGFR-2 ile gerçekleştirilmiş olması VEGFR-2'nin endotel

hücrelerinin (HUVEC) migrasyonunda temel mediatör olduğunu göstermektedir (Gille ve ark., 2001).

2.8.4. Reseptör etkileşimi

VEGF reseptörleri sinyal iletimini arttırmak amacıyla birbirleri ile etkileşim gerçekleştirirler. Tirozin kinaz domaini içermeyen NRP reseptörü sinyal iletiminin devamlılığı için diğer reseptörler ile etkileşmektedir. NRP-1, VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile; NRP-2, VEGFR-1 ile etkileşerek kompleks oluşturmaktadır. NRP-1, diğer büyüme faktörlerinin ekspresyonun gerçekleşmediği tümör hücrelerinde canlılık faktörü olarak davranmaktadır (Fuh ve ark., 2000).

Nöronal hücrelerde Nörofilin reseptörleri fonksiyonel semaforin 3A (Sema3A) reseptörü oluşturmak için Plexin ailesi ile kompleks oluşturarak biyolojik sinyalleri iletmektedir. Plexin ailesi tirozin kinaz reseptörlerini eksprese edilmediği tümör hücrelerinde NRP'leri eksprese ederek VEGF sinyalizasyonunda önem taşımaktadır (Takahashi ve ark.,1999).

Gray ve arkadaşları (2005), NRP-1'in yüksek seviyede ekspresyonunun pankreatik tümör hücre hatlarının (Panc-1) *in vivo* gelişimini inhibe ettiğini ve hücre göçünü azalttığını göstermiştir. VEGF/Sema3a domaini taşımayan NRP-1 ile tam uzunluktaki NRP-1'yi karşılaştırdıklarında aynı sonuçları elde etmişler ve bu sinyallerin VEGF ve Sema3A'dan bağımsız olduğunu belirtmişlerdir. Bu hücreler diğer klasik VEGF reseptörlerini ya da NRP-1 koreseptör Plexin-A1 eksprese etmektedir. siRNA kullanılarak NRP-1 ekspresyonunun azaltılması, hücre göçünü ve *in vivo* tümöjenisiteyi arttırmaktadır.

2.9. VEGF ve Embriyogenez

VEGF seviyesi embriyo gelişimi sırasında vasküler ağın oluşumunda oldukça önemlidir. Farelerde tekli VEGF allelindeki kayıp, embriyonun 11 ve 12. günlerinde vaskülerizasyon bozukluğu sonucu ölüme neden olmaktadır (Ferrara ve ark. 1996).

VEGF reseptörleri erken dönemde önemli role sahip olup farelerde VEGFR-1'de gerçekleşen delesyon 8.5 günlük embriyolarda fonksiyonel kan damarlarındaki eksiklikten dolayı ölüm ile sonuçlandığını göstermektedir. İlginç olarak sadece tirozin kinaz domaininden yoksun ve ekstraselüler domainin olduğu durumda embriyolarda normal damar oluşumu gerçekleşmekte ve canlılık devam etmektedir. VEGFR-1'in çözünür formu (sVEGFR-1) VEGFR-2 ile kompleks oluşturarak VEGF ile bağlanmayı önlemektedir ve daha mitojenik etki gösteren VEGFR-2 sinyalizasyonunu inhibe etmektedir (Kendall ve ark., 1996).

VEGFR-2 eksprese edildiği embriyonik anjiyoblast, kan adacıkları ve anjiyojenik kan damarlarında gelişim döneminde kritik rol oynamaktadır. VEGFR-2 eksprese olmayan fare embriyolarında, endotel ve hematopoetik hücrelerdeki gelişimsel bozukluktan dolayı 8.5-9.5 günlerde ölüm görülmektedir (Tammela ve ark.,2005).

VEGF-C/VEGF-D sinyalizasyonun VEGFR-3 aracılığı ile gerçekleştirilmesi embriyonik vasküler sistem ile aynı zamanda lenfatik sistemin devamlılığı için önemlidir. 9.5 embriyonik gününden sonra VEGFR-3'teki herhangi bir olumsuzlukta kardiyovasküler bozukluk ve normal olmayan primer vasküler pleksus meydana gelirken vasküler gelişim ve ağ oluşumu normal şekilde gerçekleşmektedir. Nörofilin-1 eksprese edildiği nöronların nöronal sisteminin gelişimde rol oynamakta ve sınıf 3 semaforinler için reseptör görevi göstermektedir. NRP-1 taşımayan mutant fareler üzerinde yapılan çalışmalarda sinir liflerinin yönlendirilmesinde NRP-1'nin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. NRP-1 ayrıca gelişim süresince vaskülojenezde etkilidir. NRP-1 geninin silindiği fare embriyosunda embriyonik vaskülerizasyonda meydana gelen bozukluklar 12-13. günlerde hücre ölümleri ile sonuçlanmaktadır. Hem merkezi sinir sistemi hem de periferik sinir sistemi vaskülerizasyonu etkilemektedir. Vasküler

gerileme gözlenirken bu durumun tersi NRP-1'i aşırı eksprese eden farelerde aşırı kan damarı oluşumu meydana gelmektedir (Kawakami ve ark.,1996).

NRP-2'nin yok olması embriyonik ölüme ve normal olmayan vasküler fenotipe neden olmaz iken, NRP-1 ve NRP-2'nin birlikte yok edilmesi sadece NRP-1'nin yok edilmesine göre daha ciddi anormal vasküler fenotip oluşumu ile fare embriyoların 8.5 günde ölüm ile sonuçlanmaktadır. Tavuk embriyolarının erken gelişim evresinde, NRP-1 ekspresyonu arteter ile sınırlandırılmış iken, NRP-2 gelişen vasküler sistemde temel olarak bulunmaktadır, nörofilin ise arteriyel/venöz farklılaşmasında rol oynamaktadır. NRP-2'nin lenfatik damar oluşumu ile ilişkili olduğu ve lenfatik endotel hücrelerinde VEGFR-3 ile birlikte eş zamanlı eksprese olduğu bilinmektedir. NRP-2'ye sahip olmayan farelerde lenfatik damar ve dokularda kılcal damar oluşumu görülmemekte ya da ciddi azalma göstermektedir (Herzog ve ark., 2001).

Özet olarak VEGF reseptörleri normal embriyonik anjiyogenez ve gelişim için gerekli iken, VEGF'nin ve reseptörlerinin kontrollü ekspresyonunun normal büyüme ve gelişim için gerekli olduğu bilinmektedir (Bye ve ark., 2005).

2.10. Normal Yetişkin Fizyolojisinde VEGF

Normal sağlıklı erişkinlerde, VEGF sinyali büyük oranda yara iyileşmesi ve kadın üreme döngüsü ile sınırlıdır.

2.10.1. Yara iyileşmesi

Yara iyileşmesinde, aktive trombositler yaralanma üzerine VEGF dahil olmak üzere çeşitli sitokinleri salgılamaktadır. VEGF, dolaşımdaki nötrofiller ve monositleri, normal inflamatuvar cevabın bir parçası olarak yaralanma bölgesine çekmektedir. Ayrıca monosit, keratinosit ve endotel hücreleri tarafından kılcal damarlara da etki edebileceği yara bölgesinde serbest bırakılır (Hoeben ve ark.,2004). VEGF ayrıca, endotel hücre bağlantı proteinlerini etkileyerek permeabiliteyi artırır ve böylece granülasyon

dokusunun oluşumunu arttırmaktadır. VEGF tarafından reseptör aktivasyonu, endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile sonuçlanır. VEGF, anjiyogenezin uyarılmasının (mevcut damar sisteminden yeni damarların oluşması) yanı sıra, kemik iligindeki endotel öncü hücrelerden endotelial damar oluşumu yani vaskülojenizde rol oynar (Dvorak ve ark., 1995). Bunun dışında VEGF damar sisteminin oluşması ve stabilize edilmesi için perisitleri uyarır (Hoeben ve ark.,2004).

2.10.2. Üreme döngüsü

VEGF, folikül ve luteal vasküler gelişimi düzenleyen primer anjiyogenik faktörlerden biri olarak kadın üreme siklusunda önemli bir rol oynamaktadır. Sadece luteal bağ dokusu ve perivasküler hücrelerde bulunur. Patolojik koşulların aksine, kadın üreme siklusundaki büyüme ve anjiyogenez oldukça iyi düzenlenmiş ve koordine edilmiştir. VEGF ekspresyonu erken luteal fazda en yüksektir; çünkü korpus luteum için yeni damarların gelişiminde gereklidir, damar sistemi kurulduğunda orta luteal fazdan sonra sentezi azalır ve geç korpus luteumda ise mevcut değildir (Otani ve ark., 1999).

2.11. Malin Olmayan Hastalıklarda VEGF

2.11.1. Romatoid artrit (RA)

Romatoid artrit (RA), periferik ve sinovyal eklemleri etkileyen otoimmün bir hastalıktır. Bu hastalıkta sinovyum zarı iltihaplanır ve kütlece artar. Sinovyum içindeki hücreler, kemik ve kıkırdığı istila eder ve sindirir ki bu durum eklemlerin tahrip olmasına yol açmaktadır. Anjiyogenezis RA'nın devamlılığı ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır ve VEGF uyarıcı olarak bu hastalıkta önemli etkiye sahiptir. VEGF, vasküler geçirgenliği ve anjiyogenezu uyararak bu hastalıkta önemlidir. RA hastalarında, normal kontrollere kıyasla, sinovyal sıvıdaki endotelial proliferasyon daha yüksektir (Walsh ve ark., 1998). Sinovyal sıvı hacmindeki artış, proliferatif hücreler ile en yakın kan damarı arasındaki mesafeyi arttırarak hipoksik bir duruma neden olur. Sinovyal hücrelerin proliferasyonu ile hücrelerin oksijen ve besin maddeleri ihtiyacı artar

böylece anjiyogenez uyarıcı ortamı artmaktadır (Etherington ve ark., 2002). RA hastalarında serumdaki VEGF düzeyleri yükselir, eklemlerdeki lokal hipoksi VEGF seviyesindeki artışı tetiklemektedir. Sinovyal sıvıda VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅ ile birlikte VEGF reseptörleri Flt-1, KDR ve NRP-1 seviyelerinde kontrol gruplarına göre artış gözlenmektedir (Ikeda ve ark., 2000).

Yapılan çalışmalar anjiyogenezin RA'da önemli bir rol oynadığını ve VEGF'nin bu hastalıkta terapötik fayda sağlayabileceğini düşündürmektedir. RA hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, VEGF'yi inhibe eden Flt-1 (sFlt-1) çözünür formu ile yapılan tedavinin eklem inflamasyonunu önemli ölçüde azalttığını ve kemik ve kıkırdak hasarını azalttığını göstermektedir (Miotla ve ark., 2000).

2.11.2. Diyabet ve iskemik retinopatiler

Plazma VEGF, diyabetli hastalarda yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Yüksek kan şekeri, endotelyum üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır ve. hiperglisemik psödo-hipoksik durumu uyarmakta ve bu durum da VEGF üretimini indüklemektedir. Bu durum endotel hücreler üzerinde bir etkiye sahiptir ve plazma VEGF düzeylerinin diyabette endotel hasarı ve işlev bozukluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. VEGF'nin diyabetik retinopatideki rolü daha kapsamlı incelenmiştir. Retinada VEGF'nin aşırı salınımı oküler neovaskülarizasyona, kanamalara neden olur ve görme bozukluğu/görme kaybına yol açan vasküler geçirgenliği artırır. VEGF, aynı zamanda bu hastalıkta oküler sıvı seviyelerinin artışı tetiklemektedir. Glokom hastalığında artmış VEGF seviyeleri, oküler hastalıklı hastalarda patolojide ve intraoküler neovaskülarizasyonda VEGF'nin önemli bir faktör olduğuna dair yeni kanıtlar sunmaktadır (Lim ve ark., 2009).

VEGF, iskemik retinopatilerde retinal neovaskülarizasyonun patolojik gelişiminde rol oynadığından, VEGF'yi hedefleyen çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İskemi ile indüklenen retinal neovaskülarizasyonun hayvan modeli VEGF reseptörleri VEGFR-1 ve VEGFR-2 ile tedavi edilmiştir. Kimerik proteinin göze tek bir intravitreal enjeksiyonu, bir kontrol kimerik proteini ile tedavi edilenlere kıyasla retina

neovaskularizasyonunu % 100'e kadar düşürmüştür (Aiello ve ark., 1995). İskemik retinopati görülen bir fare modeli ile yapılan bir çalışmada, VEGF ve PDGF reseptörlerinin fosforilasyonunu bloke eden bir ilacın (PTK787) gavaj yolu ile uygulanması, retinal neovaskularizasyonun tam inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Ozaki ve ark., 2000). Elde edilen sonuçlar VEGF sinyalizasyonunun, bu hastalıklarda VEGF'yi ideal hedef molekül haline getiren iskemik retinopatilerde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Byrne ve ark., 2005).

2.11.3. Sedef hastalığı ve VEGF

Sedef hastalığı enflamatuvar hücre sızıntısının ve kan damarlarının çoğalmasının neden olduğu kronik bir deri hastalığıdır. Cildin kırmızı görünümü, oldukça geçirgen olan ve ödeme yol açan yüksek derecede anormal dermal kan damarlarından kaynaklanmaktadır. Hastalığın diğer karakteristik özellikleri arasında dermal kalınlaşma ve keratinosit farklılaşması bulunmaktadır. Keratinositler VEGF'yi ve reseptörlerini aşırı eksprese eder ve bu durum neovaskularizasyona neden olur. Sedef hastasında cilt, doğru uyaranlar mevcutsa anjiyogenezin başlamasına yatkındır. Derideki aşırı VEGF, daha yaygın bir doku inflamasyonu ile sonuçlanan bir vasküler inflamatuvara neden olmaktadır. Farelerde VEGF'nin transgenik yolla cilde uygulanması iltihabı tetiklemesi ve sedef hastalığının tüm özelliklerinin ortaya çıkması bu hastalığın oluşmasında VEGF'nin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Güçlü bir VEGF antagonisti olan VEGF-Trap, bu etkiyi tersine çevirmektedir (Xia ve ark., 2003). Bu hastalığın mevcut tedavisi, toksik etkilere sahip ve her zaman etkili olmayan immünosupresif ve anti-inflamatuvar ilaçları içermektedir. VEGF'yi hedeflenmesi sedef hastalığının tedavisi için yeni bir yaklaşım olabilir. Sonuç olarak, VEGF uyarıcılarla tedavi muhtemel yan etki olarak kronik cilt inflamasyonu ile sonuçlanabilir (Byrne ve ark., 2005).

2.12. Malin Hastalıklar ve VEGF

2.12.1. Tümör anjiyojenезisi

2-3 mm³ üzerinde büyüklüğe sahip tümörlere besin maddeleri ve oksijen sağlamak için vasküler bir besleme gerekmektedir. Bu gereksinim, anjiyojenik büyüme faktörleri tarafından tetiklenen anjiyojenез ile sağlanmaktadır. VEGF, tümör hücreleri tarafından tarafından salgılanır ve monosit gibi bağışıklık hücrelerinden sızmaktadır. VEGF, endotelyum üzerindeki reseptörlerine bağlanarak endotel hücre proliferasyonunu uyarmaktadır ve vasküler dallanmaya neden olan tümör dokusuna doğru hücre göçünü tetiklemektedir. Bu dallanma ile tümörün içinde yeni kan damarları oluşmaktadır. VEGF, kemik iliğinden endotel progenitör hücrelerinin katılımıyla endotelial damar oluşumunu ve vaskülojenезde rol oynar (Dvorak ve ark., 1995).

VEGF negatif tümörler ile karşılaştırıldığında tümör hücreleri tarafından yüksek seviyede VEGF üretiminin, tümör vaskülaritesi, metastaz, kemorezistans ve prognoz ile ilişkili olduğunu görülmektedir. Dolaşım sistemindeki VEGF seviyesi meme, akciğer ve gastrointestinal kanserlerde oldukça yüksektir (Toi ve ark., 1996).

2.12.2. Anjiyojenik anahtarı

Anjiyojenез, endojen pro-anjiyojenik uyarıcıların ve anti-anjiyojenik inhibitörlerin dengesine bağlıdır. Tümör büyümesi, anjiyojenik anahtar rolü ile anjiyojenез başlatmak için gerekli olan pro-anjiyojenik faktörleri salgılayarak bir dengesizlik yaratır (Hanahan ve Folkman, 1996). Bazı tümörlerin uyku formunda kalırken, bazı tümörlerin neden anjiyojenез başlatıp malin bir fenotipe dönüştüğü henüz anlaşılamamıştır. Nyberg ve ark. (2005), endojen inhibitörlerle uyarıcılar arasındaki fizyolojik dengenin, bireyler için patolojik koşullarda anahtar rolünü üstlendiğini önermektedir. Eğer bir birey, inhibitörlerden fazla endojen uyarıcıya sahip ise, denge anjiyojenезi destekler; buna karşın bireyin fazla endojen anjiyojenез inhibitöre sahipse anjiyojenik fenotipe geçmek daha zordur.

2.12.3. VEGF'nin otokrin etkileri

Başlangıçta, tümör hücrelerinin, endotel hücrelerinin proliferasyonunu uyarması için parakrin yol ile VEGF salgıladığı düşünülmüştür. VEGF'nin endotel hücreleri, embriyonik kök hücreler ve hematopoietik kök hücreler de dahil olmak üzere birçok hücre tipinde koruyuculuk/canlılığı sürdürme etkisine sahip otokrin bir yol ile etki edebileceği gösterilmiştir (Gerber ve ark., 2002).

VEGF'nin tümör hücrelerinin kendileri için bir otokrin sağkalım faktörü olarak rol oynayabileceği gösterilmiştir. Nötralize edici antikorlarla VEGF'nin bloke edilmesi ile iki hücre hattının (4T1 sıçan meme adenokarsinoma ve insan MDA-MB-231) apoptozunun indüklendiğini gösterilmiştir (Harmey ve ark., 2002).

Tümör hücrelerinin, serum yokluğu (*in vitro*), hipoksi, radyasyon ve kemoterapi gibi stresli koşullar altında yüksek VEGF seviyeleri salgıladığı gösterilmiştir. Tümör hücrelerinde yanlılıkla, radyoterapi veya kemoterapi gibi stresler altında artmış VEGF'ye bağlı olarak sağkalımı artmakta iken geleneksel kemoterapi ve radyoterapi tedavilerine daha az duyarlı hale gelmektedir (Gorski ve ark., 1999). Bu kemoprotektan etki, PI3-Kinaz yolu yoluyla VEGF sinyali vermeyi gerektirir. Apoptoz ailesinin inhibitörünün bir üyesi olan survivinin VEGF aracılı kemo direnci ilişkilendirilmiştir. VEGF ile uyarılan endotel hücrelerinde survivin seviyeleri 10-20 kat artmaktadır. PI3-Kinaz inhibisyonu VEGF aracılı survivin ekspresyonunu düzenlemektedir. Survivin inhibisyonu aynı zamanda VEGF aracılı endotel hücrelerinin kemorezistansını da azaltmaktadır. Survivin ekspresyonu tümör hücresinde ekspresyonu ve kemo dirençliliğe katkıda bulunabilen kaspazları inhibe etme kabiliyetiyle bağlantılı olması apoptotik fonksiyon çalışmalarında gösterilmektedir (Tamm ve ark., 1998).

VEGF'nin hedeflenmesi, survivin inhibisyonu da dahil olmak üzere VEGF'nin hem proanjiyojenik (parakrin) hem de sağkalım öncesi (otokrin) etkilerini bloke etmesi ve böylece tümör hücrelerini anjiyojenezini azaltarak ve otokrin sağkalım etkisini bloke ederek konvansiyonel terapilere duyarlı hale getirmesi beklenmektedir (Brusselmans ve ark., 2005).

2.12.4. Tümör lenfatikleri

Bir tümördeki lenfatikler tümörün büyümesinde ve metastazında rol oynamaktadır. Genel olarak tümör içerisindeki lenfatikler sıkıştırılmış haldedir ve işlevsel değildir ancak periferde fazla VEGF C ekspresyonu nedeniyle büyümektedir. Bu lenfatikler dokular arası sıvı ve metastatik tümör hücrelerini toplayarak lenfatik metastazlara neden olmaktadır (Jeltsch ve ark., 1997).

2.12.5. VEGF ve hipoksi

Tümör hücreleri de dahil olmak üzere tüm hücre tipleri, enerji üretimi ve doku fonksiyonu için oksijene gereksinim duymaktadır. Yeterli bir kan akışının sağlanamaması ve mevcut kan damarları arasındaki artan mesafeler tümör hücrelerinin oksijen bakımından aç kalması anlamına gelmektedir. Bu durum, tümör dokusunda hipoksinin hatta anoksi alanlarının oluşmasına yol açar. Tümörlerde, hipoksi, bu ortamda canlılığın devamı için tümör hücrelerinde adaptasyon için gerekli değişiklikleri uyararak malin ilerlemesine neden olmaktadır. Gen ekspresyonunda gerçekleşen değişiklikler arasında, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, onkogenlerin aktivasyonu, genomik kararsızlık ve klonal seleksiyon yer almaktadır. Tümör hücreleri için zor olan çevre şartları, seçkin hücrelerin hayatta kalma mekanizması ile bu hücreler üzerinde güçlü seçici bir baskı uygulamaktadır. Hipoksi durumuna adapte olan hücreler, olmayan hücrelere oranla daha hızlı çoğalarak hayatta kalabilmektedir. Böylece tümördeki baskın popülasyon daha agresif bir fenotipe dönüşmektedir. Hipoksiye yanıt olarak adezyon moleküllerinin aşağı düzenlenmesi tümör hücrelerinin ayrılmasını ve dolayısıyla metastazı arttırmaktadır (Giaccia,1996).

Tümör hipoksisi ile ilişkili diğer problemler, kemo direnci üzerinde doğrudan ve dolaylı etkilemektedir. Alkile edici ajanlar gibi bazı kemoterapi ilaçları, hipoksik durumlarda daha az etkilidir. Hipoksiye tepki olarak tümör hücrelerinde hücre döngüsü yavaşlar veya hücreler G1'de duraklamaktadır. Bazı kemoterapi ilaçları ise hücre siklusunun S1 fazında DNA sentezini inhibe ettiğinden, hipoksik bir ortamda daha az etkili olmaktadır (Shannon ve ark., 2003). Hipoksi, p53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlar için

seçmektedir. p53 geni mutasyona uğramış hücreler DNA hasarına bağlı apoptoza karşı dirençlidir ve p53 mutant olmayan yabancı tipli hücelere göre daha fazla kemoterapiye dirençli olması muhtemel olmaktadır. p53 mutasyonu hipoksi aracılı apoptozun azalmasına ve VEGF üretiminin artmasına neden olmaktadır (Royds ve ark., 1996). Çoklu ilaç dirençi (Multi-drug resistant-MDR) gen ekspresyonunun indüksiyonu, hipoksi koşullarında gözlenmektedir (Comerford ve ark., 2002).

Radyoterapide hipoksi, hızla çoğalan hücelere radyoterapi etkisi gösterirken aynı zamanda oksijen varlığında reaktif oksijen türlerini arttırıcı yönde bir problem teşkil eder. Düşük oksijen konsantrasyonlarında tümör radyasyon duyarlılığı azalmaktadır. Oksijen aslında, radyoterapiden hemen sonra oluşan oksijen türevi serbest hidroksil radikallerinin oluşmasıyla DNA hasarını arttırdığı için radyasyonu arttırmaktadır. Hipoksik koşullarda tümör hücre apoptozu için gerekli olan radyasyon dozu, normal oksijen şartlarına göre 2-3 kat daha yüksektir (Harrison ve Blackwell, 2004).

Klinik ortamda tümör hipoksisi, hipoksi içermeyen tümörlü hastalara kıyasla daha kısa sağkalım ile ilişkilidir. Rahim servikal kanserinde tümör hipoksisi ile malin ilerlemenin ilişkili olduğu belirtilmiştir ve yumuşak doku, baş ve boyun kanserlerinde olumsuz sonuç ve genel olarak canlı kalımın bir göstergesi olarak rol oynamaktadır (Wouters ve ark., 2002).

