

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



N. benthamiana'da ÜRETİLMİŞ İNSAN FIX'ın HAFİF ve AĞIR
ZİNCİRLERİNİN TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU

Rabia AKÇORA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



N. benthamiana'da ÜRETİLMİŞ İNSAN FIX'ın HAFİF ve AĞIR
ZİNCİRLERİNİN TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU

Rabia AKÇORA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***N. benthamiana*'da ÜRETİLMİŞ İNSANFIX'ın HAFİF ve AĞIR
ZİNCİRLERİNİN TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU**

**Rabia AKÇORA
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez Tübitak tarafından 114Z863 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

N. benthamiana'da ÜRETİLMİŞ İNSAN FIX'ın HAFİF ve AĞIR
ZİNCİRLERİNİN TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU

Rabia AKÇORA
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 13../.06/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

ÖZET

N. benthamiana'da ÜRETİLMİŞ İNSAN FIX'ın HAFİF ve AĞIR ZİNCİRLERİNİN TASARLANMASI, ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU

Rabia AKÇORA

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Haziran 2019; 36 sayfa

Hemofili B kandaki faktör IX proteini eksikliğine neden olan X kromozomu mutasyonunun neden olduğu kalıtsal bir hastalıktır. Faktör IX proteini aktive olmak için iki aşamalı proteolitik kesime maruz kalmaktadır. Arg145 bölgesinde ki kesilme ile iki zincirli inaktif FIXa oluşur. Bu işlemin ardından Arg180 bölgesinde hidroliz meydana gelir ve hafif zincir (LC) içeren N-terminal ile ağır zincir (HC) içeren C-terminal arasında disülfid bağları oluşarak aktif proteaz Faktör IXab meydana gelir. Aktif Faktör IX, dört yapısal domain içerir: N-terminustan başlayarak γ -karboksiglutamik asit (Gla) domaini, iki tane epidermal büyüme faktör-benzeri domain ve son olarak proteolitik domainidir. Halen, hemofili B'li hastalar ya insan kanından plazmada FIX elde edilerek ya da CHO (Çin hamsteri yumurtalık) hücrelerinde üretilen rekombinant FIX'le tedavi edilmektedir. Bununla birlikte, bu sistem son derece pahalı ve ölçeklendirilmesi zor bir sistemdir. Bitki ifade sistemi ise umut verici bir ifade yöntemi olmuştur ve diğer ifade sistemlerine kıyasla birtakım avantajlara sahiptir. Bu çalışmanın amacı, in vivo olarak bağlanması mümkün olmak üzere bitkide geçici gen ekspresyon sistemi kullanılarak faktör IX'un hafif ve ağır zincir domainlerinin üretimini denemektir. Bu çalışmada, HC ve LC genleri *N. Benthamiana* kodonları kullanılarak tasarlanmış ve kodon optimizasyonu yapılmıştır. Kodon optimizasyonu yapılmış HC ve LC genleri sentezlenmiş ve daha sonra bitki ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Klonlanmış plazmidler, elektroporasyon yoluyla *Agrobacterium tumefaciens*'in soyu olan AGL1'e aktarılmıştır. *Nicotiana benthamiana* bitkileri, HC ve LC genlerini barındıran agro ile infiltre edilmiştir. Ekspresyon ve optimizasyonun onaylanmasından sonra her iki gen, HC ve LC'nin muhtemel bağlanmaları için agro-infiltrasyon yoluyla bitki hücrelerine aktarılmıştır. LC ve HC genleriyle infiltre edilen bitki toplanıp, ekstre edilmiş ve saflaştırılmıştır. Son olarak FIX aktivitesi gerçekleştirilmiştir. Aktivitenin, insan Furine göre %10'dan daha yüksek olmadığı saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Ağır zincir, Geçici gen anlatımı, Hafif zincir, Hemofili B, Rekombinant faktör IX.

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

ABSTRACT

DESIGN, PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF LIGHT AND HEAVY CHAIN OF HUMAN FIX PRODUCED in *N. benthamiana*