Hipoksiye yanıt olarak olarak tümörler, damar gelişimini ve oksijen dağıtımını uyaran anjiyojenik büyüme faktörleri salgılamaktadır. Hipoksi uyarılabilir faktör (HIF-1), hipoksi uyarılabilir genlerinin ve VEGF gibi anjiyojenik faktörlerin ekspresyonunu düzenlemede aracılık etmektedir. Hipoksi ile indüklenen VEGF ekspresyonunda yer alan bir başka protein de HuR'dir. Bu protein, VEGF mRNA'sına bağlanır ve stabilize ederek sitoplazmaya transferini teşvik etmektedir (Levy ve ark., 1998).

VEGF, yara iyileşmesi, ovulasyon ve ateroskleroz gibi fizyolojik durumlarda hipoksiye tepki olarak sentezlenmektedir. Bu durum diyabetik retinopatili hastalarda da gözlenmektedir. Tümörlerde hipoksi durumu, tedavi başarısızlığının artması ve genel

sağkalımda azalma ile daha kötü bir prognoz ile sonuçlanmaktadır (Byrne ve ark., 2005).

2.13. VEGF'nin Kanser Tedavisi Olarak Hedeflenmesi

VEGF, tümör ilerlemesi ve metastazda önemli bir rol oynamasından dolayı kanser tedavisinde cazip bir hedeftir. Tümörlerdeki damar sistemi gelişigüzel, dağınık bir düzen, sızdıran kan damarları ve aşırı dallanma içermektedir. Yapısal ve işlevsel olarak anormaldir. Bu durum, etkin olmayan ilaç dağılımına ve tümör içindeki hipoksik alanlara yol açmaktadır. Dokular arası sıvı basıncı, yüksek geçirgenliğe sahip damarlar nedeniyle tümörde yükselir ve bu da ilaç penetrasyonunu engellemektedir (Netti ve ark. 1999). Tümör damar sisteminin hedeflenmesi tümörün büyümesi için gerekli olan besin maddelerinin ve oksijenin yoksun kalmasına neden olmaktadır. Bu yaklaşım metastazı da inhibe etmektedir. Tümör spesifik anti-anjiyojenik bileşikler mevcut olmaması nedeniyle bugüne kadar tek başına anti-anjiyojeniklerle tedavi tümörün ilerlemesinin engellenebilmesi için yeterli olmamıştır. Bu bileşiklerin dozunun artırılması, normal damar sistemi üzerinde olumsuz bir etkiye neden olurken kullanımını sınırlayabilmektedir. Geleneksel kemoterapi ile kombinasyon halinde, anti-anjiyojenik stratejiler sinerjik bir etki göstermektedir (Byrne ve ark., 2005).

Bevacizumab (Avastin, Genentech Inc) gibi anti-VEGF antikorları, VEGF TRAP gibi çözünen VEGF reseptör analogları, SU5416, SU11248, PTK787 / ZK222584 gibi küçük moleküllü VEGF inhibitörleri ve anjiostim gibi ribozimler dahil birçok anti-anjiyojenik strateji geliştirilmiştir. VEGF reseptörü NRP-1'i peptidlerle hedeflenmesi ile elde edilen klinik öncesi bazı veriler umut verici olarak görülmektedir (Barr ve ark., 2005; Soker ve ark., 1997).

2.13.1. Normalleştirme teorisi

Tümör damar gelişimindeki azalış tümör büyümesini ve metastazı engellese de, tümör damar sistemindeki bir azalmanın ilaç verme etkinliğini azaltacağı beklenmektedir.

Bununla birlikte, anti-anjiyojenik tedavinin aslında kemoterapinin veya radyoterapinin etkinliğini arttırdığı için bu durum söz konusu değildir (Gorski ve ark., 1999; Krause ve ark.,2005). Bu çelişkiyi açıklamak için Rakesh Jain, anti-anjiyojenik bir bileşik ile tümör tedavisinin önce daha az kararlı, sızıntı yapan kan damarlarına etki ettiğini öne sürmüştür. Bu durum, tümör çevresinde oksijen ve besin maddelerini daha verimli bir şekilde dağılımını gerçekleştirebilen daha normal ve kararlı damar sistemi oluşumunu sağlamaktadır (2005). Bununla birlikte, besin maddelerinin ve oksijen iletiminin artmasının tümörün gelişimini arttırması beklenmektedir. Bu normalizasyon periyodu sırasında sitotoksik ilaç tedavisi, tümör boyunca daha verimli bir şekilde sağlanır çünkü kemoterapi uygulaması, etkin bir damar sistemi eksikliği nedeniyle genellikle bozulmaktadır. Oksijen artışı hücrelerin proliferasyonunu artırabilir ancak kemoterapi ve radyoterapi aslında hızla çoğalan hücreler üzerinde daha iyi çalışmaktadır. Buna ek olarak, sitotoksik terapiye veya radyoterapiye yanıt olarak VEGF üretimi arttıkça, VEGF'yi bloke eden anti-anjiyojenik tedaviler, VEGF'nin otokrin canlı kalma etkinliğini bloke edecek ve hücreleri kemoterapi ve radyoterapiye karşı daha duyarlı hale getirecektir (Lee ve ark., 2007).

Hipoksik alanları normalizasyon süreci ile azalması, hücreleri kemoterapiye karşı daha duyarlı hale getirmelidir. Anti-anjiyojenik ilaçlar, VEGF reseptörlerini eksprese eden ve VEGF'nin bir hayatta kalma faktörü olarak görev yaptığı tümörü hedeflemektedir (Lee ve ark., 2007). Bu kombine tedavi, kemo ve radyo dağılımını arttırdığı, hipoksiyi azalttığı ve sağkalım faktörlerinin üretimini arttırarak tümör hücrelerini hassaslaştırdığı için tümör tedavisini güçlendirmekte, metastazların oranının da azaltmaktadır. Kemoterapi ile tedavi ile optimal normalizasyon penceresini elde etmek için dozlar ve tedavi programları dikkatle seçilmelidir. Normalleştirme hipotezi ile başarılı sonuçlar elde etmek için, klinik çalışmalarda anti-anjiyojenikler ve kemoterapinin birlikte oluşturacağı sinerjik etkileri üzerinde durulmaktadır (Kabbavar ve ark., 2005).

2.13.2. Metronomik tedavi: anti-anjiyojenik tedavi olarak kemoterapi

Tümörlerin tedavisine yönelik ilk yaklaşım, tümör hücrelerini bir sitotoksik ajanın maksimum tolere edilen dozları (MTD) ile hedeflemektir. Bu ne yazık ki istenmeyen bazı yan etkilere ve kemik iliği progenitörleri, hematopoietik kök hücreler ve saç follikülleri gibi normal hücrelere zarar verir. Bu toksik etkilerin üstesinden gelmek için kemoterapi programında tedavi uygulaması içermeyen normal hücrelerin iyileşmesine fırsat tanıyacak bir süre gereklidir. Fakat bu periyot boyunca tümör hücreleri ve tümör ilişkili endotel hücreleri de iyileşebilmekte ve tümör hücreleri dirençli hale gelebilmektedir (Kerbel ve Kaman, 2004).

Kerbel ve diğerleri (2004) kemoterapi dozunu azaltıp uygulama sıklığını arttırarak denemeler yapmışlardır. Dozlar arasındaki aralıkların azalması ile toksik yan etkiler azalmıştır ve buna "metronomik dozlama" denilmiştir. Kısa aralık süresi, endotel ve tümör hücrelerinin iyileşmesine izin vermemiş ve tümör hücrelerinin kemoterapiye dirençliliğini azalttığı görülmüştür. Bu yöntem kullanarak, endotel ve tümör hücrelerinin apoptozunda bir artış gözlemlenmiştir ve tümör gelişimi, geleneksel MTD yöntemine göre daha etkili şekilde baskılanmıştır (Hanahan ve ark., 2000).

Sonuç olarak VEGF anjiyojenez ve hücre sağkalım yollarında önemli rol oynamaktadır. Sağlıklı erişkinlerde rolü esas olarak yara iyileşmesi ve menstrual döngü sırasındaki anjiyojenez ile sınırlıdır. Embriyogenez sırasında da önemli bir rol oynamaktadır. VEGF, özellikle kanser gibi insan patolojilerinde önemlidir. Tümörler, özellikle hipoksiye yanıt olarak yeni damar oluşumunu uyarmak için VEGF salgılamaktadır. Yeni yapılanan damarlar tümöre oksijen ve besin sağlarken aynı zamanda tümör hücrelerinin metastazı kolaylaştıran dolaşıma erişmelerine izin vermektedir. Anjiyojenezin uyarılmasına ilaveten, VEGF'nin, tümör hücreleri için bir hayatta kalma faktörü olarak otokrin yollar ile hipoksi, kemoterapi ve radyoterapi gibi streslerden korucu etkiye sahip olduğu görülmektedir. Özellikle anjiyojenez ve VEGF, anti-kanser stratejileri için çekici hedeflerdir ve VEGF'nin inhibisyonunun hem anjiyojenezi bloke ettiği hem de kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğini geliştirdiği gösterilmektedir (Byrne ve ark., 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma-Model
Elektroporator	Multiporator/Ependorf Eparotor
Mikrodalga fırın	Arçelik- MD ₅₀₀
PCR makinesi	Biorad- DNA Engine
Güç kaynağı (SDS ve agaroz jel elektroforezi için)	Biorad
Termostatlı blok ısıtıcı	Biorad-Bio TDB-100
Spin cihazı	Biosan-Combi Spin FVL 2400N
Çalkalayıcı inkübatör	Biosan-ES 20
Mikro santrifüj	Hettich
-80°C dondurucu	Hettich
Otoklav	HMC-Hirayama
UV/VIS Spektrofotometresi	Denovix DS-11 FX+
Etüv	Memmert
Ultra santrifüj	Vision-VS 30 000i
Isıticılı manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica ARE
Buzdolabı	Vestel-GTP 455A
Kar makinesi	Vision
Çalkalayıcı inkübatör	Zhicheng-ZHWY-111C
İnverted mikroskop	Olympus CKX41
CO ₂ 'li inkübatör	Esco
Laminar akışlı steril kabin	Esco
Sirkülatörlü su banyosu	Nüve
Soğutmalı santrifüj	Nüve
UV mikrolaka okuyucu	Infinite® 200 PRO NanoQuant

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.2. Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler

Kimyasal malzeme-Kit	Firma
Orange G	Alfa Aesar
Etidyum bromür	ICN
dNTPs	Biobasic
Tampon H	Takara
Tampon M	Takara
Pfu DNA Polimeraz Tamponu	Laboratuvarımız tarafınan üretilen
T ₄ DNA ligaz tamponu	Promega
PIPES	Alfa Aesar
KOH	Sigma
MnCl ₂	Merck
CaCl ₂	Carlo Erba
KCl	Sigma
Ampisilin	Sigma Aldrich
Trypton	BD- Bacto™
Pepton	Merck
Maya ekstraktı	LabM
NaCl	Carlo Erba
MgCl ₂	Riedel de Haën/ Qiagen
MgSO ₄ .7H ₂ O	Riedel de Haën
LB Broth Base	BD
%1 BSA	Takara
Dekstroz	Difco
DTT	Applichem
HEPES	Sigma
Agar	BD Bacto™ Agar
Gliserol	Euromedex
Tris/HCl	Amresco
YCB Medium Power	BD Difco
Asetamid	Alfa Aesar
Sorbitol	Neosorb 70/70
Triton X-100	Merck
SDS	Serva
EDTA	Amresco
Etanol	Merck
Metanol	Merck
Kloroform	Merck
Tris	Sigma
Galaktoz	Carlo Erba
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Carlo Erba

Ni-NTA Agaroz	Qiagen
İmidazol	Merck
DMSO	Merck
Diyaliz Membranı	Spectro/Por
Agaroz	Bioron
Akrilamid	Amresco
APS	Biorad
TEMED	Biorad
HCl	Merck
B-Merkaptoetanol	Merck
Bromfenol Blue	Pancreac
Glisin	Merck
Coomassie Brilliant Blue	Ambresco
Glasiyel Asetik Asit	Merck
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom
L-Glutamin	Biochrom
FBS (Fetal Bovine Serum)	Capricorn
%1 Gentamisin Sülfat	Biological Industries
DMSO (hücre kültürü için)	Origen Biomedical
PBS	Biochrom
Trypsin-EDTA	Biochrom
MTT	Alfa Aesar
İnsan VEGF165A	Abcam
Jelden DNA saflaştırma kiti	Geneaid
Plazmid DNA saflaştırma kiti	Geneaid
PCR ürünleri temizleme kiti	Bio Basic

3.1.3. Kullanılan Enzimler

Çizelge 3.3. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma
<i>Pfu</i> DNA Polimeraz	Laboratuvarımız tarafınan üretilen
<i>XhoI</i>	Takara
<i>EcoRI</i>	Takara
<i>NcoI</i>	Takara
<i>HindIII</i>	Takara
<i>SacII</i>	Takara
T ₄ DNA ligaz	Takara

3.1.4. Klonlama ve ekspresyon işlemlerinde kullanılan mikroorganizmalar

Çizelge 3.4. Kullanılan klonlama ve ekspresyon vektörleri

Tür	Suş	Kullanım amacı
<i>E. coli</i>	DH5 α	Klonlama
<i>K. lactis</i>	GG799	Ekspresyon

3.1.5. Klonlama ve Ekspresyon İşlemlerinde Kullanılan Plazmidler

Çizelge 3.5. Klonlamada ve ekspresyonda kullanılan plazmitler

Plazmit	Firma	Kullanım amacı
pKLAC2	NEB	Klonlama ve ekspresyon vektörü

3.1.6. Kullanılan Çözeltiler

3.1.6.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

PİPES’li tampon çözeltisi(pH 6, 1 L): 0,5 M 50 mL PİPES çözeltisi hazırlanarak. pH KOH ile 6,7 olarak ayarlanmıştır. 6,92 g MnCl₂, 1,66 g CaCl₂ ve 18,64 g KCl 980 ml suda çözülmüştür. Üzerine 20 mL PİPES çözeltisi eklenerek ve hacim 1 L’ye tamamlanmıştır. 0,45 µm’lik filtreden geçirilerek +4°C’de saklanmıştır.

Tris Asetat EDTA (50xTAE) tamponu (pH 8.5, 1 L): 242 g Tris, 57,1 mL glasiyel asetik asit, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8.0) bir miktar suda çözüldükten sonra pH’sı glasiyel asetik asitle 8,5’e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1000 ml’ye tamamlanmıştır ve +4°C’de saklanmıştır.

Tris-HCl tamponu (100 mM, pH 8.0, 100 mL): 1,21 g Tris yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH HCl ile 8.0'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlanmış +4°C'de saklanmıştır.

Tris-HCl çözeltisi (1 M, pH 7.4, 1 L): 121.14 g Tris 800 mL deiyonize suda çözülmüş konsantre HCl çözeltisi ile pH 7.0 olarak ayarlandıktan sonra toplam hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.

%20 Galaktoz stok çözeltisi (50 mL): 10 gr galaktoz 50 mL deiyonize suda çözülerek 0.22 µm'lik steril filtreden geçirilmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

Fosfat tamponu (100 mM, pH 7.4, 1 L): 7.8 g NaH₂PO₄.2H₂O bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra derişik HCl ile pH 7.4'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.

HEPES tamponu (20 mM, pH 7.4, 1 L): 9.52 g HEPES bir miktar deiyonize içerisinde çözüldükten sonra derişik HCl ile pH 7.4 olarak ayarlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.

10X Elektroporasyon çözeltisi (pH 7.4, 25mM Tris, 10 mM MgCl₂, 50 mL): 0.15 g Tris ve 0.1 g MgCl₂ 50 ml deiyonize suda çözülmüştür. 5 mL'sine 45 ml deiyonize su eklenerek 1X kullanım konsantrasyonuna seyreltilmiştir. pH 7.4 olarak ayarlandıktan sonra 0.22 µl'lik steril filtreden geçirilerek steril edilmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

DTT çözeltisi (50 mM, 50 mL): 0.386 g DTT 50 ml deiyonize suda çözüldükten sonra 0.22 µl'lik steril filtreden geçirilerek steril edilmiştir. -20°C'de saklanmıştır.

Sorbitol çözeltisi (5M, 10 mL): 9.11 g sorbitol bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra 10 mL hacime tamamlanmıştır. 0.22 µl'lik steril filtreden geçirilerek steril edilmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

Asetamid çözeltisi (500 mM, 50 mL): 1.48 g asetamid 50 mL deiyonize suda çözüldükten sonra 0.22 µl'lik steril filtreden geçirilerek steril edilmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

HEPES çözeltisi (pH 8.0, 100 mM, 50 mL): 1.1915 g HEPES 50 ml deiyonize suda çözüldükten sonra 0.22 µl'lik steril filtreden geçirilerek steril edilmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

Yıkama çözeltisi (pH 8.0, 50 mL): Önceden hazırlanmış ve steril olan 10 mL 50 mM DTT, 20 mL 100 mM HEPES ve 20 mL YPD karıştırılarak steril şişede +4°C'de saklanmıştır.

Harju Buffer (200 mL): 4 mL Triton X-100, 2 g SDS, 1.17 g NaCl ve 0.0744 g EDTA bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra 2 mL 1M Tris-HCl (pH 8.0) eklenmiştir. Son hacim deionize su ile 200 mL ye tamamlanarak +4°C'de saklanmıştır.

MTT çözeltisi (5mg/mL): 5 mg MTT, 1 ml divalent katyonları içermeyen (Ca^{2+} ve Mg^{2+}) içermeyen fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde çözülmüştür. -20°C'de karanlıkta saklanmıştır.

PBS çözeltisi (1 L): 8.766 g NaCl, 0.296 g NaH_2PO_4 ve 2.9 g Na_2HPO_4 karıştırılarak pH değeri 0.5 M NaOH ile 7.0 olarak ayarlanmıştır. +4°C'de karanlıkta saklanmıştır.

3.1.6.2. Sıvı ve Katı Besiyerleri

LB/LB Agar Besiyeri: 25 g LB (Luria-Bertani) dehidre besiyeri 1 L distile suda çözülmüştür. 2 adet stok şişesine 400'er mL olacak şekilde ve üzerine 6'şar g agar ilave edilip otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Kalan LB çözeltisi yaklaşık 5 mL olacak şekilde deney tüplerine konulmuş ve ağız kısımları alüminyum folyo ile kapatılarak otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

SOB (Super Optimal Broth): 20 g tripton, 5 g maya özütü, 2 mL 5 M NaCl, 2,5 mL 1 M KCl, 10 mL 1 M MgCl_2 ve 10 mL 1 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ büyük bir behere alınarak üzeri

deiyonize su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Tamamen çözünme sağlandıktan sonra otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

5 mM asetamid içeren YCB besiyeri (100 mL): 3 mL 1 M Tris-HCl pH 7.4 stok çözeltisi, 1.17 g YCB Medium powder ile otoklav şişesi içerisinde 100 mL deiyonize suda çözüldükten otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Yaklaşık 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra önceden filtreden geçirilmiş 1 mL 500 mM asetamid steril koşullarda ilave edilmiştir. Steril deney tüplerine steril pipet ucu kullanılarak 5'er mL dağıtılmıştır.

5 mM asetamid içeren YCB Agar besiyeri (500 mL): 15 mL 1 M Tris-HCl stok çözeltisi, 5.85 g YCB Medium powder ve 10 g agar 500 mL deiyonize suda çözüldükten sonra otoklav şişesi içerisinde otoklavlanarak sterilize edilmiştir. 60°C'ye kadar soğutulduktan sonra filtreden geçirilmiş 5 mL 500 mM asetamid steril koşullarda ilave edilmiştir. Steril petri kaplarına dökülen besiyerinin oda sıcaklığında katılaşması sağlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

% 4 galaktoz içeren YPGal besiyeri (300 mL): 3 g maya ekstraktı ve 6 g peptone 240 mL deiyonize suda çözülerek 1 L hacmindeki erleninde otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra önceden hazırlanmış ve filtreden geçirilmiş 60 mL %20'lik stok galaktoz çözeltisi eklenmiştir.

**** Otoklav kullanılarak gerçekleştirilen sterilizasyon işlemleri 1 atm basınçta 121°C'de 15 dakika süre ile gerçekleştirilmiştir.**

3.1.6.3. SDS-PAGE ve gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

Ayırma jeli tamponu: 18,2 g Tris ve 0,4 g SDS yaklaşık 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M HCl ile 8.8'e ayarlanıp toplam hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Yükleme jeli tamponu (4xTris-HCl/SDS): 6,05 g Tris 90 mL saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M HCl ile 6.8'e ayarlanıp toplam hacmi saf suyla 100 mL'ye tamamlanmış. 0,4 g SDS ilave edilerek +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Numune tamponu (2x): 25 mL 4x Tris-HCl/SDS (pH6.8), 20 mL gliserol, 4 g SDS, 2 mL β -merkaptoetanol, 1 mg bromfenol mavisi ve 53 mL suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10 w/v): 0,1 g APS 1 mL saf suda çözöldü.

SDS-PAGE yürütme tamponu(5X): 15 g Tris, 72 g glisin ve 5 g SDS yaklaşık 900 mL suda çözöldükten sonra toplam hacmi saf suyla 1 L’ye tamamlanmıştır.

Jel boyama çözeltisi: 0,5 g Coomassie brilliant blue 250 mL metanol, 50 mL glasiyel asetik asitte çözöldükten sonra toplam hacim saf suyla 500 mL’ye tamamlanmıştır.

Boya uzaklaştırma çözeltisi: 250 mL metanol ve 50 mL glasiyel asatik asit karıştırılarak toplam hacim distile su ile 500 mL’ye tamamlanmıştır.

Sabitleyici çözelti: 100 mL metanol, 24 mL asetik asit ve 100 μ l formalin (%35’lik formaldehit çözeltisi) 67 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Yıkama çözeltisi: 73 mL etanol ve 127 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Sodyum tiyosülfat çözeltisi (%0.02 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$): 0.04 g sodyum tiyosülfat 200 mL distile suda çözölmüştür.

Gümüş nitrat çözeltisi(% 0.2 AgNO_3 , % 0.076 formalin): 0.4 g AgNO_3 200 mL distile suda çözölür ve 152 μ l formalin(%35’lik formaldehit çözeltisi) eklenmiştir.

Karbonat çözeltisi (% 6 Na_2CO_3 , %0.05 formalin, % 0.0004 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$): 24 g Na_2CO_3 , 200 μ l formalin (%35’lik formaldehit çözeltisi) ve 8 mL % 0.02 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 392 mL distile suda çözölerek elde edilmiştir.

Durdurucu çözelti (%50 metanol, %12 asetik asit): 100 mL metanol, 24 mL asetik asit ve 76 mL distile su karıştırılmıştır.

3.1.6.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Etilendiamin tetra asetik asit (pH 8.0, 0,5 M EDTA): 186,1 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 700 mL saf suda çözüldükten sonra 1 M NaOH ile pH'sı 8.0'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Tris Asetat EDTA (50xTAE) tamponu: 242 g Tris, 57,1 mL glasiyel asetik asit, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8.0) bir miktar suda çözüldükten sonra pH'sı glasiyel asetik asitle 8,5'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

Örnek yükleme boyası (6x): 25 mg bromfenol mavisi ve 3 mL gliserol saf su ile iyice karıştırılarak toplam hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır.

3.1.6.5. Protein saflaştırmada kullanılan çözeltiler

NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponu (100 mM, pH 7.6): 65 mL 0,2 M NaH_2PO_4 ve 0,2 M 435 mL Na_2HPO_4 karıştırıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

Yükleme tamponu (100 mM NaCl, 100 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 , pH 7,6): 2,92 g NaCl 500 mL NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (100 mM pH 7,6) çözülmüştür.

Yıkama tamponu (25 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH 7,6): 0,85 g imidazol, 2,92 g NaCl 500 mL NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (100 mM pH 7,6) çözülmüştür.

Elüsyon tamponu (300 mM imidazol, 100 mM NaCl, 100 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH 7,6): 10,21 g imidazol, 2,92 g NaCl 500 mL NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (100 mM pH 7,6) çözüldü.

3.2. Yöntem

3.2.1. VEGF₁₆₅ geninin optimizasyonu ve sentezi

3.2.1.1. VEGF₁₆₅'e ait sekans dizisinin elde edilmesi

Rekombinant olarak üretimi amaçlanan ve GenBank: AF486837.1 erişim numarasına sahip VEGF₁₆₅ genine ait nükleotit sekansına NCBI (The National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak ulaşılmıştır. İnsana ait Vasküler Endotel Büyüme Faktörü VEGF₁₆₅'e ait sekans dizisi 576 baz çifti büyüklüğündedir ve 191 amino asitlik bir proteinin ekspresyonundan sorumludur. Bu proteinin büyüklüğü ise 22.3 kDa'dur.