Rabia AKÇORA

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

June 2019; 36 pages

Hemophilia B is an inherited disease caused by a mutation on X chromosome that result the deficiency of factor IX protein in blood. The Factor IX protein undergoes a two-step proteolytic cleavage to be activated. Two chain inactive Factor IXa are formed with interruption on Arg145. Following this process, hydrolysis occurs in Arg180 region and the disulphide bonds between the N-terminal containing the light chain (LC) and the C-terminus containing the heavy chain (HC) are formed, and the active protease Factor IXab was present. Activated Factor IX contains of four structural domains: the carboxyglutamic acid (Gla) domain as the N-terminus, two epidermal growth factor-like domains and finally the proteolytic domain. Currently, patients with hemophilia B are treated either by obtaining FIX in plasma from human blood or by recombinant FIX produced in CHO (Chinese hamster ovary) cells. Studies have shown recombinant FIX has also been successfully produced in mammalian cell cultures. However, this system extremely expensive and difficult to scale up Plant expression system is promising expression system and has a number of advantages compared to other expression systems. The goal of this study was to attempt the production of factor IX light and heavy chain domains by transient gene expression method in plant for possible of assembly in vivo. In this study, HC and LC genes were engineered and codon optimized using *N. benthamiana* codons. Codon optimized HC and LC genes were de novo synthesized and then cloned into plant expression vector. Cloned plasmids were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1 by electroporation. *Nicotiana benthamiana* plants were infiltrated by agro harboring HC and LC genes. After confirmation the expression and optimization, both genes were introduced into plant cells by agroinfiltration for possible assembly of HC and LC. Plant infiltrated with LC and HC genes were harvested, extracted, purified and performed FIX activity. The activity was not higher than 10% relative to human Furin.

KEYWORDS: Heavy chain, Hemophilia B, Light chain, Recombinant factor IX, Transient gene expression.

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yürütülmesi esnasında gerek bilgi ve tecrübesini gerek ise kıymetli desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimimde bilgileri ile bana katkı sağlayan ve ufkumu açan Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün tüm değerli öğretim üyelerine ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarında ki deneysel çalışmalarında teknik bilgilerini benimle paylaşan ve manevi destekleri ile kendimi güçlü hissettiren laboratuvarımız öğrencilerinden değerli arkadaşlarım Kader ÇİÇEK, İlahı MUSAYEVA, Burcu GÜLEÇ ve Rıfat ÜNGÖR'e ve Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde öğrenciliğine devam eden diğer çok değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak yaşamım boyunca gerekli donanıma sahip olmam için maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan, insani değerlerin her türlü statü ve durumdan daha değerli olduğunu öğreten çok kıymetli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET..	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK TARAMASI	4
2.1.Hemofili Hastalığı	4
2.2.Hemofili İnsidansı	4
2.3.Hemofilinin Genetiği.....	4
2.4.Koagülasyon Mekanizması	5
2.5.FIX Pıhtılaşma Faktörünün Biyokimyası.....	7
2.6.Hemofili Tedavisi.....	9
2.6.1.Hemofili Tedavisinde Genel İlkeler	10
2.6.2.Faktör Konsantreleri	10
2.6.3.Taze Dondurulmuş Plazma (TDP)	11
2.6.4.Desmopressin (DDAVP)	11
2.6.5.Antifibrinolitik Tedavi.....	11
2.6.6.Yardımcı Tedaviler.....	11
2.7.Bitkide Geçici Gen Anlatımı.....	11
3.MATERYAL VE METOT	14
3.1.Organizma ve Plazmitler	14

3.2.Besiyerleri	14
3.3.Çözeltiler ve Tamponlar	15
3.4.Ticari Gen ve Plazmitin Kesimi	21
3.5. Ticari Gen ve Plazmitin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Saflaştırılması	21
3.6.Ligasyon Reaksiyonu	22
3.7. <i>E. coli</i> XLI-Blue Kompetan Hücre Hazırlanması	22
3.8. <i>E. coli</i> Hüresine Transformasyon ve Plazmid İzolasyonu.....	23
3.9. <i>A. tumefaciens</i> AGLI psoup Kompetan Hücre Hazırlanması	23
3.11.Bitkiden Protein Ekstraksiyonu	24
3.12.SDS-PAGE ve Western Blot Analizi	25
3.13.6XHis Etiketli F IX-HC ve F IX-LC genlerinin pürifikasyonu	25
3.14.Saflaştırılmış FIX-HC ve FIX-LC domainlerinin Kromojenik Aktivite Testi.....	26
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. FIX-HC ve FIX- LC Ticari Genlerinin Jelden Geri Kazanımı	27
4.2. Rekombinant FIX-HC ve FIX-LC Domainlerinin Üretilmesi	28
4.3. Rekombinant FIX-HC ve FIX-LC Domainlerinin Saflaştırılması.....	29
5.SONUÇLAR	32
6. KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*N. benthamiana*’da Üretilmiş İnsan FIX’ın Hafif Ve Ağır Zincirlerinin Tasarlanması, Üretimi ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