3.2.1.2. Kodon optimizasyonu

İnsan VEGF₁₆₅ geninin *K. lactis* organizmasında yüksek seviyede ekspresyonu için hedef genin öncelikle bu organizmaya göre optimizasyonunun yapılması gerekmektedir. Kodon optimizasyonu için farklı veri tabanları (Jcat-The CodonAdaptationTool vs) kullanılmıştır. Bu veri tabanları bir proteine ait DNA sekansının prokaryotik/ökaryotik konukçu hücrelerde yüksek verimlilikle üretimi için uygun sekans dizisinin elde edilmesinde kolaylık sağlamaktadır.

3.2.1.3. pKLAC2 vektör sistemine göre optimizasyonu

Kodon optimizasyonu gerçekleştirilen VEGF₁₆₅ genin *K. lactis* pKLAC2 vektör sistemine klonlanması hedeflenmiştir. Bunun için vektör sistemine ait çoklu klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon enzim kesim bölgelerinden uygun olan iki tanesi seçilmiştir. Belirlenen restriksiyon enzimlerinin hedef geni iç bölgesinden kesmemesine dikkat edilmiştir.

Optimize edilmiş dizinin amino ucunda *NcoI*, *XhoI* restriksiyon enzim kesim bölgesi ve Kex proteaz kesim bölgesi eklenmiştir. Hedef proteine ait dizi α - mating faktörünün alt

kısmına klonlanarak proteinin hücre dışına sekresyonunu sağlar. Hedef protein α -mating domaini ile füzyon halinde eksprese edilmektedir. Kex proteaz kesim bölgesi eklenmesi ile füzyon proteinin golgide Kex proteaz tarafından kesilerek doğal formunda büyüme ortamına salınması için gereklidir.

Optimize edilmiş dizinin karboksil ucuna stop kodonundan önce 10 adet histidin amino asitine ait kodon dizisi eklenmiştir. Bu histidin etiketi hedef proteinin büyüme ortamından afinite kromatografisi ile saflaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Stop kodonun (TGA) ardından *EcoRI* enzim kesim bölgesi eklenmiştir.

3.2.1.4. Optimize edilmiş dizinin yapay olarak sentezi

Optimize edilen dizinin yapay sentezi Biomatik firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Dizi *E.coli* pET22b ekspresyon sistemine *NcoI* ve *EcoRI* enzimleri ile klonlanmış halde temin edilmiştir.

3.2.2. VEGF₁₆₅ geninin ekspresyon vektörüne klonlanması

Rekombinant VEGF₁₆₅-pKLAC2 vektörünün elde edilmesi için yapışkan uçlara sahip VEGF₁₆₅ geninin (insert DNA) ve vektör DNA'sının elde edilmesi gerekmektedir. Yapışkan uçlu pKLAC2 vektörü vektör DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve kesim ürünlerinin saflaştırılması ile elde edilmiştir. Yapışkan uçlu VEGF₁₆₅ geni ise iki farklı yol ile elde edilmiştir:

- pET22b-VEGF₁₆₅ konstrüktünün restriksiyon enzimleri ile kesimi ve VEGF₁₆₅ geninin agaroz jelden saflaştırılması
- Tasarlanan primerler ile gerçekleştirilen PCR sonucunda VEGF₁₆₅ geninin çoğaltılması ve restriksiyon enzimleri ile kesimi

3.2.2.1. VEGF₁₆₅ geninin agaroz jelden saflaştırılması

Restriksiyon enzim kesimi

VEGF₁₆₅ geninin *K. lactis* pKLAC2 ekspresyon vektörüne klonlanması hedeflenmiştir. Klonlama için bu vektör sisteminin çoklu klonlama bölgesinde var olan restriksiyon enzimlerinden uygun olan iki tanesi (*XhoI* ve *EcoRI*) restriksiyon kesimi için belirlenmiştir. Bu enzimler belirlenirken bu enzimlerin hedef geni kesmiyor olmasına dikkat edilmiştir. Rekombinant VEGF₁₆₅-pKLAC2 kontrüktünün oluşması için hedef genin içinde bulunduğu pET22b-VEGF₁₆₅ kontrüktü ve pKLAC2 vektör DNA'sının *XhoI* ve *EcoRI* enzimleri ile ayrı ayrı kesimi gerçekleştirilmiştir.

pET22b-VEGF₁₆₅ kontrüktünün kesim reaksiyonları aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir:

Çizelge 3.6. VEGF₁₆₅ geninin restriksiyon enzim kesimi

Bileşen	Hacim (µl)
pET22b-VEGF ₁₆₅ vektör DNA'sı (90 ng/µl)	28
<i>XhoI</i> (Takara- 5000 U)	2
<i>EcoRI</i> (Takara- 10000 U)	2
10X Tampon H (Takara)	4
Distile su	4
Toplam	40

Çizelge 3.6.'da bir reaksiyon için bileşenleri belirtilen restriksiyon kesim reaksiyonu toplam dört reaksiyon (160 µl) olacak şekilde 37°C'de 4 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon ayrı ependorf tüpünde olacak şekilde bileşenler eklendikten sonra mikrosantrifüj ile 3-5 saniye hızlıca döndürülerek 37°C'deki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Her saat başı tüpler mikrosantrifüj ile 3-5 saniye hızlıca

döndürülerek reaksiyona devam edilmiştir. 4. saat sonunda bütün reaksiyonlar tek bir tüpte birleştirilmiş ve örnekler üzere Orange G yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz jel elektroforezinde koşulmuştur.

Agaroz Jel Elektroforezi

- Yükleme boyası / DNA örneğinin 1/3 oranında vorteks ile homojen olarak karışımı sağlanmıştır.
- 1 g agaroz üzerine 100 mL 1x TAE tamponu eklenmiş ve mikrodalga fırında eritilen jel 50-60 °C'ye kadar soğumaya bırakılmıştır. Agaroz jel tarakları, bant ile birleştirilerek yükleme yapılan kuyucukların hacmi arttırılmıştır. 1 µl etidyum bromür eklenen jel, taraklar yerleştirildikten sonra kasete dökülmüş ve katılaşması için bekletilmiştir.
- DNA örnekleri kuyucuklara yüklenmiş ve 100 volt elektrik akımında yaklaşık 1 saat boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir.

Agaroz jelden VEGF₁₆₅ geninin saflaştırılması

Agaroz jelde kesilmiş pET22b-VEGF₁₆₅ konstrüktünün iki eşit miktarda iki ayrı kuyucukta agaroz jelde yürütülmüş ve istenilen büyüklüklerde biri büyük diğeri küçük (VEGF₁₆₅ geni) olmak üzere iki DNA fragmenti oluşturduğu görülmüştür. UV ışığı altında görüntülenen agaroz jeldeki küçük DNA fragmenti bistüri yardımı ile kesilerek jelden ayrılmıştır. Bu fragmentlerden küçük olan (VEGF₁₆₅ geni) 'Geneaid Gel Extraction Kit (Jel Ekstraksiyon Kiti)' ile şu şekilde saflaştırılmıştır:

- 300 mg jel parçacığı üzerine 500 µl QG tampon çözeltisi eklenmiştir. 55-60 °C sıcaklığındaki su banyosunda 10-15 dakika bekletilmiş ve 2-3 dakikada bir alt üst edilerek agaroz jelin tamamen erimesi sağlanmıştır.
- Toplama tüplerine DFH kolonları yerleştirilerek DNA örnekleri kolona transfer edilmiştir.
- 15000 rpm de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Kolonun altındaki sıvı uzaklaştırılarak kolon toplama tüpüne tekrar yerleştirilmiştir.

- 400 µl W1 yıkama tamponu kolona eklenmiştir.
- 15000 rpm de 30 saniye santrifüj edilerek kolonun altındaki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 600 µl W yıkama tamponu kolona eklenmiştir.
- 15000 rpm de 30 saniye santrifüj edilerek kolonun altındaki sıvı uzaklaştırılmıştır.
- 15000 rpm de 3 dakika boş olarak santrifüj edilerek yıkama tamponu kolondan tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.
- Kolon 1.5 mL'lik steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 50 µl distile su kolonun ortasına aktararak kolon tarafından tamamen absorblanması için oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
- 15000 rpm de 2 dakika santrifüj edilerek elüe edilen kesilmiş VEGF₁₆₅ fragmenti etiketlenerek -20 °C'de ligasyon işleminde kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.2.2.2. VEGF₁₆₅ geninin PCR ile elde edilmesi

Primer Tasarımı

Yapay olarak sentezlenen DNA dizisinin kalıp olarak kullanılarak, uçlarında klonlamada kullanılacak retriksiyon enzim kesim bölgelerini (*XhoI*, *EcoRI*) içeren DNA fragmanının PCR ile elde edilebilmesi için öncelikle primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.7.'de tasarlanan primerlere ait özellikler verilmiştir.

Çizelge 3.7. Tasarlanan primerler

Primer	Primer dizisi	Büyüklik (bç)	Tm
<i>XhoI</i>-VEGF (Sense Primer)	5'TTTTCTCGAGAAAAGAATGAATTT CTTACTTTC 3'	33 bç	64°C
<i>EcoRI</i>-VEGF (Reverse Primer)	5'TTTTGAATTCCTCAGTGGTGGTGGT GGTGGTGGT	33 bç	74°C

Çizelge 3.7’de dizileri belirtilen primerlerde restriksiyon kesim bölgeleri sarı, Kex proteaz kesim bölgesi pembe, VEGF₁₆₅ genin başlangıç kodonu ise yeşil ile belirtilmiştir.

PCR Optimizasyonu

Primer çiftlerinin erime sıcaklıklarının farklı olması ve yakın olmaması durumundan dolayı PCR’de bağlanma sıcaklığının optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için Gradient PCR tekniği kullanılmıştır. Farklı sıcaklık aralıklarında yapılan denemeler ile primer çifti için en uygun bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir. 64-75 °C arasında farklı sıcaklıklara sahip kuyucuklarda Gradient PCR gerçekleştirilmiştir.

PCR bileşenleri (25 µl reaksiyon için) :

- 15,5 µl H₂O (DNAz & RNAz içermeyen)
- 2.5 µl PCR Tamponu (*Pfu* Polimeraz Tamponu 10x)
- 1,5 µl MgCl₂ (25mM)
- 1,5 µl dNTP karışımı (10 mM)
- 1,5 µl primer “sense” (5µM)
- 1,5 µl primer “reverse” (5µM)
- 1 µl kalıp DNA (pET28b-VEGF₁₆₅)
- 0,5 µl *Pfu* DNA polimeraz

PCR koşulları:

4°C	10 dk	
95°C	2 dk	
94°C	1 dk	} 35 döngü
Gradient (87-63°C arasında 5 farklı sıcaklık)	1 dk	
72°C	1 dk	
72°C	5 dk	
4°C	∞	

Optimum bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra bu sıcaklıkta 6 adet 50 µl'lik hacimde PCR gerçekleştirilmiştir. Yukarıda bileşenleri verilen 25 µl'lik reaksiyondaki miktarlar iki kat arttırılmıştır. Toplam 300 µl PCR ürününe 100 µl Orange G DNA yükleme boyası eklenerek %1'lik agaroz jelde koşuldu. Agaroz jeldeki VEGF₁₆₅'e ait DNA fragmenti 'GENEAID Gel Extraction Kit (Jel Ekstraksiyon Kiti)' ile 3.2.2.1'de belirtildiği şekilde saflaştırılmıştır.

3.2.2.3. Vektör DNA'sının restriksiyon enzimleri ile kesimi

Çizelge 3.8. VEGF₁₆₅ geninin restriksiyon enzim kesimi

Bileşen	Hacim (µl)
pKLAC2 vektör DNA'sı (117.40 ng/µl)	15
<i>Xho</i> I (Takara- 5000 U)	2
<i>Eco</i> RI (Takara- 10000 U)	2
10X Tampon H (Takara)	3
Distile su	8
Toplam	30

Çizelge 3.8.'de bir reaksiyon için bileşenleri belirtilen restriksiyon kesim reaksiyonu toplam iki reaksiyon (90 µl) olacak şekilde 37°C'de 4 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon ayrı santrifüj tüpünde olacak şekilde bileşenler eklendikten sonra mikrosantrifüj ile hızlıca döndürülerek 37°C'deki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Her saat başı tüpler mikrosantrifüj hızlıca döndürülerek reaksiyona devam edilmiştir. 3. saat sonunda daha verimli kesim için restriksiyon enzimlerinden 1'er µl daha eklenerek 1 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. 4. saat sonunda iki reaksiyon tek bir tüpte birleştirilmiştir ve agaroz jel elektroforezinde koşulmak üzere örnekler Orange G yükleme boyası ile karıştırılmıştır. Agaroz jeldeki kesilmiş olan pKLAC2 vektörüne ait DNA fragmenti GENE AID Jel Ekstraksiyon Kiti (Gel Extraction Kit)' ile 3.2.2.1'de belirtilen şekilde saflaştırılmıştır.

3.2.2.4. Ligasyon

pET22b-VEGF₁₆₅ konstruktünün ve VEGF₁₆₅ PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri *XhoI* ve *EcoRI* ile kesimi sonrasında elde edilen yapışkan uçlu VEGF₁₆₅ geni ile aynı enzimlerle kesilmiş yapışkan uçlu pKLAC2 vektörünün, 'pKLAC2-VEGF₁₆₅' rekombinant vektörünün oluşturulması amacıyla ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ligasyon işlemi için T4 DNA Ligaz (25000 U/μl Promega) enzimi kullanılmıştır ve pipetlemeler 3 farklı ligasyon reaksiyonu için aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

Çizelge 3.9. Ligasyon reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Ligasyon 1 (μl)	Ligasyon 2 (μl)	Ligasyon 3 (μl)	Kontrol (μl)
dH ₂ O	-	-	-	14,5
kesilmiş VEGF ₁₆₅ geni	16,5	16	14,5	-
kesilmiş pKLAC2 plazmit DNA	0,5	1	2,5	2,5
T ₄ DNA ligaz tamponu(10x)	2	2	2	2
T ₄ DNA ligaz	1	1	1	1

Çizelge 3.9'da verilen miktarlarda yapılan pipetlemenin ardından, hazırlanan ligasyon karışımları mikrosantrifüjde hızlıca döndürülerek ve +16°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından transformasyon işlemlerinde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.5. Rekombinant pKLAC2-VEGF₁₆₅ vektörünün *E.coli* DH5α hücrelerine transformasyonu

E.coli DH5α hücrelerinin PİPES'li tampon çözeltisi ile kompetent hale getirilmesi

- LB katı besiyeri içeren petriye DH5α hücreleri ekilmiştir.
- 37°C'de 16 saatlik inkübasyonun ardından petriden bir koloni alınarak; içinde 25 ml SOB bulunan 250 ml'lik erlene inoküle edilmiş ve 250 rpm ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir.
- Bu kültürün 2, 4 ve 10 mL'si içerisinde 250 mL SOB bulunan 3 tane erlene inoküle edilmiştir. Erlenler 18-22°C arası 14 saat boyunca 150 rpm'de inkübe edilmiştir.
- Kültürlerin 600 nm'deki absorbans değeri 0.55'e ulaştığında kültür çalkalayıcıdan alındı. 10 dakika buzlu banyosunda bekletilmiştir.
- Hücreler +4°C 3900 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek besiyeri tamamen uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler 0°C'deki 80 mL PİPES'li tampon ile süspanse edilmiştir.
- Hücreler, +4°C 3900 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek tampon uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelere 0°C'de 20 mL PİPES'li tampon ilave edilmiş ve hassasça yeniden süspansiyon hale getirilmiştir.
- 1.5 mL DMSO eklenerek buz banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Hücreler steril ependorf tüplere hızlıca bölünerek ve sıvı azotta dondurulmuştur.
- Kompetent *E.coli* DH5α hücreleri -80°C'de saklanmıştır (Inoue ve ark., 1990).

Transformasyon

- Dört adet steril santrifüj tüpüne 200 µl *E.coli* DH5α kompetent hücreleri ilave edilmiştir. Hücreler, 3.3 µl Ligasyon 1,2,3 ve kontrol ürünleri ile buz banyosunda bir saat inkübe edilmiştir.
- Inkübasyonun ardından hücreler 42°C'de 2 dakika ısı şokuna maruz bırakılmıştır.
- Buz banyosunda 5 dakika tekrar inkübe edilmiştir.

- Hücrelerin üzerine 330 µl LB eklenmiş ve yarım saat 37°C ve 250 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır.
- Hücreler seçici besiyerine (100 mg/mL ampicilin içeren LB agar) yayma ekim ile ekilerek 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2.6. Plazmid DNA Saflaştırılması

Transformasyon sonrası oluşan koloniler ampicilin ihtiva eden 4 mL’lik sıvı LB besiyerine tek koloni olarak inoküle edilerek 37°C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Santrifüjlenerek santrifüj tüplerinde toplanan hücrelerden “Geneaid ® Presto™ Mini Plasmid Kit” kullanılarak plazmid DNA’lar aşağıda verilen protokole göre saflaştırılmıştır.

- Hücre peleti 200 µl PD1 çözeltisi ile vortekslenerek süspanse hale getirilmiştir.
- Hücre parçalama çözeltisi olarak 200 µl PD2 eklendi, alt üst edilerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
- Nötralizasyon çözeltisi olarak 350 µl PD3 eklenmiştir ve birkaç defa alt-üst edilerek karıştırılmıştır.
- Santrifüj tüpleri maksimum hızda 5-6 dakika santrifüjlenmiştir.
- Süpernatant pipet yardımıyla toplama tüpüne yerleştirilen mini kolona aktarılmıştır. 15000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenerek kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır.
- 400 µl kolon yıkama çözeltisi (W1Buffer) kolona verilmiştir ve 15000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenerek kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır.
- 600 µl kolon yıkama çözeltisi (Wash Buffer) kolona verilmiştir ve 15000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenerek kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır. 600 µl yıkama çözeltisi ile bu işlem tekrarlanmıştır.
- Kolon boş olarak 15000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenerek yıkama çözeltisi kolondan tamamen uzaklaştırılmıştır.
- Kolon steril santrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. 50 µl nükleaz içermeyen su kolona verilmiş ve 60°C’de sıcaklığındaki su banyosunda 2 dakika inkübe edilmiştir.
- 15000 rpm’de 2 dakika santrifüjlenerek plazmid DNA’lar saf olarak elde edilmiştir.

- Plazmid DNA'lar PCR ve restriksiyon enzim analizinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.7. Plazmid DNA analizi

Saflaştırılan plazmid DNA'ların istenilen VEGF₁₆₅ genini içerip içermediği PCR ve restriksiyon enzim kesimi ile analiz edilmiştir.

Plazmid DNA'ların PCR ile analizi

Saflaştırılan plazmid DNA'lar kalıp olarak kullanılarak 25 µl'lik reaksiyonlar halinde 3.2.2'de belirtilen koşullarda PCR gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde analiz edilmiştir.

Plazmid DNA'ların restriksiyon enzimleri ile analizi

PCR analizi sonucunda pozitif olduğu düşünülen örneklerin *HindIII* ve *EcoRI* restriksiyon enzimleri ile kesimi Çizelge 3.10'da belirtildiği şekilde gerçekleştirildikten sonra %1'lik agaroz jeli ile analiz edilmiştir.

Çizelge 3.10. Plazmid DNA'nın restriksiyon enzim kesimi bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)
Plazmid DNA (110.2 ng/µl)	18
<i>HindIII</i> (Takara- 10000 U)	1
<i>EcoRI</i> (Takara- 10000 U)	1
10X Tampon M (Takara)	2.5
Distile su	2.5
Toplam	25

PCR ve restriksiyon enzim kesimi sonrasında pozitif olduğu düşünülen plazmit DNA'lar, kompetent *E.coli* DH5 α hücrelerine transforme edilmiş ve plazmit DNA saflaştırma kiti ile sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere amplifiye edilmiştir. Bu plazmit DNA'nın sekans analizi öncesinde farklı iki restriksiyon enzimi ile kesilerek klonlama tekrar analiz edilmiştir. Plazmit DNA'lar Kesim 1'de *HindIII-EcoRI* ile, Kesim 2'de *XhoI-EcoRI* enzimleri ile kesilmiştir (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. Pozitif klonun farklı restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

Kesim 1	Kesim 2	Hacim (μ l)
Plasmid DNA	Plasmid DNA (110.2 ng/ μ l)	18
<i>NcoI</i> (Takara- 500 .U)	<i>HindIII</i> (Takara- 10000 U)	1
<i>EcoRI</i> (Takara- 10000 U)	<i>EcoRI</i> (Takara- 10000 U)	1
10X Tampon M (Takara)	10X Tampon M (Takara)	2.5
Distile su	Distile su	2.5
Toplam		25

PCR ve restriksiyon enzim kesimi ile analiz edilen ve pozitif olduğu düşünülen plazmit DNA'lar, VEGF₁₆₅ genine ait primerler ile birlikte DNA dizi analizine gönderilmiştir.

3.2.3. VEGF₁₆₅ geninin ekspresyonu

Rekombinant VEGF₁₆₅-pKLAC2 vektörünün *K. lactis* GG799 maya hücrelerinde ekprese edilmesi için vektörün öncelikle *K. lactis* genomuna LAC4 lokusundan entegre olması gerekmektedir. Entegrasyon için VEGF₁₆₅-pKLAC2 konstrüktü *SacII* restriksiyon enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiştir. Lineer vektör DNA'sı kompetent *K. lactis* GG799 hücrelerine elektroporasyon ile transfer edilmiştir. Genoma entegre rekombinant vektör taşıyan maya hücrelerinde ekspresyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Rekombinant vektörün lineerizasyonu

Rekombinant bir pKLAC2 vektörünün *K. lactis* GG799 maya hücreleri genomuna entegre olabilmesi için *SacII* ya da *BstXI* restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmesi gerekmektedir. *SacII* enzimi rekombinant VEGF₁₆₅-pKLAC2 vektöründe başka bir kesim bölgesine sahip olmamasından dolayı lineerizasyon için bu enzim tercih edilmiştir.

Çizelge 3.12. Rekombinant vektör DNA'nın lineerizasyonu

Bileşen	Hacim (µl)
Rekombinant VEGF ₁₆₅ -pKLAC2 vektörü (640 ng/ µl)	10
10X Tampon T (Takara)	2
% 0.1 BSA (Takara)	2
<i>SacII</i> (Takara 1000 U)	1
Distile su	5
Toplam	20

Çizelge 3.12.'de bir reaksiyon için bileşenleri belirtilen restriksiyon kesim reaksiyonu toplam üç reaksiyon (90 µl) olacak şekilde 37°C'de 4 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon ayrı santrifüj tüpünde olacak şekilde bileşenler eklendikten sonra mikrosantrifüj ile hızlıca döndürülerek 37°C'deki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Her saat başı tüpler mikrosantrifüj hızlıca döndürülerek reaksiyona devam edilmiştir. 3. saat sonunda daha verimli kesim için *SacII* enziminden 1 µl daha eklenerek 1 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. 4. saat sonunda üç tüpteki reaksiyonlar tek bir tüpte birleştirilerek 'GENEAID Gel Extraction Kit (Jel Ekstraksiyon Kiti)' ile 3.2.2.1'de belirtildiği şekilde saflaştırılmıştır.

3.2.3.2. Rekombinant vektörün maya hücrelerine elektroporasyon ile transformasyonu

Elektrokompetent *K. lactis* GG799 hücrelerinin hazırlanması

Ön Kültür:

- -80°C’de stoklanmış halde bulunan *K. lactis* GG799 hücrelerinden YPD-Agar besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekim yapılmış ve 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
- 48 saat sonunda oluşan koloniler 4 mL YPD sıvı besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiştir. 30°C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında bir gece inkübe edilmiştir.
- 25 µl gecelik kültür içerisinde 50 ml YPD besiyeri içeren 250 mL’lik erlene inoküle edildi. 30°C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin kompetent hale getirilmesi:

- Kültürün 600 nm’de absorbans değeri 0.6 değerine ulaştığında hücreler steril falkon tüpünde +4°C’de 5000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernetant uzaklaştırılmıştır.
- 5 mL soğuk ‘yıkama çözeltisi’ ile hücreler resüspanse edilmiştir ve 5 dakika buz banyosunda inkübe edilmiştir. +4°C’de 5000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernetant uzaklaştırılmıştır.
- 5 mL soğuk ‘elektroporasyon çözeltisi’ ile yıkama yapılmıştır. +4°C’de 5000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernetant uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır.
- Hücre peleti 250 µl soğuk ‘elektroporasyon çözeltisi’ ile resüspanse edilmiştir. Bir saat buz banyosunda inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun sonunda hücreler elektroporasyonda kullanılmak üzere kompetent hale gelmiştir.

Elektroporasyon

100 µl *K. lactis* GG799 kompetent hücreler ile 5 µl lineer VEGF₁₆₅-pKLAC2 vektör DNA'sı steril santrifüj tüpü içerisinde pipet yardımıyla karıştırılmıştır. Karışım önceden buz içerisinde soğutulmuş steril elektroporasyon küvetine aktarılmıştır.

- 'Multiporator/Ependorf Eparotor' cihazına yerleştirilen küvete 2.1 milisaniye 2500 V elektrik akımı uygulanmıştır.
- Elektroporasyon sonrasında hızlı bir şekilde hücreler üzerine soğuk 1 M sorbitol içeren YPD besiyeri (outgrowth medium) ilave edilmiş ve 30°C'de bir saat karıştırılmaksızın inkübe edilmiştir.
- Steril santrifüj tüpüne aktarılan hücreler 4000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendikten sonra süpernetant uzaklaştırılmıştır ve hücreler 400 µl steril distile su ile resüspanse edilmiştir.
- Hücreler 5 mM asetamid içeren YCB-Agar besiyerine yayma ekim yapıldıktan sonra 30°C'de koloni oluşumu gözleninceye kadar (3 gün) inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3.3. Genomik DNA izolasyonu

Seçici besiyerinde oluşan koloniler 5 mM asetamid içeren 5 mL YCB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. 30°C sıcaklık ve 250 rpm karıştırma hızında 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Büyüme gözlemlenen kolonilerin bulunduğu kültürlerden genomik DNA izolasyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Büyüme görülen 5 mL'lik kültürler steril santrifüj tüplerinde 15000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernetant uzaklaştırılmıştır.
- Hücre peletinin üzerine 200 µl Harju Buffer eklenmiş ve pelet vortekslenerek resüspanse edilmiştir.
- Hücreler etanollü kuru buzda 2 dakika inkübe edilmiştir.
- Hücreler 95°C'de 1 dakika sıcak su banyosunda inkübe edilmiştir.
- Etanollü kuru buz ve sıcak su banyosunda gerçekleştirilen basamaklar tekrar edilmiştir. 30 saniye vorteks uygulanmıştır.
- 200 µl kloroform eklenerek 2 dakika boyunca vorteks uygulanmıştır.

- Oda sıcaklığında 15000 rpm’de 3 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir.
- Oluşan üç fazdan en üstteki faz pipet yardımı ile içerisinde 400 µl soğuk etanol bulunan santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Genomik DNA’nın çökelti oluşturmaları için tüpler -20°C’de 35 dk inkübe edilmiştir.
- Oda sıcaklığında 15000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernetant uzaklaştırılmıştır.
- Çökelti şeklindeki genomik DNA 500 µl %70’lik soğuk etanol çözeltisi ile yıkanmıştır.
- Oda sıcaklığında 15000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernetant uzaklaştırılmıştır.
- Etanolün tamamen uzaklaştırılması için santrifüj tüpleri 42°C’deki etüvde 30 dk inkübe edilmiştir.
- Genomik DNA 20 µl steril distile su ile çözülerek -20°C’de saklanmak üzere etiketlenmiştir.

3.2.3.4. Genomik DNA’nın PCR ile analizi

VEGF₁₆₅-pKLAC2 vektör DNA’sının entegrasyonunun analizi için saflaştırılan 14 adet farklı genomik DNA kalıp olarak kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. 3.2.2’de belirtilen reaksiyon şartlarında gerçekleştirilen 25 µl’lik PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.2.3.5. DNA dizi analizi

Agaroz jel analizi sonucunda klonlamanın başarılı olduğu düşünülen genomik DNA’lara ait PCR ürünleri ‘GENEAID DNA Saflaştırma Kiti’ kullanılarak saflaştırıldıktan sonra VEGF₁₆₅’e ait ileri ve geri primerler (Tablo 3.7) kullanılarak DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.6. Rekombinant VEGF₁₆₅'nin ekspresyonu

PCR ve dizi analizi sonucunda pozitif olduğu düşünölen genomik DNA'ya sahip hücrelerin -80°C'deki stokları ekspresyon amacıyla kullanılmıştır. Rekombinant VEGF₁₆₅ üretimi 300 mL YPGal besiyeri içeren erlenlerde gerçekleştirilmiştir.

Katı besiyerine inokölasyon:

Rekombinant insan VEGF₁₆₅ üreten *K. lactis* GG799 hücreleri 5 mM acetamid içeren YCB agar katı besiyerine inoköle edilmiştir. YCB agar katı besiyerinin içeriğı ve hazırlanışı 3.1.6.2'de belirtilmiştir. *K. lactis* hücreleri 30°C'de koloni oluşumu gözleninceye kadar 72 saat inköbe edilmiştir.

Ön költür:

Genomunda VEGF₁₆₅ genini taşıdığı PCR ve dizi analizi ile tespit edilen *K. lactis* hücreleri steril deney tüplerinde 5 mM asetamid içeren 5 mL YCB sıvı besiyerinde 30°C'de 48 saat boyunca inköbe edilmiştir. YCB sıvı besiyerinin hazırlanışı 3.1.6.2'de belirtilmiştir. Rekombinant *K. lactis* hücrelerinin ön költürü deney tüplerinde 250 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. *K. lactis* hücreleri için optimum büyüme şartları 30°C ve 225 rpm'dir. Transforme edilmemiş *K. lactis* GG799 hücreleri negatif kontrol olarak YPD besiyerine aynı koşullar altında inköbe edilmiştir. Rekombinant protein ekspresyonu öncesinde hücreler 5000 rpm 5 dk santriföj edilmiştir. Besi ortamı uzaklaştırılarak hücre peleti 500 µl YPGal (% 4 galaktoz) ile süspanse edilmiştir. YPGal sıvı besiyerinin hazırlanışı 3.1.6.2'de belirtilmiştir.

Rekombinant VEGF₁₆₅ üretimi:

Rekombinant VEGF₁₆₅ ekspresyonu içerisinde 300 ml YPGal içeren 2 L çalışma hacmine sahip olan erlenlerde gerçekleştirilmiştir. *K. lactis* GG799 hücreleri için protein ekspresyonun en yüksek verimde gerçekleştiği bilinen galaktoz içerikli YPGal besiyerinin hazırlanışı 3.1.6.2’de belirtilmiştir.

Ön kültürde çoğaltılan ve YPGal besiyeri ile süspanse edilen hücreler 300 mL YPGal içeren erlenlere % 1 olacak şekilde inoküle edilmiştir. Hücreler ekspresyon amacıyla 30°C’de 250 rpm’de 3 gün boyunca inkübe edilmiştir. 8000 rpm’de 20 dakika santrifüj sonrasında besiyerini hücre peletinden uzaklaştırılmıştır. Hedef proteinin sekrete edildiği süpernetant protein saflaştırmak üzere kullanılmıştır.

3.2.4. VEGF₁₆₅ proteininin saflaştırılması

3.2.4.1. Protein çöktürme

Santrifügasyon ile hücrelerden arındırılmış ve hedef proteini içeren 300 mL süpernetanttan protein çöktürme yöntemi (salting-out) ile kısmi saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Çöktürme işlemi VEGF₁₆₅ proteini için mitojenik aktivitesinin en yüksek olduğu bilinen %60 amonyum sülfat doygunluğunda gerçekleştirilmiştir (Ferrara ve Henzel, 1989). +4°C’de gerçekleştirilecek olan çöktürme sırasında %0 doygunluktan %60 doygunluğa ulaşılması için eklenmesi gereken amonyum sülfat miktarı 300 mL süpernetant için 111.96 g olarak belirlenmiştir (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.html>).

Buz banyosu içerisinde beher içinde bulunan süpernetanta, +4 °C sıcaklıkta buzdolabında manyetik karıştırıcı üzerinde manyetik bar ile karıştırılarak belirlenen miktardaki amonyum sülfat yavaş yavaş eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Tamamen çözünme gerçekleştikten sonra bir saat boyunca çöktürme işlemine devam edilmiştir.

Çöktürme sonrasında süpernetant +4 °C 12000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrasında süpernetant tamamen uzaklaştırılmış ve elde edilen protein çözeltisi 3 mL 100 mM pH 7.4 olan fosfat tamponu ile süspanse edilmiştir. Böylece hedef protein çözeltisi ilk hacmine göre 30 kat deriştirilmiş ve kısmi olarak saflaştırılmıştır.

3.2.4.2. Afinite kromotografisi

VEGF₁₆₅ proteinine ait gen dizi optimizasyonu sırasında proteinin karboksil ucuna eklenen 10 adet histidin etiketi hedef proteinin afinite kromotografisi ile saflaştırılmasına olanak sağlamıştır. Saflaştırma işlemi şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Saflaştırma yapılacak olan polikarbonat kolon içerisine Ni-NTA Agaroz (nikel bağlı dolgu maddesi) reçineden 0.5 mL kadar eklendikten sonra, kolon 50 mL 100 mM fosfat tamponu (pH 7.4) tamponu ile yıkanmıştır.
- Çöktürme sonrası elde edilen 10 mL protein çözeltisi kolona tatbik edilmiştir ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar (flow through) toplanmıştır.
- Hedef proteinin yüklenmiş olduğu kolon 50 mL pH = 7,4 olan 100 mM fosfat tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş diğer proteinlerin yıkanarak kolondaki safsızlıklar giderilmiştir.
- 300 mM imidazol içeren pH 7.4 100 mM fosfat tamponuyla kolona tutunmuş olan hedef protein 500 µl’lik fraksiyonlar halinde toplam 3 mL ile elüe edilmiştir ve bütün fraksiyonlar toplanarak +4 °C’de saklanmıştır.

3.2.4.3. Diyaliz ile tamponun değıştirilmesi

Protein çöktürme ve afinite kromotografisi sonrasında saflaştırılmış olan rekombinant VEGF₁₆₅ protein çözeltisindeki amonyum sülfatın tamamen uzaklaştırılması ve hücre kültürü denemeleri için daha uygun olan HEPES tamponu ile değıştirilmesi amacıyla diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. 3 ml rekombinant VEGF₁₆₅ protein çözeltisi selüloz

asetat yarıgeçirgen diyaliz membranı (Spectra/Por® 1000 kD MWCO # 131486) içerisine konulduktan sonra 1 litre 20 mM pH7.4 olan HEPES tamponu içerisine bırakılmıştır. Gece boyunca +4°C’de manyetik karıştırıcı üzerinde yavaşça karıştırılarak diyaliz gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. VEGF₁₆₅ proteininin karakterizasyonu

3.2.5.1. Spektrofotometri ile kantitatif analiz

Saflaştırılmış rekombinant VEGF₁₆₅’nin kantitatif analizi için saf protein örneğinin 280 nm dalga boyunda spektrofotometride (Denovix DS-11 FX+) absorbans değeri ölçülmüştür. Saf protein örneğinin elüsyon örnekleri birleştirilmiştir ve karışımın 100 µl’sine protein örneğinin içinde bulunduğu 300 mM imidazol içeren tampon çözeltiden 900 µl ilave edilerek 10 kat seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kör olarak tampon çözeltisi kullanılmıştır. 280 nm’de ölçümler için kuvarz küvet kullanılmıştır. Rekombinant proteine ait amino asit dizisi ‘Expasy ProtParam Tool kullanılarak teorik moleküler ağırlığı ve 280 nm deki ekstinksiyon katsayısı bilgilerine ulaşılmıştır. Seyreltme katsayı dikkate alınarak saf protein numunesinin 280 nm dalga boyunda absorbansı hesaplanmıştır. Sonrasında molar absorpsiyon katsayısı, molekül ağırlığı ve ekstinksiyon katsayısı değerleri dikkate alınarak Lambert-Beer yasasına göre proteinin konsantrasyonu mg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.2.5.2. SDS-PAGE ile kalitatif analiz

Rekombinant VEGF₁₆₅ proteininin kantitatif olarak analizi amacıyla SDS-PAGE işlemi % 4’lük yükleme jeli ve % 12’lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler

Bileşenler	%4'lük Yükleme Jeli (mL)	%12'lik Ayırma Jeli (mL)
Saf su	2.55	4.0
%40 akrilamid	0.35	2.7
Ayırma jeli tamponu	-	2.25
Yükleme jeli tamponu	1.0	-
%10 Amonyum persülfat (APS)	0.05	0.05
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	0.01	0.02

Hazırlanan jel karışımı plakalar arasına yüklendikten sonra tanka yerleştirilmiştir ve tank SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Saflaştırma aşamasında toplanan her fraksiyondan (negatif kontrol olarak çöktürme sonrası *K. lactis* GG799, çöktürme sonrası transforme *K. lactis* GG799 hücrelerine ait protein karışımı, saflaştırılmış *K. lactis* GG799, elüsyon örnekleri) alınan 100 µl'lik örnekler 100 µl numune tamponuyla karıştırılarak 100°C'de 2 dakika denatüre edilmiştir. Örneklerin herbiri SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına 20 µl yüklenmiştir. Proteinler, boya ayırma jelinden uzaklaşmaya kadar 100 mA'de elektroforez gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlanınca tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi ilave edilerek ve 15 dk boyanması sağlanmıştır. Boyanan jel, protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma çözeltisi ile muamele edilmiştir. Jel görüntüsü, protein bantları görünür hale geldikten sonra jel bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alınmıştır.

3.2.5.3. Gümüş boyama ile kalitatif analiz

- SDS-PAGE jeline yüklenerek 100 mA'de elektroforezi gerçekleştirilen örneklerle ait jel oda sıcaklığında 2 saat sabitleyici çözeltide bekletilmiştir.
- Jel yıkama çözeltisi ile 20 dakika çalkalanarak üç kere yıkanmıştır.
- Jel sodyum tiyosülfat çözeltisi ile 2 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir.
- Jel distile su ile iki kere birer dakika çalkalanarak temizlenmiştir.

- Jel gümüş nitrat çözeltisi ile oda sıcaklığında 20 dakika boyanmıştır.
- Protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla jel karbonat çözeltisi ile bant görüntüsü elde edilinceye kadar çalkalanmıştır.
- Boyama işlemi protein bantları yeteri kadar görünür hale gelince durdurucu çözelti ile sonlandırılmıştır.

3.2.6. VEGF₁₆₅ proteininin biyoaktivite çalışmaları

3.2.6.1. Endotel hücreleri için DMEM besisi ortamının hazırlanması

İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC-Human umbilical vein endothelial cells) rekombinant VEGF₁₆₅ proteininin endotel hücrelerinin canlılığına olan etkisinin araştırılması amacı ile DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besisi ortamında % 5 CO₂ içeren 37°C'lik nemli etüvde steril koşullar göz önünde bulundurularak kültüre bırakılmıştır. Gerekli olan besisi ortamının hazırlanışı aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir:

DMEM besisi ortamının içeriği:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (Biochrom)
- %1 L-glutamin (Biochrom)
- %15 FBS (Fetal Bovine Serum) (Biochrom)
- %0.1 gentamisin sülfat (Biological Industries)

3.2.6.2. Endotel hücrelerin çözülmesi ve kültürü

Bu çalışmada kullanılan HUVEC hücre hattı Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden tedarik edilmiştir. Tedarik edildikten sonra kısa süreli olarak -80°C'de muhafaza edilen hücre ampulünün 3/4'ü çözününceye kadar 37°C sıcaklıktaki su banyosunda bekletilmiştir. Dış kısmı alkolle silinerek steril edilen ampule laminar akışlı kabinde önceden 37°C'ye ısıtılmış yaklaşık 1 mL besisi ortamı damla damla ilave edilmiştir ve ampul içeriği bir santrifüj tüpüne geçirilerek toplam hacim 10 mL'ye

ulaşıncaya kadar besi ortamı ilave edilmiştir. 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerden besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Böylece besi ortamı ile birlikte kriyoprotektan (DMSO) uzaklaştırılmıştır. Hücreler az miktar 37°C sıcaklığa ulaşmış olan antibiyotikli DMEM besi ortamı ile süspanse edildikten sonra yaklaşık 12 mL besi ortamı ile karıştırılarak % 5 CO₂ içeren nemli 37°C’lik etüvde büyümeye bırakılmıştır. Yaklaşık 2 saat inkübasyonun ardından hücreleri kültür kabına tutunmaları inverted mikroskop altında gözlenmiştir. 24-48 saat inkübasyon sürelerinde hücrelerin büyümeleeri inverted mikroskop ile takip edilmiştir.

3.2.6.3. Endotel hücrelerin pasajlanması ve dondurulması

Besi ortamındaki nutrientlerin tükenmesi, hücre kültürünün üreme hızının düşmesine ya da hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı çoğaldıkları yüzey alanını %70-80 oranında kaplayan HUVEC kültürünün bir kısmı dondurularak saklanırken bir kısmının aktivite çalışmalarında kullanılmak pasajlama işlemi gerçekteşirilmıştir.

Pasajlama işlemi sırasında kullanılacak olan DMEM besi ortamı, PBS (Biochrom, Ca²⁺, Mg²⁺ içermeyen) ve Trypsin-EDTA sıcak su banyosunda bekletilerek 37 °C sıcaklığa ulaşmaları sağlanmıştır. Malzemeler ve inkübatördeki hücreleri içeren kültür kabı laminar flow kabine alınmadan önce %70’lik alkol ile steril hale getirilmıştir.

- Kültür kabındaki besi ortamı atık kabına yavaşça dökülerek uzaklaştırılmıştır.
- Kültür kabının yüzeyi PBS ile bir kez yıkanmıştır. Bunun için kültür kabının hücre bulunmayan yüzeyine doğru PBS ilave edilmiştir (5 mL/25 cm²) ve hücreler üzerinde PBS yavaşça dolaştırıldıktan sonra PBS atık kabına boşaltılarak uzaklaştırılmıştır.
- Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalkmaları amacı ile 2.5 mL Trypsin-EDTA çözeltisi hücrelerin üzerine bırakılmış ve 37°C’deki inkübatörde yaklaşık 2-3 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Yüzeyden ayrılmayan hücreler için mekanik etki uygulanmıştır ve inverted mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları gözlemlenmiştir.
- Hücrelere toksik etki gösteren Trypsin-EDTA çözeltisinin serumlu besi ortamı ile inaktivasyonu gerçekteşirilmıştir. 8-10 ml besi ortamı ilave edilmiştir ve pipet

yardımıyla köpük oluşmamasına özen gösterilerek hücreler besi ortamında süspanse edilmiştir.

- Santrifüj işlemi öncesinde hücre sayımı için 100 µl hücre süspansiyonu 100 µl tripan mavisi ile pipet yardımıyla homojenize edilmiştir.

Hücre sayımı: Neubauer lamı üzerine bırakılan bir miktar hücre süspansiyonun 10X büyütme ile inverted mikroskopta sayımı gerçekleştirilmiştir. 4 büyük karede hücreler hemositometre ile sayılmıştır. Hemositometre ile sayım yapıldığında yaklaşık olarak bir karede 80 canlı hücre olduğu gözlemlendi ve toplam 4 karede yaklaşık 320 canlı hücre olduğu kabul edilmiştir.

Neubauer lamında sayım sonucu toplam hücre miktarını hesaplayabilmek için kullanılan formül;

$A \times 10^4 \times SF$ / Toplam sayılan kare

A: sayılan karelerdeki toplam hücre sayısı

10^4 : 0.1mm³ deki sayım sonucu 1mL'deki sayıya dönüştürmek için katsayı

SF: seyreltme faktörü

Sonuç olarak hücre konsantrasyonu $320 \times 10.000 \times 2/4 = 16 \times 10^5$ h/mL olarak belirlenmiştir.

10 ml örnek olduğu için; 16×10^5 h/mL $\times$ 10mL = 16 milyon toplam hücre sayısı olarak belirlenmiştir. 1/4 oranında pasajlama oranı uygun görülmüştür.

- Hücre süspansiyonunun yarısı pasajlama diğer yarısı dondurma için kullanılmıştır. Bu yüzden hücreler ikiye bölünerek iki ayrı steril santrifüj tüpünde 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası üstte kalan besi ortamı steril şartlarda uzaklaştırıldıktan sonra, kalan az miktar besi ortamı ile hücre peleti homojenize edilmiştir. Süspanse hale getirilen hücreler üzerine 6 mL taze besi ortamı eklenmiştir.
- Pasajlama oranı 1/4 olduğu için 3'er ml hücre süspansiyonu 2 adet steril kültür kaplarına ilave edilmiştir. 9 ml taze besi ortamı ilavesi ile kültür hacmi 12 ml olarak tamamlanmıştır. Etiketlenen kültür kapları 37°C'deki % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.

- Diğer santrifüj tüpündeki hücreler dondurularak saklanmıştır. Bunun için hücre pelleti elde edildikten sonra 0.4 mL DMSO ve 3.6 mL serum karıştırılarak 4 mL dondurma ortamı hazırlanmıştır.
- Hücreler dondurma ortamı ile birleştirildikten sonra 4 ampüle 1'er mL olacak şekilde hızlıca bölünmüştür. Hazırlanan ampüller -80°C'de saklanmıştır.

3.2.6.4. Rekombinant VEGF₁₆₅'nin endotel hücre büyümesine olan etkisi (MTT testi)

Rekombinant VEGF₁₆₅'nin HUVEC kültürünün canlılığı üzerine olan etkisi 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromürün yaşayan hücrelerde formazan tuzu oluşturması prensibine dayalı kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi ile belirlenmiştir. Bu denemede pozitif kontrol olarak ticari VEGF₁₆₅ (Recombinant human VEGF 165A #ab9571) kullanılmıştır. 0.1 mg/mL konsantrasyonundaki ticari VEGF₁₆₅'nin önerilen kullanım konsantrasyon aralığı (1.0-8.0 ng/mL) dikkate alınarak 11 farklı konsantrasyon (Tablo 3.14) belirlenmiştir. Spektrofotometrik analiz ile konsantrasyonu yaklaşık 0.1 mg/ml olarak tespit edilen rekombinant VEGF₁₆₅'nin ticari VEGF₁₆₅ için belirlenmiş olan konsantrasyonlar ile aynı konsantrasyonlarda etkisi araştırılmıştır. Negatif kontrol olarak VEGF₁₆₅'nin içinde bulunduğu 20 mM HEPES (pH 7.4) tampon çözelti kullanılmıştır. MTT testi şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

1. 100 µl hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarının belirlenen kuyucuklarına yaklaşık 4×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde tekrarlı olarak ekimi gerçekleştirilmiştir. Bu denemede ticari ve rekombinant VEGF₁₆₅ için belirlenen her bir konsantrasyon için 3 tekrar, negatif kontrol için 2 tekrar gerçekleştirilmiştir.
2. Hücreler 96 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarında 37°C'deki % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.
3. 24 saat inkübasyonun ardından kuyucukların besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Besi ortamı (DMEM) ile 20 ng/mL konsantrasyona seyrettilen pozitif kontrol, rekombinant VEGF₁₆₅ ve negatif kontrolün belirlenen konsantrasyonlardaki dilusyon örnekleri kuyucuklara belirlenen plaka düzenine göre (Çizelge 3.14) ilave edilmiştir. 2 ve 6. günde MTT testi sonuçlarını almak üzere hücreler 37°C'deki % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

4. İnkübasyon sonunda hücre kültürü plakalarının besisi ortamı uzaklaştırılmıştır ve hücrelerin üzerine 0.5 mg/mL konsantrasyonda MTT içeren besisi ortamı eklenir.
5. Hücreler karanlıkta 37 °C’de, % 5 CO₂’li inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenip, 5 dakika boyunca hücreler karanlıkta bekletilmiştir. Böylece DMSO eklenmesi ile formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır.
6. Mikropilaka okuyucu cihaz ile 570 nm dalga boyunda plakaların absorbans değerleri kaydedilmiştir.
7. Elde edilen absorbans değerleri ‘Graphpad’ programı kullanılarak örneklerin en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı olarak tanımlanan EC₅₀ değerleri ng/mL cinsinden hesaplanmıştır.

Çizelge 3.14. Pozitif kontrol, rekombinant VEGF₁₆₅ ve negatif kontrolün uygulama konsantrasyonları

Kuyucuk	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konsantrasyon (ng/ml)	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.156	0.078	0.039	0.019	0.009

3.2.6.5. *In vitro* yara iyileşmesi

In vitro yara iyileşmesi için kullanılacak olan ve -80°C’de muhafaza edilen L929 fibroblast hücre hattına ait hücre ampulü 3/4’ü çözününceye kadar 37°C su banyosunda bekletilmiştir. Dış kısmı alkolle silinerek steril edilen ampule laminar akışlı kabinde önceden 37°C’ye ısıtılmış yaklaşık 1 ml DMEM besisi ortamı damla damla ilave edilmiştir ve ampul içeriği bir santrifüj tüpüne geçirilerek toplam hacim besisi ortamı ile 10 mL’ye tamamlanmıştır. 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerden besisi ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücreler antibiyotikli DMEM besisi ortamı ile süspansiyon edildikten sonra yaklaşık 12 mL besisi ortamı ile karıştırılarak %5 CO₂ içeren nemli 37°C’lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Yaklaşık 2 saat inkübasyonun ardından hücreleri kültür kabına tutunmaları inverted mikroskop altında gözlenmiştir. 24-48 saat inkübasyon sürelerinde hücrelerin büyümeleri inverted mikroskop ile incelenmiştir. Neubauer lamı ile sayımı gerçekleştirilerek mililitredeki hücre sayısı hesaplanmıştır.

Standart yara modeli oluşturulması için DMEM besi ortamında kültüre edilmiş L929 fibroblast hücreleri her bir gözünde 10^4 hücre olacak şekilde 6 gözlü iki adet kültür kabına (24. ve 48. saatler için) ekimi gerçekleştirilmiştir ve hücreler %5 CO₂'li etüvde 37°C'de inkbe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunduğu gözlenmiştir. Kültür kabının %90'nını kaplayan hücre tabakasında standart yara modeli meydana getirmek amacıyla 200 l'lik steril pipet ucu ile kültür kabının her gözü ortadan ikiye bölünecek şekilde çizilerek yara modeli oluşturulmuştur. Kültür kabının inverted mikroskop ile görüntüsü kaydedilmiştir. Yara yüzeyi oluşturulan kültür kaplarının gözleri besi ortamı ile yıkanarak kaldırılan hücreler uzaklaştırılmıştır. Negatif kontrol, bu çalışmada üretilen saf rekombinant VEGF₁₆₅ ve pozitif kontrol (ticari VEGF₁₆₅) olmak üzere üç adet test maddesi iki tekrarlı olarak besi ortamı içerisinde belirlenen konsantrasyonlarda yara modeli oluşturulan 6 gözlü kültür kabına ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak besi ortamı kullanılmıştır. Rekombinant VEGF₁₆₅'nin yüksek aktivite gösterdiği iki konsantrasyon değeri (5 ve 10 ng/ml) nceki çalışmadan elde edilen değerler ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol aynı konsantrasyonlarda kültür kabına eklenmiştir. Hücreler %5 CO₂'li etüvde 37°C'de inkbe edilmiştir. 0., 24. ve 48. saatlerde kültür kabının mikroskop altında görüntüsü elde edilerek yara iyileşmesi takip edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kodon Optimizasyonu

NCBI (The National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak elde edilen VEGF₁₆₅ genine ait DNA sekansı aşağıdaki belirtilmiştir:

Vascular endothelial growth factor isoform VEGF₁₆₅ [Homo sapiens]

GenBank: AF486837.1

```
1 atgaactttc tgctgtcttg ggtgcattgg agccttgccct tgctgtctcta cctccaccat
61 gccaaagtgt cccaggctgc acccatggca gaaggaggag ggcagaatca tcacgaagtg
121 gtgaagtcca tggatgtcta tcagcgcagc tactgccatc caatcgagac cctgggtggac
181 atcttccagg agtaccctga tgagatcgag tacatcttca agccatcctg tgtgcccctg
241 atgcatgctg ggggctgctg caatgacgag ggcctggagt gtgtgcccac tgaggagtcc
301 aacatcacca tgcagattat gcggatcaaa cctcaccaag gccagcacat aggagagatg
361 agcttcctac agcacaacaa atgtgaatgc agaccaaaga aagatagagc aagacaagaa
421 aatccctgtg ggccttgctc agagcggaga aagcatttgt ttgtacaaga tccgcagacg
481 tgtaaatgtt cctgcaaaaa cacagactcg cgttgcaagg cgaggcagct tgagttaaac
541 gaacgtactt gcagatgtga caagccgagg cgggtga
```

Yukarıda görülen insan VEGF₁₆₅ genine ait DNA sekansı 576 bp büyüklüğünde olup 191 amino asit büyüklüğünde bir proteine aittir. Bu büyüme faktörüne ait amino asit dizisi aşağıdaki gibidir:

İnsan VEGF₁₆₅'e ait amino asit sekansı:

```
MNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLV
DIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGGHIG
EMSFLQHKNCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTKCSCKNTDSRCKARQL
ELNERTCRCDKPRR
```

İnsan VEGF₁₆₅'e ait sekansın *K. lactis* maya sistemine göre optimize edilmiş hali:

```
atgaatttcttactttcatgggttcattgggtcattggcgcttcttttgtacttgcatcacgcaaaatggt
ctcaagcggcgccaatggctgagggaggaggtcaaaatcatcatgaagttgtgaagttcatggacgtcta
tcagaggagttactgccatcccatcgagactttggttgatataattccaagagtaccgggacgagatcgaa
tatatttttaaaccttcttgtgtaccccttatgagatgcggtggttgttgcaacgacgaaggattagaat
gtgtgccaaactgaagaatcaaacattacaatgcaaattatgcgtattaaaccacatcaagggcaacacat
tggcgaaatgtccttcttacagcataacaaatgcgagtgcaggccaaagaaagatcgtgcgagacaagaa
aaccggtgcggcccatgcagtgagcgtagaaaacacttattcgtccaagatccgcaaacctgcaagtgtt
cttgtaaaaaatactgattcaagatgtaaggctagacaattagaattgaacgaaagaacctgccgttgtga
taaaccaagaagatga
```

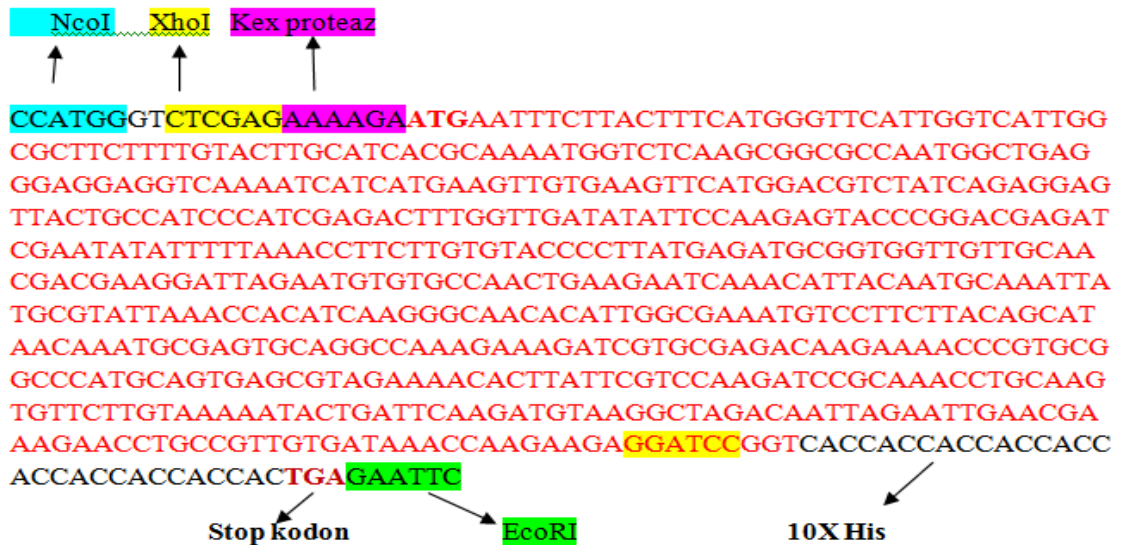
4.2. Vektör Optimizasyonu

Optimize edilmiş insan VEGF₁₆₅'e ait sekansın *K. lactis* pKLAC2 vektör sistemine klonlanması hedeflenmiştir.

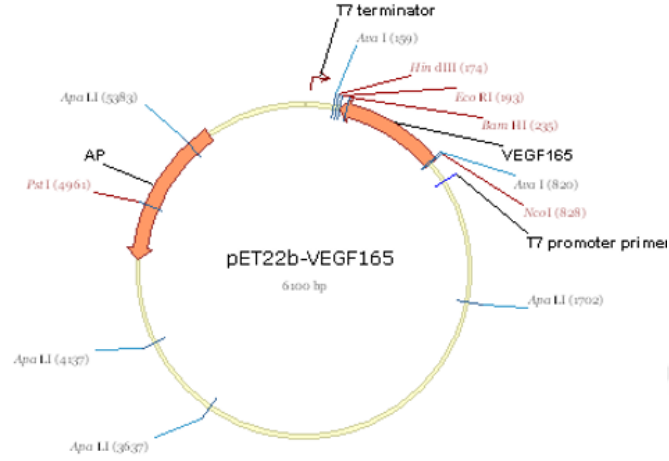
K. lactis organizmasına göre optimizasyonu yapılan dizinin *K. lactis* pKLAC2 vektör sistemine klonlanması için uygun restriksiyon enzim kesim bölgeleri (*XhoI*, *EcoRI*) dizinin her iki ucuna teorik olarak eklenmiştir. Yapay olarak sentezlenecek olan bu dizinin sonraki, çalışmalarda *E.coli* pET28b vektörüne de *NcoI* ve *EcoRI* enzimleri ile klonlanabilmesi için gerekli bu enzimlere ait kesim bölgeleri de diziye eklenmiştir. *K. lactis* vektör dizisinde bulunan α -mating faktör sinyal dizisi proteinin eksprese edildikten sonra hücre içine sekresyonunu sağlamaktadır. *XhoI* ile kesim sonrasında bu sinyal dizisinin karboksil ucundaki Kex proteaz kesim bölgesinin (dizide pembe ile gösterilmiştir) kaybı, yapay olarak sentezlenecek dizinin amino ucuna eklenmesi ile telafi edilmiştir. Dizinin sonuna eklenen 10 adet Histidin amino asidine ait dizi, ekspresyon sonrasında proteinin afinite kromatografi ile saflaştırılması amacıyla genin karboksil ucuna eklenmiştir. Sonuç olarak hem bakteri hem de maya sistemlerinde klonlamaya imkan sağlayacak şekilde optimizasyon gerçekleştirilmiştir.

4.3. Yapay Gen Sentezi

Yapay olarak sentezlenmiş DNA dizisi :

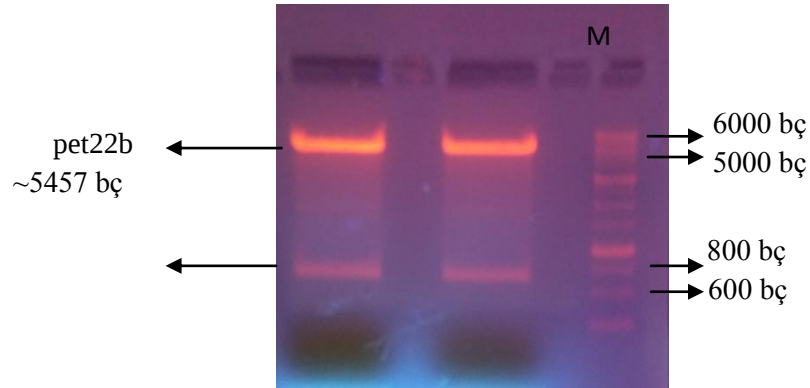


Yapay olarak sentezlenmesi istenilen DNA sekansı *NcoI* ve *EcoRI* enzimleri ile pet22b vektör sistemine klonlanmış halde ticari olarak tedarik edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. pET22b-VEGF₁₆₅ konstrüktü

4.4. VEGF₁₆₅ Geninin Agaroz Jelden Saflaştırılması



Şekil 4.2. Restriksiyon kesimi sonrasında pET22b-VEGF₁₆₅'nin agaroz jel görüntüsü M: markör DNA (1000 kb DNA Ladder)

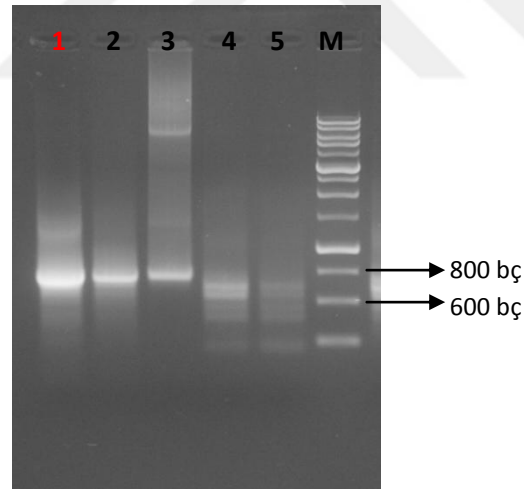
pET22b-VEGF₁₆₅'nin *XhoI* ve *EcoRI* enzimleri ile kesim sonrasında 5457 bp büyüklüğünde büyük fragment, 633 bp büyüklüğünde küçük fragment olmak üzere iki fragment oluşması beklenmiştir. Şekil 2'de görüldüğü üzere VEGF₁₆₅ geni markör DNA ile karşılaştırıldığında istenilen büyüklükte yaklaşık 633 bp olduğu görülmektedir.

4.5. PCR Optimizasyonu

PCR’de her iki primer için bağlanma sıcaklığının optimizasyonu için Gradient PCR gerçekleştirilmiştir. 87-63°C arasındaki 5 farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jel elektroforezinde koşulmuştur. 5 farklı sıcaklık değeri ve bu sıcaklıklarda elde edilen PCR ürünlerinin yüklenmiş oldukları kuyucuk numaraları Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Gradient PCR bağlanma sıcaklıkları

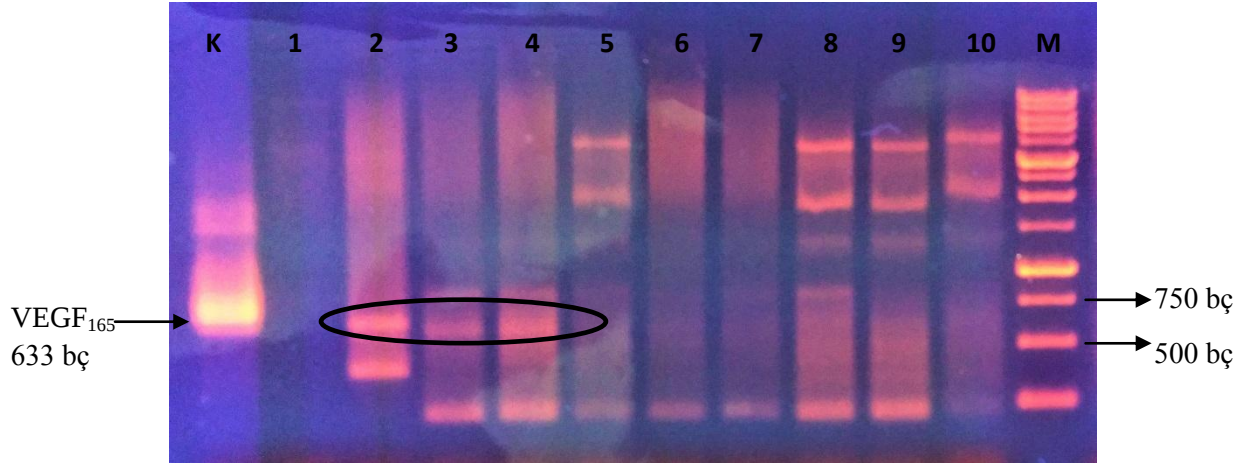
	Kullanılan primer çifti	Primerlerin T _m Değerleri (°C)	Kuyucuklara ait bağlanma sıcaklıkları (°C)				
			1	2	3	4	5
Gradient PCR 3	<i>XhoI</i> -VEGF Sense <i>EcoRI</i> -VEGF Reverse	64-74	65	67.5	71.0	73.5	76.5



Şekil 4.3. Farklı bağlanma sıcaklıklarında Gradient PCR ürünleri

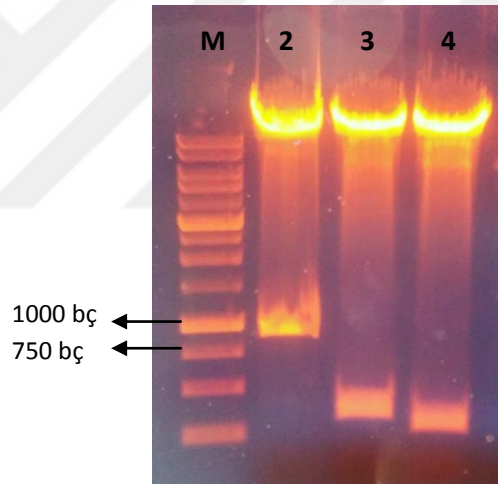
M: Markör DNA (1000kb DNA Ladder)

Agaroz jeldeki görüntüsü (Şekil 4.3) incelendiğinde 5 farklı sıcaklık arasından en yüksek verimde ürün veren bağlanma sıcaklığının 1 numaralı kuyucuktaki öreneğe ait olan 65°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. PCR ile plazmit DNA analizinin jel görüntüsü

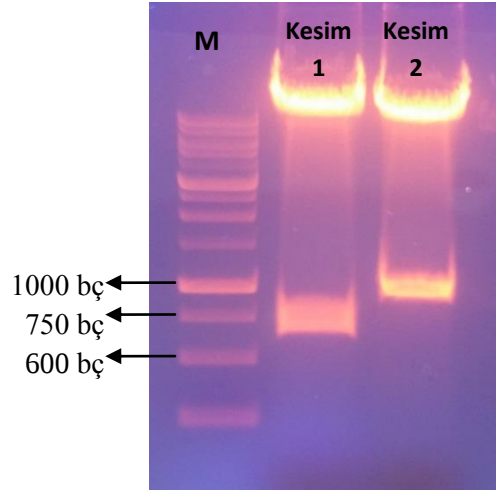
K: Kontrol DNA (VEGF₁₆₅) M: Markör DNA (1000kb DNA Ladder)



Şekil 4.6. Restriksiyon enzim kesimi ile plazmit DNA analizinin jel görüntüsü

M: Markör DNA (1000kb DNA Ladder)

PCR analizi sonucunda pozitif olduğu düşünülen 2,3 ve 4 numaralı örneklerin *Hind*III ve *Eco*RI restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrasında istenilen büyüklükte iki DNA fragmentlerini (8833 bç ve 891 bç) ihtiva edip etmedikleri % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Jel görüntüsüne göre sadece 2 numaralı plazmit DNA'nın istenilen büyüklükte iki DNA fragmenti içerdiği görülmüştür (Şekil 4.6).



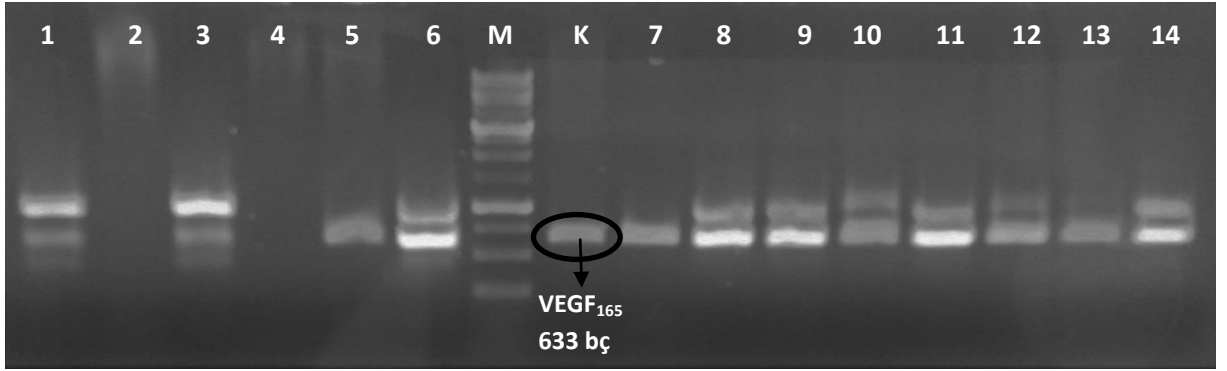
Şekil 4.7. Farklı restriksiyon enzimleri ile klonlamanın analizi

M: Markör DNA(1000kb DNA Ladder)

Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere 2 numaralı plazmit DNA Kesim 1'de *XhoI-EcoRI* ile, Kesim 2'de *HindIII-EcoRI* enzimleri ile kesim gerçekleştirilmiş ve agaroz jelde analiz edilmiştir. Kesim 1 ve 2 'de görülen küçük fragmentlerin istenilen büyüklükte olması (sırasıyla 633 bç ve 891 bç) DNA sekans analizi öncesi klonlamanın 2 numaralı plazmit DNA'da başarıyla gerçekleştirildiğini desteklemektedir.

4.8. Genomik DNA Analizi

VEGF₁₆₅-pKLAC2 rekombinant plasmid DNA'sı lineerize edildikten sonra elektroporasyon yöntemi ile *K. lactis* GG799 hücrelerine aktarılmış ve asetamid içeren seçici besiyerinde oluşan kolonilerin herbirinden genomik DNA saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan genomik DNA'lardan PCR reaksiyonu sonucunda agaroz jel elektroforezi sonucunda VEGF₁₆₅ genine ait 633 bç büyüklüğünde DNA fragmenti veren 12 adet örnek (Şekil 4.8) (1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 no'lu genomik DNA'lar) ile ekspresyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

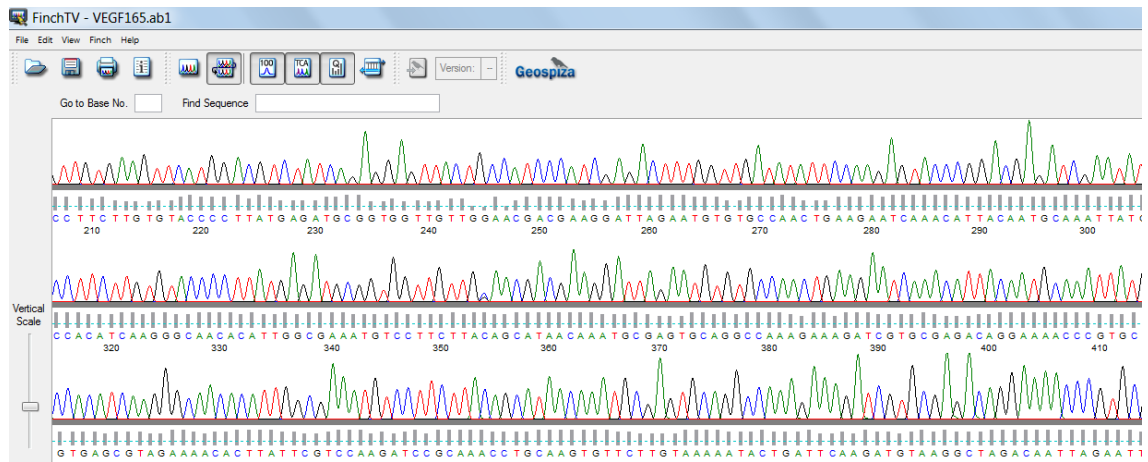


Şekil 4.8. Farklı genomik DNA'ların PCR ile analizi

M: Markör DNA (1000kb DNA Ladder) K: Kontrol DNA(VEGF₁₆₅)

4.9. DNA Dizi Analizi

PCR ile genoma entegrasyonun başarılı olduğu düşünülen genomik DNA'lara sahip *K. lactis* GG799 hücreleri ile küçük ölekte ekspresyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerde SDS-PAGE analizi ile ekspresyonun başarı ile gerçekleştirildiği düşünülen genomlara ait PCR ürünleri DNA analizi ile değerlendirilmiştir. Kromatogramlar Finch TV programı kullanılarak okunmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Pozitif genomik DNA'nın dizi analizi kromatogram sonucu

İleri ve geri olmak üzere 2 primer kullanılarak analiz edilen genomik DNA'ların dizi analizi sonucu elde edilen sekans dizileri ile VEGF₁₆₅ genine ait DNA dizisi NCBI BLAST programı kullanılarak iki dizi karşılaştırılmış ve benzerlik oranı tespit

edilmiştir. Bu genomik DNA’lardan en iyi DNA dizi analizi veren (7 numaralı genomik DNA) örneğinin sonuçları değerlendirildiğinde bu genomik DNA’ya VEGF₁₆₅ genine ait 584 nükleotitten 580 nükleotitin genome entegre olduğu Şekil 4.10’da görülmektedir. Aynı şekilde bu genomik DNA’ya ait amino asit dizisi VEGF₁₆₅ genine ait amino asit dizisi CLUSTAL OMEGA programı kullanılarak karşılaştırılmıştır ve %99 oranında benzerlik görülmüştür (Şekil 4.11). Bu sonuçlar VEGF₁₆₅ genine ait DNA dizisinin *K. lactis* GG799 hücrelerine ait genoma başarılı bir şekilde entegre edildiğini doğrulamaktadır.

	Score	Identities	Gaps
	1055 bits(571)	580/584(99%)	1/584(0%)
VEGF165	18	ATGGGTTC-TTGGTCATTGGCGCTTCTTTTGTACTTGCATCACGCAAAATGGTCTCAAGC	77
RekombinantVEGF165	2	ATGGGATCATTTGGTCATTGGCGCTTCTTTTGTACTTGCATCACGCAAAATGGTCTCAAGC	60
VEGF165	78	GGCGCCAATGGCTGAGGGAGGAGGTCAAAATCATCATGAAGTTGTGAAGTTCATGGACGT	137
RekombinantVEGF165	61	GGCGCCAATGGCTGAGGGAGGAGGTCAAAATCATCATGAAGTTGTGAAGTTCATGGACGT	120
VEGF165	138	CTATCAGAGGAGTTACTGCCATCCCATCGAGACTTTGGTTGATATATTCCAAGAGTACCC	197
RekombinantVEGF165	121	CTATCAGAGGAGTTACTGCCATCCCATCGAGACTTTGGTTGATATATTCCAAGAGTACCC	180
VEGF165	198	GGACGAGATCGAATATATTTTAAACCTTCTTGTGTACCCCTTATGAGATGCGGTGGTTG	257
RekombinantVEGF165	181	GGACGAGATCGAATATATTTTAAACCTTCTTGTGTACCCCTTATGAGATGCGGTGGTTG	240
VEGF165	258	TTGCAACGACGAAGGATTAGAATGTGTGCCAACTGAAGAATCAAACATTACAATGCAAAAT	317
RekombinantVEGF165	241	TTGGAACGACGAAGGATTAGAATGTGTGCCAACTGAAGAATCAAACATTACAATGCAAAAT	300
VEGF165	318	TATGCGTATTAAACCACATCAAGGGCAACACATTGGCGAAATGTCCTTCTTACAGCATAA	377
RekombinantVEGF165	301	TATGCGTATTAAACCACATCAAGGGCAACACATTGGCGAAATGTCCTTCTTACAGCATAA	360
VEGF165	378	CAAATGCGAGTGCAGGCCAAAGAAAGATCGTGCGAGACAGGAAAACCCGTGCGGCCCATG	437
RekombinantVEGF165	361	CAAATGCGAGTGCAGGCCAAAGAAAGATCGTGCGAGACAAGAAAACCCGTGCGGCCCATG	420
VEGF165	438	CAGTGAGCGTAGAAAACACTTATTCGTCCAAGATCCGCAAACCTGCAAGTGTCTTGTAA	497
RekombinantVEGF165	421	CAGTGAGCGTAGAAAACACTTATTCGTCCAAGATCCGCAAACCTGCAAGTGTCTTGTAA	480
VEGF165	498	AAATACTGATTCAAGATGTAAGGCTAGACAATTAGAATTGAACGAAAGAACCTGCCGTTG	557
RekombinantVEGF165	481	AAATACTGATTCAAGATGTAAGGCTAGACAATTAGAATTGAACGAAAGAACCTGCCGTTG	540
VEGF165	558	TGATAAACCAAGAAGAGGATCCGGTCACCACCACCACCACCACC	601
RekombinantVEGF165	541	TGATAAACCAAGAAGAGGATCCGGTcaccaccaccaccaccacc	584

Şekil 4.10. Pozitif genomik DNA’nın VEGF₁₆₅ ile karşılaştırılması

VEGF165	MGLEKRMNFLLSVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHP
RekombinantVEGF165	-----MGSWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHP

VEGF165	IETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCCGNCDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG
RekombinantVEGF165	IETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCCGNCDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQG

VEGF165	QHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCCKSCKNTDSRCKA
RekombinantVEGF165	QHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQENPCGPCSERRKHLFVQDPQTCCKSCKNTDSRCKA

VEGF165	RQLELNERTCRCDKPRRGSGHHHHHHHHH
RekombinantVEGF165	RQLELNERTCRCDKPRRGSGHHHHHHHR---
	*****;

Şekil 4.11. Pozitif genomik DNA'ya ait amino asit dizisinin VEGF₁₆₅ ile karşılaştırılması

4.10. Rekombinant VEGF₁₆₅ Proteinin Kalitatif ve Kantitatif Analizi

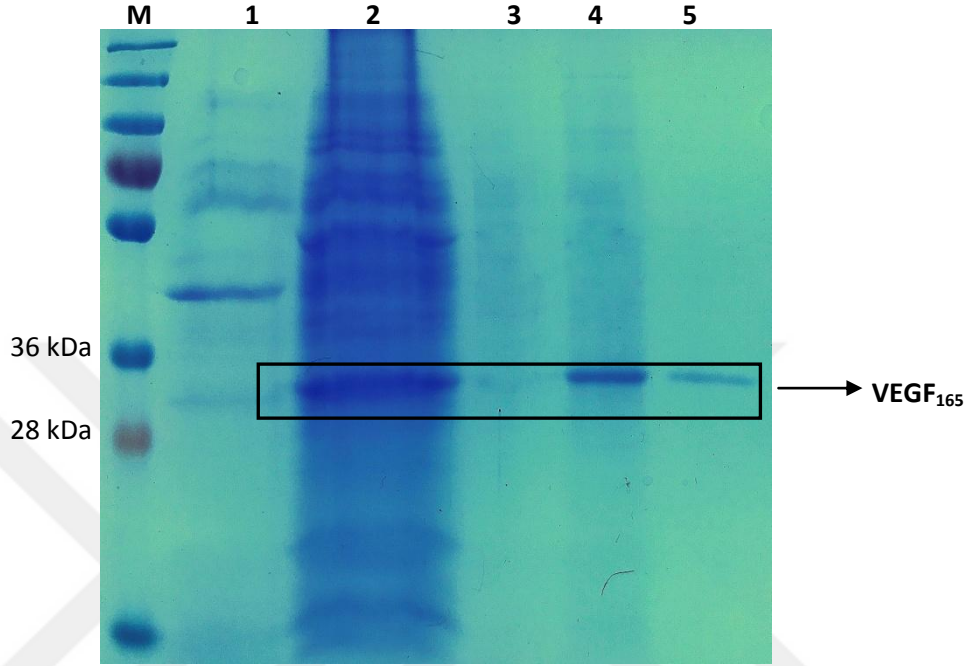
4.10.1. Spektrofotometrik analiz

Saflaştırılmış rekombinant VEGF₁₆₅'nin kantitatif analizi için saf protein örneğinin 280 nm dalga boyunda spektrofotometride (Denovix DS-11 FX+) absorbans değeri ölçülmüştür. 10 kat seyretilmiş protein çözeltisinin seyreltme katsayısı dikkate alınarak 280 nm'deki absorbans değeri 0.1 olarak elde edilmiştir. 'ExPASy ProtParam Tool' kullanılarak rekombinant proteine ait amino asit dizisi, teorik moleküler ağırlığı ve 280 nm'deki ekstinksiyon katsayısı değerlerine ulaşılmıştır. Optimize edilmiş monomer yapıdaki VEGF₁₆₅ proteine ait amino asit sekansına göre proteinin molekül ağırlığı yaklaşık 23.8 kDa, 280 nm'de ekstinksiyon katsayısı 24950 M⁻¹ cm⁻¹ olarak belirlenmiştir. Spektrofotometri cihazına proteine ait değerler girildiğinde protein çözeltisinin konsantrasyonu 0.1 mg/ml olarak elde edilmiştir. Bir litre kültürden yaklaşık 1.7 mg saf protein elde edilmiştir.

4.10.2. SDS-PAGE analizi

Numune tamponu ile denatüre edilmiş olan örneklerin (negatif kontrol olarak çöktürme sonrası *K. lactis* GG799, transforme *K. lactis* GG799 hücrelerine çöktürme sonrası protein karışımı, saflaştırılmış *K. lactis* GG799, elüsyon örnekleri) 20'şer µl SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklenerek 100 mA'de elektroforez

gerçekleştirilmiştir. Boyama çözeltisi ilave edilerek görünür hale getirilen protein bantlarına ait jel bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alınmıştır (Şekil 4.12).

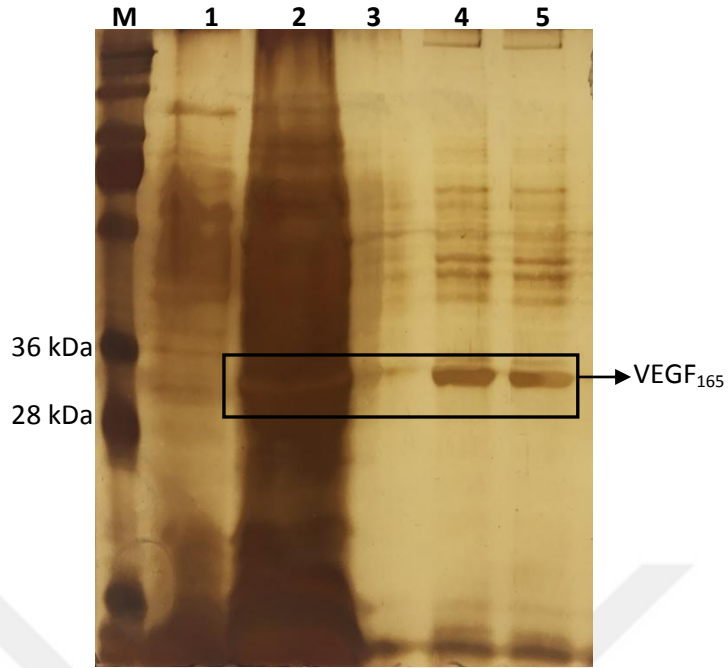


Şekil 4.12. SDS-PAGE jel görüntüsü

- M: Protein Marker
1: *K. lactis* protein çöktürme
2: Pozitif *K. lactis* hücreleri protein çöktürme
3: *K. lactis* saflaştırma sonrası (negatif kontrol)
4,5: Saf VEGF₁₆₅ proteini

4.10.3. Gümüş Boyama

Gümüş nitrat çözeltisi ilave edilerek görünür hale getirilen protein bantları jel bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alınmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. SDS-PAGE gümüş boyama jel görüntüsü

- M: Protein Marker
1: *K. lactis* protein çöktürme
2: Pozitif *K. lactis* hücreleri protein çöktürme
3: *K. lactis* saflaştırma sonrası (negatif kontrol)
4,5: Saf VEGF₁₆₅ proteini

Elde edilen SDS-PAGE jelinin Coomassie Brilliant Blue ve gümüş nitrat ile boyanması sonucu elde edilen jel görüntüleri analiz edildiğinde, 1. kuyucukta görülen protein bantları yabancı tip (wild-type) *K. lactis* GG799'e ait tüm ekstraselüler proteinlerin protein çöktürme işlemi sonrasında elde edilen görüntüleridir. Buna karşılık VEGF₁₆₅ geninin *K. lactis* genomuna entegre olduğu yani klonlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği transforme *K. lactis* hücrelerine ait proteinlerin protein çöktürme sonrasında elde edilen bantları 2. kuyucukta yer almaktadır. Bu görüntüden anlaşılabileceği gibi 1. kuyucukta yer almayıp 2. kuyucukta gözlenen protein bandı VEGF₁₆₅ proteinin büyüklüğüne karşılık gelmekte olup bu bant transforme *K. lactis* hücrelerinde ekspresyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. 3. kuyucukta ise yabancı tip (wild-type) *K. lactis*'e ait tüm ekstraselüler proteinlerin protein çöktürme işlemi sonrasında afinite kromatografi ile saflaştırılması sonucu elde edilen örnek yer almaktadır. Bu örnekte VEGF₁₆₅ proteinin büyüklüğünde herhangi bir protein bandının görülmemiş olması bu örneğin negatif kontrol olarak tanımlanmasını doğrulamaktadır. 4. ve 5. kuyucuklarda afinite kromatografisi sonucu elde edilen elüsyon fraksiyonları

gözlenmektedir. Bu kuyuculardan saf protein bandının büyüklüğü monomer VEGF₁₆₅'nin molekül ağırlığından (~ 20 kDa) büyük olması beklenen bir sonuçtur. Bu büyüklük farkının hem proteinin karboksil ucuna eklenmiş olan histidin amino asitlerinden kaynakladığı hem de *K. lactis*'in gelişmiş glikolizasyon mekanizması sonucu proteine eklenen gruplardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.11. Rekombinant VEGF₁₆₅'nin Endotel Hücre Canlılığına Etkisi

Rekombinant VEGF₁₆₅'nin hücre canlılığına olan etkisi insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kullanılarak tespit edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan ticari VEGF₁₆₅'nin önerilen konsantrasyon değeri (8-10 ng/ml) dikkate alınarak 11 farklı konsantrasyon belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak proteinin içerisinde bulunduğu tampon çözelti kullanılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlarda rekombinant ve ticari VEGF₁₆₅'nin DMEM besi ortamında çoğaltılmış olan HUVEC kültürü ile inkübasyonu 96 kuyucuklu steril hücre kültürü plakalarında gerçekleştirilmiştir. Rekombinant ve ticari VEGF₁₆₅ 3 tekrarlı, negatif kontrol ise 2 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Bu amaç ile uygulanan MTT analizi ile 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromürün canlı hücrelerde formazan tuzu oluşturması sağlanmış ve kolorometrik olarak 570 nm'deki absorbands değerleri Çizelge 4.2'de belirtilmiştir.

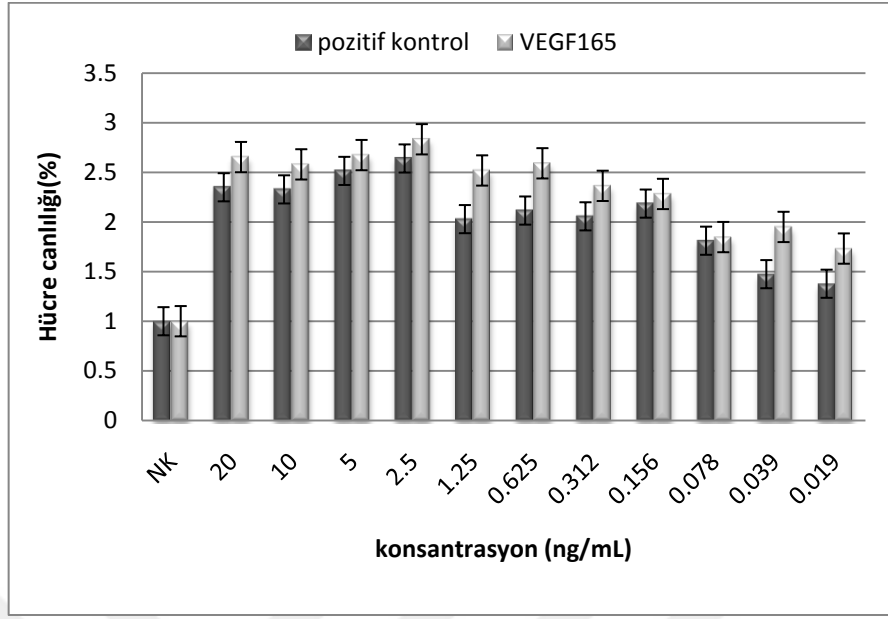
Çizelge 4.2. MTT analizine ait 570 nm absorbands değerleri

Konsantrasyon (ng/mL)	NK	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Pozitif Kontrol	1.1976	1.2493	1.6918	1.3679	1.2212	1.4374	1.4436	1.847	1.3495	1.4919	1.4317	1.5355
	1.2577	1.7691	1.7592	1.6732	1.5921	1.6582	1.541	1.6785	1.5869	1.6441	1.5851	1.5334
	1.1255	1.6712	1.6969	1.5344	1.5969	1.6334	1.7023	1.6204	1.7905	1.531	1.5153	1.3264
VEGF ₁₆₅	1.1619	1.669	1.2999	1.4668	1.6885	1.7191	1.694	1.538	1.6907	1.7378	1.7001	1.354
	1.1992	1.4901	1.4157	1.5691	1.7374	1.3445	1.6132	1.5428	1.5862	1.7144	1.7501	1.3664
	1.4134	1.6393	1.6776	1.6113	1.7712	1.4443	1.4998	1.6223	1.616	1.6039	1.6718	1.4433
Negatif Kontrol	1.3053	1.6798	1.595	1.6621	1.5964	1.2654	1.2021	1.588	1.433	1.5379	1.2237	1.3085
	1.3379	1.5729	1.2894	1.3494	1.5212	1.4896	1.5097	1.5245	1.1955	1.5061	1.3296	1.3309

Çizelge 4.3. MTT analizine ait 570 nm absorbans değerleri ortalamaları

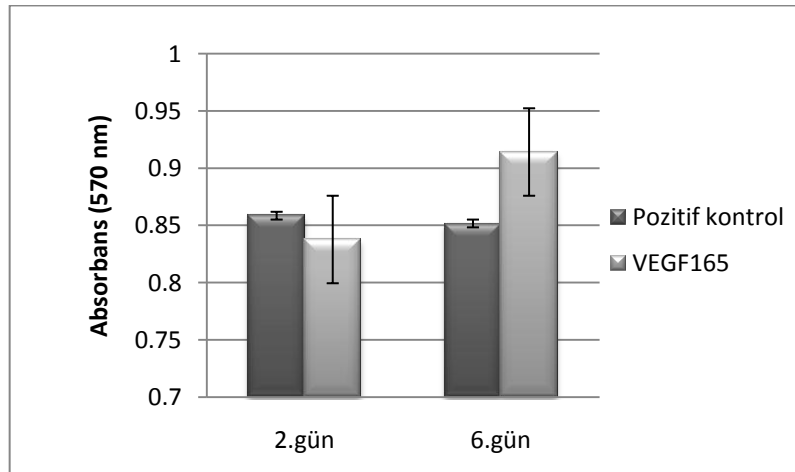
Kuyucuk		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Konsantrasyon (ng/mL)		NK	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	0,019
Pozitif Kontrol	Ort.	1,193	1,563	1,715	1,525	1,47 ^{ab}	1,576	1,562	1,715 ^b	1,575 ^{ab}	1,555 ^a	1,51 ^b	1,465
	Ss.	0,066	0,276	0,038	0,153	0,216	0,121	0,131	0,118	0,221	0,079	0,077	0,120
VEGF ₁₆₅	Ort.	1,258	1,599	1,464	1,549	1,732 ^b	1,502	1,602	1,567 ^{ab}	1,63 ^b	1,685 ^b	1,707 ^c	1,319
	Ss.	0,136	0,096	0,194	0,074	0,042	0,194	0,098	0,047	0,054	0,072	0,040	0,048
Negatif Kontrol	Ort.	1,321	1,626	1,442	1,505	1,558 ^a	1,377	1,355	1,556 ^a	1,314 ^a	1,522 ^a	1,276 ^a	1,319
	Ss.	0,016	0,053	0,153	0,156	0,038	0,112	0,154	0,032	0,119	0,016	0,053	0,011
p (sig.)		0,278	0,885	0,106	0,925	0,023	0,316	0,117	0,074	0,082	0,04	0,001	0,151

Absorbans değerleri ortalama (Ort.) ve standart sapma (Ss.) olarak Çizelge 4.3’de verilmiştir. On iki farklı konsantrasyon da üç test grubunun (pozitif kontrol, VEGF₁₆₅ ve negatif kontrol) absorbans değerlerinin ortalamaları arasında anlamlı farklılık olup olmadığı faktöriyel deney tasarım modeli ile varyans analizi (ANOVA) yapılarak belirlenmiştir. Faktöriyel deneme planımızda 3x12=36 adet deney numunesinin her birinden 3 tekrar bulunmaktadır. Faktörlerin ana etkileri ve etkileşimleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Grup faktörü için $p<0,001$, konsantrasyon faktörü için $p<0,001$ ve grup*konsantrasyon etkileşimi için $p<0,006$ olarak elde edilmiştir. Bu yüzden tüm gruplar için her konsantrasyonda ANOVA analizi ile ortalamalar arasında anlamlı farklılık incelenmiştir. Varyans analizinden önce deney numunelerinin absorbans değerine göre normalliği ve varyans homojenliği sırasıyla Shapiro–Wilk ve Levene testleri ile incelenmiştir. Duncan ve Tamhane testi gruplar arasında anlamlı bir farkın bulunduğu konsantrasyonları karşılaştırmak amacıyla kullanılmıştır. p (Sig.) $<0,05$ olduğu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır. Üç test grubunun ilgili konsantrasyondaki ortalamalarının birbirinden farkı a,b,c harfleri ile gösterilmiştir. Aynı harfler fark olmadığını, farklı harfler fark olduğunu ifade etmektedir. Tabloda $p>0,05$ olan bazı konsantrasyonlarda Duncan testi ortalamalar arasındaki farkı test edebilmiştir.



Şekil 4.14. VEGF₁₆₅'nin hücre canlılığına olan etkisi

Tablodaki absorbans değerleri kullanılarak EC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). EC₅₀ değeri etken maddenin en yüksek aktivite gösterdiği konsantrasyon değerinin yarısı olarak tanımlanır. Dolayısıyla bu değer küçük olması etken maddenin daha aktif olduğunu göstermektedir. Tablo 4.4'e bakıldığında üretilen VEGF₁₆₅'nin 2. ve 6. günlerdeki EC₅₀ değerlerinin daha düşük olması bu proteinin ticari VEGF₁₆₅'e göre daha yüksek biyoaktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. 6. günde aktivitenin 2. güne oranla daha yüksek olması kültür ortamındaki kültür şartlarının (pH, iyonik denge gibi) hücrelerin büyümesi için 6 gün boyunca daha uygun hale geldiğini göstermektedir.



Şekil 4.15. VEGF₁₆₅'nin 2. ve 6. günlerde hücre canlılığına olan etkisi

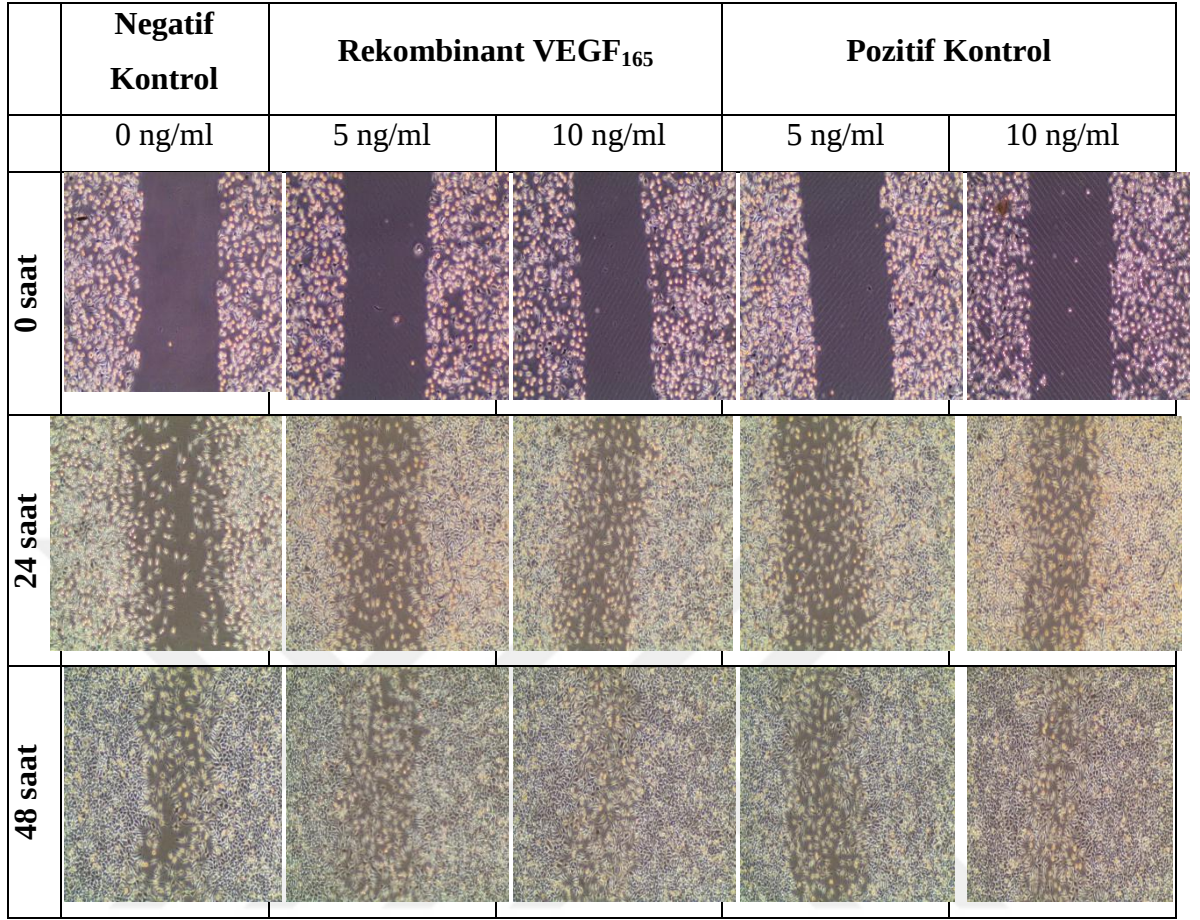
Çizelge 4.4. MTT analizi ile elde edilen EC₅₀ değerleri

Zaman	EC ₅₀	
	Pozitif kontrol (ng/ml)	VEGF ₁₆₅ (ng/ml)
2. gün	3.07	3.06
6. gün	3.23	3.18

Rekombinant VEGF₁₆₅'nin en iyi EC₅₀ değeri farklı sistemlerde rekombinant olarak üretilen VEGF₁₆₅'lere göre daha yüksek olduğu dolayısıyla biyoaktivitesinin literatürdeki değerler ile yakın ya da daha yüksek olduğunu göstermektedir. Seong-Baek ve arkadaşlarının (2008) memeli hücrelerinde ürettikleri VEGF₁₆₅'nin HUVEC hücreleri ile 48 saatlik inkübasyon sonrasında elde ettikleri EC₅₀ değeri 3.8 ng/ml'dir. Bang ve arkadaşlarının (2013) *E.coli*'de ürettikleri VEGF₁₆₅'nin HUVEC hücreleri ile 48 saatlik inkübasyon sonrasında elde ettikleri EC₅₀ değeri yaklaşık 3.0 ng/ml olduğu belirtilmiştir.

4.12. Yara İyileşmesinin Değerlendirilmesi

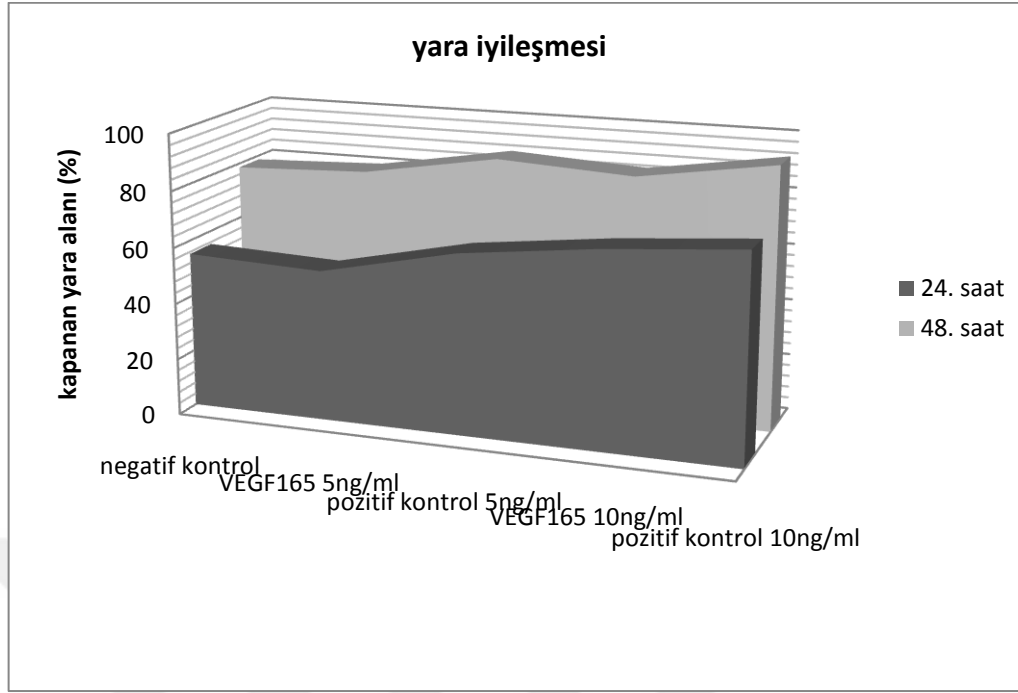
0., 24. ve 48. saatlerde mikroskop görüntüleri kaydedilen kültür kaplarının inverted mikroskop programı kullanılarak yara modelinin yüzey alanındaki boş alanların μm^2 cinsinden değerleri hesaplanmıştır. 24. ve 48. saatlerdeki boş alanların 0. saatte oluşturulan yara modelinin toplam alanına olan oranı % yüzey alanı olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4.16. Yara iyileşmesi mikroskop görüntüleri

Çizelge 4.5. Yara bölgesi kaplama yüzdeleri

		kaplanan yara alanı (%)		
		0. saat	24. saat	48. saat
Negatif kontrol		%0	%55	%78
VEGF ₁₆₅	5 ng/ml	%0	%54	%81
Pozitif kontrol		%0	%63	%88
VEGF ₁₆₅	10 ng/ml	%0	%70	%86
Pozitif kontrol		%0	%73	%93



Şekil 4.17. Yara iyileşmesi alan grafiği

Şekil 4.16 ve 4.17’de görüldüğü üzere rekombinant VEGF₁₆₅ ‘nin 24. ve 48. saatte yara alanını iyileştirme performansı negatif kontrole göre daha yüksek iken pozitif kontrole göre daha düşüktür. Bu sonuca hücrelerin yara alanının zamanla ensotel hücreleri tarafından kaplanan alanın hesaplanması ile ulaşılmıştır. VEGF₁₆₅ 10 ng/ml konsantrasyonda yara alanının yaklaşık %86’sını 48 saatte kaplayarak yara iyileşmesine olumlu etkisini göstermektedir. 24. ve 48. saatte kapanan yara alanı değerleri karşılaştırıldığında artan VEGF konsantrasyonu ile yara iyileşmesi oranında da artış olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

K. lactis, heterolog rekombinant protein üretiminde kolay genetik manipulasyona imkan vermesi, integratif ve epizomal ekspresyon vektörlerin kullanımına uygun olması ve tam genom sekansına ulaşılabilir olması gibi nedenlerden dolayı diğer maya ekspresyon sistemlerine göre birçok avantajlara sahiptir (Dujon ve ark., 2004). Özellikle gıda endüstrisinde kullanılan birçok enzimin *K. lactis*'te başarılı bir şekilde üretilmesi bu alanda yapılan çalışmaları farmasötik endüstride kullanılan teröpatik proteinlerin (interlökin 1- β , interferon α -A, β -laktoglobülin, serum albumin gibi) üretimine yönlendirmiştir (Ooyen ve ark., 2006).

Gerçekleştirilen bu doktora tez çalışmasında önemli bir büyüme faktörü olan VEGF₁₆₅'nin *K. lactis* maya ekspresyon sisteminde rekombinant olarak üretimi başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Proje üç temel amacı kapsamaktadır. Bu amaçlardan ilki VEGF₁₆₅ geninin *K. lactis* pKLAC2 vektörüne klonlanmasıdır. Bu amaç ekspresyon çalışmalarına devam edilebilmesi için önemli bir basamaktır. pKLAC2 birçok avantaja sahip bir ekspresyon vektörüdür. İçerdiği asetamidaz geninden dolayı transforme hücrelerin seçilimine imkan sağlamaktadır. Dolayısıyla bu sistemde ekspresyon sonrasında büyüme ortamından uzaklaştırılması gerekebilecek yüksek maliyetli antibiyotik kullanımına gerek kalmamaktadır. Azot kaynağı bulunmayan asetamid içeren besi ortamında asetamidaz enziminin asetamidi azot kaynağı olarak metabolize etmesi ancak genomunda pKLAC2 vektör DNA'sı taşıyan hücreler tarafından gerçekleştirilebilir. pKLAC2 integratif bir vektör olup, elektroporasyon yöntemi ile *K. lactis* genomuna kolayca entegre olabilen LAC4 lokusuna ait diziler içermektedir. Ayrıca hücre içerisinde çok fazla kopya olarak bulunmasa da entegre olduğu suşların genetik stabilitesini arttırmaktadır. (van den Berg ve ark., 1990). Elektroporasyon sonucunda seçici besi yerinde oluşan kolonilerin genomik DNA'lara ait PCR ve DNA dizi analizi sonuçları pKLAC2 vektörüne klonlanmış hedef genin *K. lactis* genomuna başarılı bir şekilde entegre olduğunu göstermektedir.

Projenin diğ er önemli basamağı transforme *K. lactis* hücrelerinde hedef proteinin sekresyonu, ekspresyonu ve ardından saf bir şekilde elde edilmesidir. pKLAC2 vektör sistemi g   l  ve ind kylenebilir *K. lactis* LAC4 promotoruna (P_{LAC4}) sahiptir. Bu promotor i erdiğı LAC4 geni ile laktoz ya da galaktozun karbon kaynağı olarak kullanılmasını sağlayan laktoz-galaktoz mekanizmasında etkili laktaz (β -galaktosidaz) enziminin ekspresyonunu sağlamaktadır (Colussi ve Taron, 2005). pKLAC2 vektöründe *K. lactis*'e ait α -MF sekresyon sinyal dizisi hedef proteinin sekresyonunu sağlamaktadır. Sekresyon avantajı, bakteriyel hücrelere göre daha g   l  hücre parçalama yöntemleri gerektiren maya hücrelerini parçalamaya gerek kalmaksızın besiyerinden protein sağlaştırmaya olanak sağlamaktadır. Besi ortamında seyreltik VEGF₁₆₅'nin amonyum sülfat ile çöktürülmesi ile kısmi sağlaştırmaları yapılmıştır. Devamında, 10 adet Histidin amino asiti taşıyan hedef protein afinite kromatografisi ile sağlaştırmaları. Sağlaştırmaları protein SDS-PAGE sonrasında jel Coomassie Brilliant Blue ve g m  ş nitrat ile boyanarak kalitatif olarak analiz edilmiştir. VEGF₁₆₅ geninin genomuna entegre olduğu *K. lactis* GG799 hücreleri ile transforme olmamış yabani tip (wild-type) hücrelerin hücre dışına salgıladığı proteinler SDS-PAGE jel görüntüsüne bakılarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak az miktar safsızlık içeren rekombinant proteinin eksprese edildiğı görülmüştür.

Monomer VEGF₁₆₅ yaklaşık 20 kDa büyüklüğünde iken aktif homodimer formu 40 kDa büyüklüğündedir. SDS-PAGE jel görüntüsüne bakıldığında sağlaştırmaları VEGF₁₆₅'nin 20 kDa'dan daha büyük olduğu görülmektedir. Seong-Baek ve arkadaşları (2008) tarafından CHO memeli hücrelerinde üretilen rekombinant VEGF₁₆₅'nin büyüklüğünün yine aynı şekilde 20 kDa'dan büyük olduğu görülmektedir. *E.coli*'de farklı çalışmalarda rekombinant olarak üretilen VEGF₁₆₅ proteinlerin büyüklüklerinin monomer 20 kDa, homodimer 40 kDa büyüklüklerinde olduğu belirtilmiştir (Pizarro ve ark., 2010; Kang ve ark., 2013; Salimi ve Babashamsi, 2016). Bu durumun farklı organizmalarda farklı glikolizasyon mekanizmalarının geli mi  olduğundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Glikolizasyon proteinlerin yapı, stabilite ve fonksiyonlarını etkileyen önemli bir posttranslasyonel modifikasyondur. Maya, böcek ya da memeli gibi ökaryotik sistemlerde geli mi  posttranslasyonel modifikasyon sistemi bulunmasına karşılık bakteriyel sistemlerin çoğunda ise bu mekanizmanın olmaması ya da oldukça sınırlı olması hedef proteinin büyüklüğünü etkilediğı gibi aktivitesinde de farklı karbonhidrat

yapılarından dolayı önemli etkiler göstermektedir (Croset ve ark., 2012). Bu çalışmada bir maya sisteminde üretilmiş olan VEGF₁₆₅'nin SDS-PAGE analizi sonuçlarında görüldüğü üzere, yukarıda bahsedilen ve bakteriyel sistemlerde üretilmiş olan VEGF₁₆₅'lere göre daha büyük molekül ağırlığına sahip olduğu görülmektedir.

Çalışmanın diğer amacı üretilen saf VEGF₁₆₅ proteininin karakterize edilmesidir. Bu amaçla rekombinant VEGF₁₆₅'nin endotel hücreleri üzerine mitojenik etkisi MTT analizi ile tespit edilmiştir. MTT testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendiren bir testtir. Yaşayan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri artar ve mitokondriyal enzimlerin substratı olan MTT tetrazolium tuzları kültür ortamına verildiğinde kolorometrik renk reaksiyonu meydana gelir. Tetrazolium halkası mitokondride bulunan dehidrogenaz enzimleri tarafından parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur. Parçalanma ile sarı sarı renkli MTT koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Mavi-mor kültürün 570 nm'deki absorbans değeri hücre canlılığı ile ilişkilendirilir (Merrloo J. ve ark., 2011).

Bu çalışmada Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde insan göbek kordonundan izole edilmiş olan insan umbilikal ven endotel hücreleri hücre kültürü çalışmalarından hücre hattı olarak kullanılmıştır. Hücreler DMEM besi ortamında çoğaltılmıştır. 96 gözlü kültür kabına ekilen hücrelere 11 farklı konsantrasyonda negatif kontrol (besi ortamı), pozitif kontrol (ticari VEGF₁₆₅) ve rekombinant VEGF₁₆₅ ilave edilmiştir. Bu konsantrasyonlar pozitif kontrolün önerilen konsantrasyon aralığı dikkate alınarak belirlenmiştir. 2. ve 6. günlerde gerçekleştirilen MTT testi sonucunda kültür kabının 570 nm'de absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Elde edilen bulgular istatistiksel değerlendirilmiş ve konsantrasyona karşı elde edilen absorbans değerleri anlamlı bulunmuştur (p<0.05) Absorbans değerleri kullanılarak proteinin en yüksek aktivite gösterdiği konsantrasyon değerinin yarısı olarak tanımlanan EC₅₀ değerleri elde edilmiştir. Bu değerin küçük olması proteinin daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. 2. ve 6. günlere ait EC₅₀ değerlerine göre VEGF₁₆₅, ticari VEGF₁₆₅'e göre daha yüksek biyoaktiviteye sahiptir. Ticari VEGF₁₆₅'nin bakteriyel (*E. coli*) sistemde üretilmiş olmasının aktiviteye etki edebileceği tahmin edilmektedir. 6. günde aktivitenin 2. güne oranla daha yüksek

olması kültür ortamındaki kültür şartlarının (pH, iyonik denge gibi) hücrelerin büyümesi için 6 gün boyunca daha uygun hale geldiğini göstermektedir.

Bu çalışmada rekombinant olarak üretilmiş olan VEGF₁₆₅'nin EC₅₀ değeri MTT analizi sonucu 3.06 ng/mL olarak elde edilmiştir. 2007 yılında Seong-Baek ve arkadaşları tarafından CHO (Chinese hamster ovary) hücrelerinde rekombinant olarak üretilen VEGF₁₆₅ için bu değer 3.8 ng/mL'dir. *Pichia pastoris* maya sisteminde üretilmiş olan diğer ticari VEGF₁₆₅'nin EC₅₀ değeri ise <4 ng/mL olarak belirtilmiştir (Anonim, 2016). EC₅₀ değerinin söz konusu büyüme faktörünün en etkin olduğu konsantrasyon değerinin yarısını ifade ettiği düşünüldüğünde bu değer biyoaktivite ile ters orantılı olarak değişim göstermesi beklenilmektedir. Bu durumda çalışmadan elde edilen VEGF₁₆₅'nin EC₅₀ ve etkin olduğu konsantrasyon değerlerine göre aktivitesi değerlendirildiğinde bakteriyel sistemlere ile çok yakın olduğu bazı ticari VEGF₁₆₅ 'lere göre ise daha yüksek aktiviteye sahip olduğu söylenebilir

Kang ve arkadaşlarının (2013), pBAD-HisA-VEGF₁₆₅ rekombinant vektörünü *E.coli* TOP10 hücrelerinde rekombinant olarak ürettikleri VEGF₁₆₅'nin CPAE (calf pulmonary artery endothelial) hücrelerinde en yüksek aktivite gösterdiği konsantrasyon değeri 25 ng/mL olarak belirtilmiştir. Ticari olarak tedarik edilen ve *E. coli*'de üretilmiş olarak rekombinant VEGF₁₆₅'nin ise önerilen konsantrasyon aralığı 1-8 ng/ mL'dir. Bu çalışmada üretilen VEGF₁₆₅'nin farklı konsantrasyon değerlerinin hücre canlılığına olan etkisi incelendiğinde, 2.5 ng/mL konsantrasyonda en yüksek proliferatif etki gösterdiği, bu ve bundan daha küçük konsantrasyon değerlerinde ticari VEGF₁₆₅'e göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

VEGF anjiyogenez ve hücre sağkalım yollarında önemli rol oynamaktadır. Sağlıklı erişkinlerde rolü esas olarak yara iyileşmesi ve menstrual döngü sırasındaki anjiyogenez ile sınırlıdır. Embriyogenez sırasında da önemli bir rol oynamaktadır. VEGF, özellikle kanser gibi insan patolojilerinde önemlidir. Tümörler, özellikle hipoksiye yanıt olarak yeni damar oluşumunu uyarmak için VEGF salgılamaktadır. Yeni yapılanan damarlar tümöre oksijen ve besin sağlarken aynı zamanda tümör hücrelerinin metastazı kolaylaştıran dolaşıma erişmelerine izin vermektedir. Anjiyogenezin uyarılmasına

ilaveten, VEGF'nin, tümör hücreleri için bir hayatta kalma faktörü olarak otokrin yollar ile hipoksi, kemoterapi ve radyoterapi gibi streslerden korucu etkiye sahip olduğu görülmektedir. Özellikle anjiyogenez ve VEGF, anti-kanser stratejileri için çekici hedeflerdir ve VEGF'nin inhibisyonunun hem anjiyogenezi bloke ettiği hem de kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğini geliştirdiği gösterilmektedir (Byrne ve ark., 2005). Sonuç olarak VEGF anjiyogenez, yara iyileşmesi, embriyogenez, kanser gelişimi gibi önemli fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynamaktadır.

Bu çalışmada elde edilen bulgular rekombinant VEGF₁₆₅ ile daha ileri çalışmalar yapılabileceğini desteklemektedir. VEGF'nin kanser yolaklarına olan etkisi, farklı hücre tiplerine olan mitojenik etkilerinin araştırılması, anti-kanser stratejilerinin belirlenmesi ve araştırılması gereken birçok fonksiyonlarının aydınlatılması için rekombinant VEGF'lerin yapılacak olan çalışmalara önemli bir kaynak olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen proteinin biyoreaktörde üretimi gerçekleştirilerek, teröpatik amaçlı kullanımı için daha ileri saflaştırma teknikleri uygulanabilir. Farklı endotel hücre hatları üzerinde mitojenik etkileri araştırılabilir. Protein mühendisliği teknikleri kullanılarak rekombinant VEGF₁₆₅'nin stabilitesini ve aktivitesini arttıran daha ileri çalışmalar gerçekleştirilebilir. Ayrıca *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda *in vivo* denemeler ile çalışmalara devam edilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Aiello, L.P., Pierce, E.A., Foley, E.D., Takagi, H., Chen, H., Riddle, L., Ferrara, N., King, G.L., Smith, L.E., 1995. Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (23), 10457–61.
- Akagi, M., Kawaguchi, M., Liu, W., McCarty, M.F., Takeda, A., Fan, F., Stoeltzing, O., Parikh, A.A., Jung, Y.D., Bucana, C.D., Mansfield, P.F., Hicklin, D.J., Ellis, L.M., 2003. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br. J. Cancer*, 88 (5), 796–802.
- Almeida, C., Gomes, D., Faro, C., Simoes, I., 2015. Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99 (1), 269–281.
- Amano, K., Chiba Y., 2008. Engineering of mucin-type human glycoproteins in yeast cells. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 105 (9), 3232-3237.
- Anonim, 2017. Recombinant human VEGF165. <http://www.evercyte.com/vegf165-20-g.html>. (19.06.2017).
- Bang, S.K., Kim, Y.S., Chang, B.S., Park, C.B., Bang, I.S., 2013. Production and On-column Re-folding of Human Vascular Endothelial Growth Factor 165 in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18 (5), 835-842.
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., Marme, D., 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, 87 (8), 3336–43.
- Barr, M.P., Byrne, A.M., Duffy, A.M., Condrón, C.M., Devocelle, M., Harriott, P., Bouchier-Hayes, D.J., Harmey, J.H., 2005. A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF (165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br. J. Cancer*, 92 (2), 328–33.
- Bharadwaj, P., Martins, R., Macreadie, I., 2010. Yeast as a model for studying Alzheimer's disease. *FEMS Yeast Res.*, 10 (8), 961–969.
- Blanquet, S., Marol-Bonnin, S., 2001. The 'biodrug' concept: an innovative approach to therapy. *Trends Biotechnol.*, 19 (10), 393-400.
- Borrero, J., Kunze, G., Jiménez, J., Böer, E., Gútiez, L., Herranz C., Cintas, L., Hernández, P., 2012. Cloning production, and functional expression of the bacteriocin, enterocin A, produced by *Enterococcus faecium* T136, by the yeasts *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, and *Arxula adeninivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (16), 5956–5961.
- Brusselmans, K., Bono, F., Collen, D., Herbert, J.M., Carmeliet, P., Dewerchin, M., 2005. A novel role for vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for embryonic stem cells during hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 280 (5), 3493–9.
- Byrne, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Harmey, J.H., 2005. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J. Cell. Mol. Med.*, 9 (4), 777-794.

- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oostuyse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., De Ruiter, M.C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.M., Collen, D., Dejana, E., 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis, *Cell*, 98 (2), 147–57.
- Chigira, Y., Oka, T., 2008. Engineering of a mammalian O-glycosylation pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: production of O-fucosylated epidermal growth factor domains. *Glycobiology*, 18 (4), 303-314.
- Choi, B. K., Bobrowicz P., 2003. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100.(9), 5022-5027.
- Cregg, J. M., Vedvick T. S., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Nat. Biotech.*, 11 (8), 905-910.
- Simões, I., 2014. Establishing the yeast *Kluyveromyces lactis* as an expression host for production of the saposin-like domain of the aspartic protease cirsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 (1), 86–96.
- Colussi P.A., Taron C.H., 2005. *Kluyveromyces lactis* LAC4 Promoter Variants That Lack Function in Bacteria but Retain Full Function in *K. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11): 7092–7098.
- Colombo, L., Rosa, J., Bragança C., Ignacchiti, R., Alvim, M., Silveira, W., Queiroz, M., De Bazzoli, D., Passos, F., 2014. Construction of a *Kluyveromyces lactis* ku80–host strain for recombinant protein production: extracellular secretion of pectin lyase and a Streptavidin–Pectin lyase chimera. *Mol. Biotechnol.*, 56 (4), 319–328.
- Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., Colgan, S.P., 2002. Hypoxia-inducible factor-1- dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.*, 62 (12), 3387–3394.
- Cordes, P., Sun, W., Wolber, R., Kolbe, L., Klebe, G., Röhm, K., 2013. Expression in non-melanogenic systems and purification of soluble variants of human tyrosinase. *Biol. Chem.*, 394 (5), 685–693.
- Croset A., Delafosse L., Gaudry J.P., Arod C., Glez L., Losberger C., Bergue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., Chevalet L., Antonsson B., 2012. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J. Biotechnol.*, 161 (3), 336-348.
- Cross, M.J., Johan, D., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., 2003. VEGF-receptor signal transduction. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 28 (9), 488-494.
- Curto, P., Lufrano, D., Pinto, C., Custódio, V., Gomes, A., Trejo, S., Bakás, L., Vairo-Cavalli, S., Faro, Simões, I., 2014. Establishing the yeast *Kluyveromyces lactis* as an expression host for production of the saposin-like domain of the aspartic protease cirsin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 (1), 86–96.
- Çelik, E. and Çalık P., 2011. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol. Adv.*, 30 (5), 1108-1118.
- Demain, A. L. and Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.*, 27 (3), 297-306.

- Domingues, L., Guimaraes, P., Oliveira, C., 2010. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation. *Bioeng. Bugs.*, 1 (3), 164–171.
- De Pourcq, K., De Schutter K., 2010. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87 (5), 1617–1631.
- Dortay, H., Akula, U., Westphal, C., Sittig, M., Mueller-Roeber, B., 2011. High-throughput protein expression using a combination of ligation-independent cloning (LIC) and infrared fluorescent protein (IFP) detection. *PLoS One*, 6 (4), e18900.
- Dujon B., Sherman D., Fisher G., 2004. Genome evolution in yeast. *Nature*, 430, 35–44.
- Dvorak, H.F., Detmar, M., Claffey, K.P., Nagy, J.A., Van de Water, L., Senger, D.R., 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 107 (1-3), 233–235.
- Ercan, D., Demirci, A., 2015. Enhanced human lysozyme production by *Kluyveromyces lactis* K7 in biofilm reactor coupled with online recovery system. *Biochem. Eng. J.*, 98, 68–74.
- Etherington, P.J., Winlove, P., Taylor, P., Paleolog Miotla, J.M., 2002. VEGF release is associated with reduced oxygen tensions in experimental inflammatory arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 20 (6), 799–805.
- Fan, F., Wey, J.S., McCarty, M.F., Belcheva, A., Liu, W., Bauer, T.W., Somcio, R.J., Wu, Y., Hooper, A., Hicklin, D.J., Ellis, L.M., 2005. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 24 (16), 2647–2653.
- Feng, Y., Zhang, B., Zhang, Y., Hiroshi, F., 1997. Secretory expression of porcine insulin precursor in *Kluyveromyces lactis* and its conversion into human insulin. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.*, 29 (2), 129–134.
- Ferrara, N. Ve Henzel W.J., 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Res. Com.*, 161 (2), 851–858.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., Moore, M.W., 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380 (6573), 439–442.
- Ferrer-Mirallès, N., Domingo-Espín, J., 2009. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb Cell Fact.*, 8 (17), 1–8.
- Fleer, R., Chen, X., Amellal, N., Yeh, P., Fournier, A., Guinet, F., Gault, N., Faucher, D., Folliard, F., Hiroshi, F., Mayaux, J., 1991. High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 in *Kluyveromyces lactis*. *Gene*, 107 (2), 285–295.
- Freedonia Group., 2009. World enzymes to 2013. The Freedonia Group, Inc.
- Freigassner, M., Pichler H., 2009. Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microb. Cell Fact.*, 8 (1), 69.
- Fuzi, S., Razali, F., Jahim, J., Rahman, R., Illias, R., 2014. Simplified feeding strategies for the fed-batch cultivation of *Kluyveromyces lactis* GG799 for enhanced recombinant xylanase production. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 37 (9), 1887–1898.

- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., Ferrara, N., 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.*, 273 (46), 30336–30343.
- Giaever, G., Chu A. M., 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418 (6896), 387–391.
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T.F., Pelletier, N., Ferrara, N., 2001. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J. Biol. Chem.*, 276 (5), 3222–3230.
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y., Neufeld, G., 2000. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J. Biol. Chem.*, 275 (24), 18040–18045.
- González Siso, M., Cerdán, M., 2012. *Kluyveromyces lactis*: a suitable yeast model to study cellular defense mechanisms against hypoxia-induced oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2012, 634–674.
- Gorski, D.H., Beckett, M.A., Jaskowiak, N.T., Calvin, D.P., Mauceri, H.J., Salloum, R.M., Seetharam, S., Koons, A., Hari, D.M., Kufe, D.W., Weichselbaum, R.R., 1999. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res.*, 59 (14), 3374–3378.
- Grauslund, S., Nordlund, P., 2008. Protein production and purification. *Nat. Methods*, 5 (2), 135–146.
- Gray, M.J., Wey, J.S., Belcheva, A., McCarty, M.F., Trevino, J.G., Evans, D.B., Ellis, L.M., Gallick, G.E., 2005. Neuropilin-1 suppresses tumorigenic properties in a human pancreatic adenocarcinoma cell line lacking neuropilin-1 coreceptors. *Cancer Res.*, 65 (9), 3664–3670.
- Güzel D., 2015. Damar Oluşum Fizyolojisi ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü, *J. Human Rhythm*, 1 (2), 42–45.
- Hamilton, S. R., Davidson, R. C., 2006. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313 (5792), 1441–1443.
- Hanahan, D., Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86 (3), 353–364.
- Harmey, J.H., Bouchier-Hayes, D., 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays*, 24 (3), 280–283.
- Harrison, L., Blackwell, K., 2004. Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy? *Oncologist*, 9 (5), 31–40.
- Herzog, Y., Kalcheim, C., Kahane, N., Reshef, R., Neufeld, G., 2001. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin2 in arteries and veins. *Mech. Dev.*, 109 (1) 115–119.
- Heyland, J., J. Fu, 2010. Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.*, 107 (2), 357–368.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., De Bruijn, E.A., 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.*, 56 (4), 549–80.

- Hou, J., Tyo, K., Liu, Z., Petranovic, D., Nielsen, J., 2012. Engineering of Vesicle Trafficking Improves Heterologous Protein Secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, 14 (2), 120-127.
- Hua, Z., Liang, X., Zhu, D., 1994. Expression and purification of a truncated macrophage colony stimulating factor in *Kluyveromyces lactis*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34 (2), 419-427.
- Ikeda, M., Hosoda, Y., Hirose, S., Okada, Y., Ikeda, E., 2000. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR, and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis. *J. Pathol.*, 191 (4), 426-433.
- Ishida, A., Murray, J., Saito, Y., Kanthou, C., Benzakour, O., Shibuya, M., Wijelath, E.S., 2001. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.*, 188 (3), 359-368.
- Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 307 (5706), 58-62.
- Jacobs, P. P., Geysens S., 2008. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology. *Nat. Protoc.*, 4 (1), 58-70.
- Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R.K., Alitalo, K., 1997. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 276 (5317), 1423-1425.
- Kabbinavar, F.F., Hambleton, J., Mass, R.D., Hurwitz, H.I., Bergsland, E., Sarkar, S., 2005. Combined analysis of efficacy: The addition of bevacizumab to fluorouracil/ leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23 (16), 3706-3712.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., Van Hinsbergh, V.W., Fang, G.H., Dumont, D., Breitman, M., Alitalo, K., 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92 (8), 3566-3570.
- Kang, W., Kim, S., Lee, S., Jeon, E., Lee, Y., Yun, Y.R., Suh, C.K., Kim, H.W., Jang, J.H., 2013. Characterization and optimization of vascular endothelial growth factor 165 (rhVEGF₁₆₅) expression in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 87 (2), 55-60.
- Kawakami, A., Kitsukawa, T., Takagi, S., Fujisawa, H., 1996. Developmentally regulated expression of a cell surface protein, neuropilin, in the mouse nervous system. *J. Neurobiol.*, 29 (1), 1-17.
- Kendall, R.L., Wang, G., Thomas, K.A., 1996. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226 (2), 324-328.
- Kerbel, R.S., Kamen, B.A., 2005. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4 (6), 423-436.
- Koivistoinen, O., Kuivanen, J., Barth, D., Turkia, H., Pitkänen, J., Penttilä, M., Richard, P., 2013. Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Microb. Cell Fact.*, 12, 82.
- Krause, S., Forster, Y., Kraemer, K., Fuessel, S., Kotzsch, M., Schmidt, U., Wirth, M.P., Meye, A., Schwenzer, B., 2005. Vascular endothelial growth factor antisense pretreatment of bladder cancer cells significantly enhances the

- cytotoxicity of mitomycin C, gemcitabine and cisplatin. *J. Urol.*, 174 (1), 328–31.
- Krijger, J., Baumann, J., Wagner, M., Schulze, K., Reinsch, C., Klose, T., Onuma, O., Simon, C., Behrens, S., Breunig, K., 2012. A novel, lactase-based selection and strain improvement strategy for recombinant protein expression in *Kluyveromyces lactis*. *Microb. Cell Fact.*, 11, 112.
- Kroll, J., Waltenberger, J., 1997. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 272 (51), 32521–32527.
- Lee, C.G., Heijn, M., di Tomaso, E., Griffon-Etienne, G., Ancukiewicz, M., Koike, C., Park, K.R., Ferrara, N., Jain, R.K., Suit, H.D., Boucher, Y., 2005. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res.*, 60 (19), 5565–5570.
- Langer, E. S., 2012. Biomanufacturing outsourcing outlook. *BioPharm International*, 25 (2), 15-16.
- Lantuejoul, S., Constantin, B., Drabkin, H., Brambilla, C., Roche, J., Brambilla, E., 2003. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J. Pathol.*, 200 (3), 336–47.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., Ferrara, N., 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246 (4935), 1306-1309.
- Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H., Levy, A.P., 1998. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.*, 273 (11), 6417–6423.
- Lim, H.S., Blann, A.D., Chong, A.Y., Freestone, B., Lip, G.Y.H., 2004. Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 in diabetes: implications for cardiovascular risk and effects of multifactorial intervention. *Diabetes Care*, 27 (12), 2918–24.
- Jiménez, J., Borrero, J., Diep, D., Gútiérrez, L., Nes, I., Herranz, C., Cintas, L., Hernández, P., 2013. Cloning production, and functional expression of the bacteriocin sakacin A (SakA) and two SakA-derived chimeras in lactic acid bacteria (LAB) and the yeasts *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40 (9), 977–993.
- Jo, H., Noh, J., Kong, K., 2013. Efficient secretory expression of the sweet-tasting protein brazzein in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expr. Purif.*, 90 (2), 84–89.
- Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., 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. *EMBO J.*, 15 (2), 290-298.
- Maedler, K., Dharmadhikari, G., Schumann, D., Størling, J., 2009. Interleukin-1 beta targeted therapy for type 2 diabetes. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 9 (9), 1177–1188.
- Madhavan, A., Sukumaran, R., 2014. Promoter and signal sequence from filamentous fungus can drive recombinant protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Bioresour. Technol.*, 165, 302–308.

- Magalhaes, K., de Melo Pereira, G., Campos, C., Dragone, G., Schwan, R., 2011. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Braz. J. Microbiol.*, 42 (2), 693–702.
- Makinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E.C., Wise, L., Mercer, A., Kowalski, H., Kerjaschki, D., Stacker, S.A., Achen, M.G., Alitalo, K., 2001. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals *via* the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J.*, 20, 4762–4773.
- Martínez, J.L., Liu L., 2012. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 23 (6), 965–71.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., 2012. Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol. Biol.*, 824, 329–358.
- Merrloo J., Kaspers G.J., Cloos J., 2011. Cell sensitivity assays The MTT assay. *Methods Mol. Bio.*, 731, 237–245.
- Meister, B., Grunebach, F., Bautz, F., Brugger, W., Fink, F.M., Kanz, L., Mohle, R., 1999. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma. *Eur. J. Cancer.*, 35 (3), 445–449.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H.J., Dehio, C.A., 1999. 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. *EMBO J.*, 18 (2), 363–374.
- Morka, K., Pietruszka, J., Meyer Zu Berstenhorst, S., 2014. Comparative expression of lipase CAL-A in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Hansenula polymorpha* to investigate a possible host influence. *J. Biotechnol.*, 191, 176–186.
- Musch, E., Malek, M., Eick, H., Chrissafidou, A., 2004. Successful application of highly purified natural interferon alpha (multiferon) in a chronic hepatitis C patient resistant to preceding treatment approaches. *Hepatogastroenterol.*, 51 (59), 1476–1479.
- Naumov, G., Naumova, E., Basrrio, E., Querol, A., 2006. Genetic and molecular study of inability of the yeast *Kluyveromyces lactis* var *drosophilae* to ferment lactose. *Mikrobiologiya*, 75 (3), 299–304.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, 13 (1), 9–22.
- Nguyen, M.T., Krupa, M., Koo, B.K., Song, J.A., Vu, T., Do, B.H., Nguyen, A.N., Seo, T., Yoo, J., Jeong, B., Jin, J., Lee, K.J., Oh, H.B., Choe, H., 2016. Prokaryotic Soluble Overexpression and Purification of Human VEGF165 by Fusion to a Maltose Binding Protein Tag. *PLOS ONE.*, 11(5), e0156296.
- Nonklang, S., Abdel-Banat Babiker, M.A., Cha-aim, K., Moonjai, N., Hoshida, H., Limtong, S., Yamada, M., Akada, R., 2008. High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 (24), 7514–7521.
- Nyberg, P., Xie, L., Kalluri, R., 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.*, 65 (10), 3967–3979.

- Omara, W.A.M., Rash B.M., 2010. Conditional cell-wall mutants of *Saccharomyces cerevisiae* as delivery vehicles for therapeutic agents *in vivo* to the GI tract. *J. Biotechnol.*, 147 (2), 136-143.
- Ooyen, A., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn Jacobs, D.I., Calussi, P.A., Taron, C.H., 2006. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.*, 6 (3), 381-392.
- Otani, N., Minami, S., Yamoto, M., Shikone, T., Otani, H., Nishiyama, R., Otani, T., Nakano, R., 1999. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.*, 84 (10), 3845–3851.
- Parikh, A.A., Liu, W.B., Fan, F., Stoeltzing, O., Reinmuth, N., Bruns, C.J., Bucana, C.D., Evans, D.B., Ellis, L.M., 2003. Expression and regulation of the novel vascular endothelial factor receptor neuropilin-1 by epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma. *Cancer*, 98 (4), 720–729.
- Parikh, A.A., Fan, F., Liu, W.B., Ahmad, S.A., Stoeltzing, O., Reinmuth, N., Bielenberg, D., Bucana, C.D., Klagsbrun, M., Ellis, L.M., 2004. Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am J Pathol.*, 164 (6), 2139–2151.
- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., Ferrara, N., 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, *in vitro* and *in vivo*, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.*, 269 (41), 25646–25654.
- Petranovic, D., Tyo K., 2010. Prospects of yeast systems biology for human health, integrating lipid, protein and energy metabolism. *FEMS Yeast Res.*, 10 (8), 1046-1059.
- Pizarro, S.A., Gunson, J., Field, M.J., Dinges, R., Khoo, S., Dalal, M., Lee, M., Kaleas, K.A., Moiseff, K., Garnick, S., Reilly, D.E., Laird Schmelzer, C.H., 2010. High-yield expression of human vascular endothelial growth factor VEGF₁₆₅ in *Escherichia coli* and purification for therapeutic applications. *Protein Expression and Purification*, 72 (2), 184-193.
- Porro, D., Sauer M., 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Mol. Biotechnol.*, 31 (3), 245-259.
- Porro, D., Gasser B., 2011. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 89 (4), 939-948.
- Price, D.J., Miralem, T., Jiang, S., Steinberg, R., Avraham, H., 2001. Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ.*, 12 (3), 129–35.
- Raimondi, S., Uccelletti, D., Amaretti, A., Leonardi, A., Palleschi, C., Rossi, M., 2010. Secretion of *Kluyveromyces lactis* Cu/Zn SOD: strategies for enhanced production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86 (3), 871–878.
- Raimondi, C., Ruhrberg, C., 2013. Neuropilin signalling in vessels, neurons and tumours. *Seminars in Cell&Developmental Biology*, 24, 172–178.
- Redwan, E., 2007. Cumulative updating of approved biopharmaceuticals. *Hum. antibodies*, 16 (3), 137-158.
- Robin, S., Petrov, K., Dintinger, T., Kujumdzieva, A., Tellier, C., Dion, M., 2003. Comparison of three microbial hosts for the expression of an active catalytic scFv. *Mol. Immunol.*, 39 (12), 729–738.

- Robinson, R. (Ed.), 2014. Encyclopedia of food microbiology, 2. Auflage ed. Acad. Press San Diego.
- Rocha, S., Abrahão-Neto, J., Cerdán, M., Gombert, A., González-Siso, M., Gombert, A., 2010. Heterologous expression of a glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. Microb. Cell Fact., 9, 4.
- Rocha, S., Abrahão-Neto, J., Cerdán, M., Gombert, A., González-Siso, M., 2011. Heterologous expression of a thermophilic esterase in *Kluyveromyces* yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol., 89 (2), 375–385.
- Rosa, J., Colombo, L., Alvim, M., Avonce, N., van Dijck, P., Passos, F., 2013. Metabolic engineering of *Kluyveromyces lactis* for l-ascorbic acid (vitaminC) biosynthesis. Microb. Cell Fact., 12, 59.
- Roskoski Jr., R., 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 62 (3), 179–213.
- Royds, J.A., Dower, S.K., Qwarnstrom, E.E., Lewis, C.E., 1998. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NF κ B. Mol. Pathol., 51(2), 55–61.
- Salimi, A., Babashamsi, M., 2016. Cloning and Optimization of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor 165 Expression in *Escherichia coli*. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 8 (1), 23-28.
- Saliola, M., Mazzoni, C., Solimando, N., Crisa, A., Falcone, C., Jung, G., Fleer, R., 1999. Use of the KlADH4 promoter for ethanol-dependent production of recombinant human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 65 (1), 53–60.
- Schröder, M., 2008. Endoplasmic reticulum stress responses. Cell Mol. Life Sci., 65 (6): 862- 894.
- Seong-Baek, L., Park, J.S., Lee, S., Park, J., Yu, S., Kim, H., Kim, D., Byun, T.H., Baek, K., Ahn, Y.J., Yoon, J., 2008. Overproduction of Recombinant Human VEGF (Vascular Endothelial Growth Fcator) in Chinese Hamster Ovary Cells. J. Microbiol. Biotechnol., 8 (1), 183-187.
- Shannon, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Condrón, C.M., Toomey, D., 2003, Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. Cancer Treat Rev., 29 (4), 297–307.
- Sherbet, G.V., 2011. Growth Factors and Their Receptors in Cell Differentiation, Cancer and Cancer Therapy, XVII.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., Sato, M., 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. Oncogene, 5 (4), 519–24.
- Shintani, S., Li, C., Ishikawa, T., Mihara, M., Nakashiro, K., Hamakawa, H., 2004. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncology, 40 (1), 13-20.
- Siekstele, R., Veteikyte, A., Tvaska, B., Matijosyte, I., 2015. Yeast *Kluyveromyces lactis* as host for expression of the bacterial lipase: cloning and adaptation of the new lipase gene from *Serratia* sp. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 42 (10), 1309–1317.
- Simon, C., Schaepe, S., Breunig, K., Lilie, H., 2013. Production of polyomavirus-like particles in a Klgal80 knockout strain of the yeast *Kluyveromyces lactis*. Prep. Biochem. Biotechnol., 43 (2), 217–235.

- Soker, S., Gollamudi-Payne, S., Fidder, H., Charmahelli, H., Klagsbrun, M., 1997. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J. Biol. Chem.*, 272 (50), 31582–31588.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., 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.
- Spohner, S.C., Zahn, D., Schaum, V., Quitmann, H., Czermak, P., 2015. Recombinant L-Rhamnosidase from *Aspergillus terreus* in selective trimming of L-Rhamnose from Steviol Glycosides. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 122, 248–254.
- Swennen, D., Paul, M., Vernis, L., Beckerich, J., Fournier, A., Gaillardin, C., 2002. Secretion of active anti-Ras single-chain Fv antibody by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology*, 148 (Pt 1), 41–50.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T., Reed, J.C., 1998. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.*, 58 (23), 5315–5320.
- Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., Paavonen, K., 2005. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.*, 65 (3), 550–563.
- Tanaka, K., Yamaguchi, S., Sawano, A., Shibuya, M., 1997. Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase). *Jpn. J. Cancer Res.*, 88 (9), 867–876.
- Terman, B.I., Carrion, M.E., Kovacs, E., Rasmussen, B.A., Eddy, R.L., Shows, T.B., 1991. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 6 (9), 1677–1683.
- Thomas, L., Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., 2015. Production of an alkaline xylanase from recombinant *Kluyveromyces lactis* (KY1) by submerged fermentation and its application in bio-bleaching. *Biochem. Eng., J.* 102, 24–30.
- Tian, X., Song, S., Wu, J., Meng, L., Dong, Z., Shou, C., 2001. Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. *Biochem Biophys Res Commun.*, 286 (3), 505–512.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., Abraham, J.A., 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.*, 266 (18), 11947–11954.
- Toivari, M., Nygard, Y., Penttila, M., Ruohonen, L., Wiebe, M., 2012. Microbial D-xylonate production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (1), 1–8.
- Tokmakov, A.A., Kurotani, A., 2012. Multiple post-translational modifications bear upon heterologous protein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 287 (32), 27106–27116.
- Tripathi, N., 2009. High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. *Def. Sci. J.*, 59 (2), 137–146.
- Tsai, S., Chiang, Y., Chin, L., Liu, H., Wang, C., 2011. Novel post-translational modifications of the hemagglutinin and neuraminidase proteins of avian influenza virus expressed by *Kluyveromyces lactis*. *J. Virol. Methods*, 175 (2), 175–181.
- Van den Berg J.A., van der Laken K.J., van Ooyen A.J.J., Renniers T.C.H., Rietveld K., Schaap A., Brake A.J., Bishop R.J., Schultz K., Moyer D., Richman M., Shuster

- J.R., 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Bio/Technology*, 8, 135-139.
- Yin, T., Miao, L., Guan, F., Wang, G., Peng, Q., Li, B., Guan, G., Li, Y., 2010. Optimized medium improves expression and secretion of extremely thermostable bacterial xylanase XynB, in *Kluyveromyces lactis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20 (11), 1471–1480.
- Yu, J., Jiang, J., Fang, Z., Li, Y., Lv, H., Liu, J., 2010. Enhanced expression of heterologous inulinase in *Kluyveromyces lactis* by disruption of hap1 gene. *Biotechnol. Lett.*, 32 (4), 507–512.
- Walsh, D.A., Wade, M., Mapp, P.I., Blake, D.R., 1998. Focally regulated endothelial proliferation and cell death in human synovium. *Am. J. Pathol.*, 152 (3), 691–702.
- Walsh, G. and Jefferis R., 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotech.*, 24 (10), 1241-1252.
- Walsh, G., 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat. Biotech.*, 28 (9), 917-924.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hülya KUDUĞ
Doğum Tarihi ve Yeri : 25.02.1987 / AYDIN
Yabancı Dili : İNGİLİZCE
Telefon : 0 356 252 16 16 (2843)
e-mail : hlykudug@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2013
Lisans	Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü	2009
Lise	Aydın Süleyman Demirel Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010- ...	Tokat Gaziosmanpaşa Üni. Biyomühendislik Bölümü	Araştırma Görevlisi
2015-2017	HiGen Biyoteknoloji	Yönetici
2017-...	HİDROGEN Biyoteknoloji Araş.Geliştirme Medikal Sağl. Kimya Eğit.Hizm.İmalat İhr.İth.San.Tic.Ltd.Şti.	Yönetici

Burslar:

Proje türü	Proje Adı	Yıl
TÜBİTAK 1001	Farklı Flüoresans Farklı Flüoresans Proteinlerin Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Boya Duyarlı Güneş Pillerindeki Kullanılabilirliğinin Araştırılması	2015-