13/06/2019

Rabia AKÇORA



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	: gram
IÜ	: İnternasyonal (biyolojik) ünite
L	: Litre
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre
mM	: milimolar
M	: molar
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar

dk	: dakika
ER	: Endoplazmik Retikulum
kb	: kilobaz
kDa	: kilodalton
O.D.	: Optik Dansite
s	: saat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
sn	: saniye
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TB	: Transmission Blocking
V	: Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. İnsan faktör IX geninin genomik organizasyonu.....	2
Şekil 2.1. Hemofilide herediter geçiş.....	5
Şekil 2.2. Koagülasyon Kaskadı.....	6
Şekil 2.3. İnsan FIX proteininin yapısı ve amino asit dizisi.....	8
Şekil 2.4. FIXaβ proteini Ribbon ve katı yüzey modeli.....	9
Şekil 2.5. Bitkide geçici gen anlatımının gösterimi.....	13
Şekil 2.6. Bitkide geçici gen anlatımı amacıyla infiltrasyon gösterimi.....	13
Şekil 4.1. Jelden geri kazanım ürünleri.....	27
Şekil 4.2. FIX-HC ve FIX-LC ticari genlerin plazmit izolasyonu sonrası doğrulama amaçlı xhoI enzimi ile kesimi.....	27
Şekil 4.3. a) Optimize edilen oranlar kullanılarak yapılan western blot analizi.....	28
Şekil 4.3. b) Optimize edilen oranlar kullanılarak yapılan western blot analizi.....	29
Şekil 4.4. Saflaştırılmış HC+LC (co-express) Western blot analizi.....	30
Şekil 4.5. FIX domainlerinin insan FIX proteinine göre aktivite yüzdesi.....	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Pıhtılaşma faktörleri.....	7
Çizelge 3.1. Jel hazırlama.....	18
Çizelge 3.2. Ticari genin kesimi bileşen ve miktarları.....	21
Çizelge 3.3. Plazmid kesimi bileşen ve miktarları.....	21
Çizelge 3.4. Ligasyon reaksiyonu miktar ve bileşenleri.....	22
Çizelge 4.1. FIX domainlerinin insan FIX proteinine göre aktivite yüzdesi.....	31

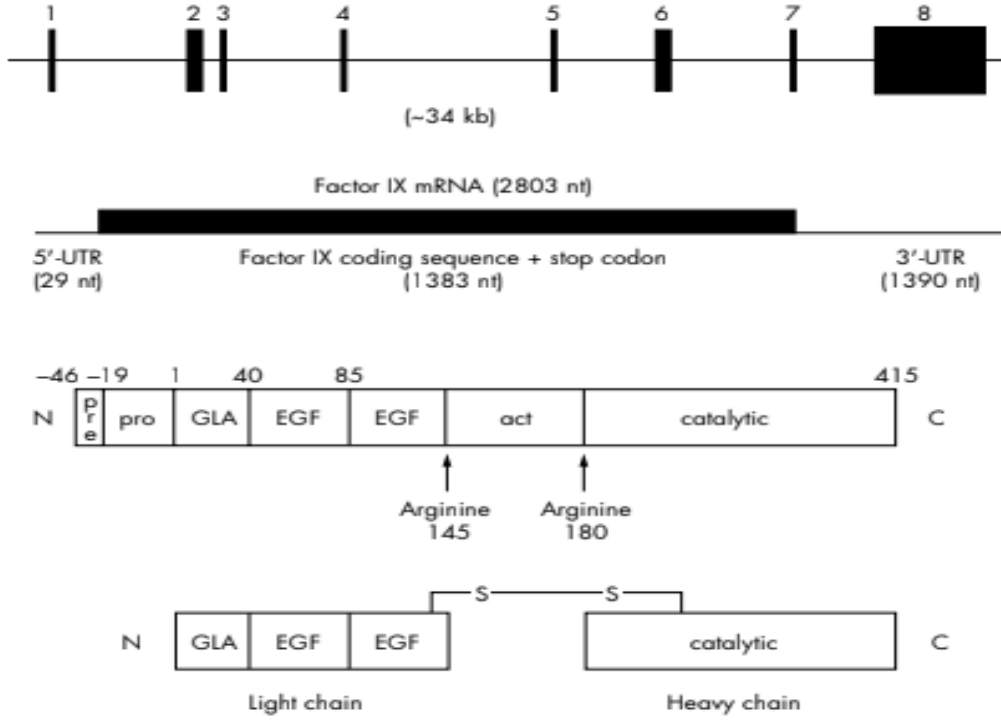
1. GİRİŞ

Hemofili kanın koagülasyon mekanizmasından sorumlu faktörlerin işlevsel bozukluğu ya da eksikliğinden kaynaklanan kalıtsal bir hastalıktır. Bu hastalığın insan hayatını ömür boyu etkilediği ve nesilden nesile kalıtsal olarak aktarıldığı bilinmektedir. (Soucie vd. 1998). Hemofili genetik açıdan X'e bağlı olarak çekinik geçen bir kanama bozukluğu olduğu bilinmekte ve taşıyıcılığını kadın yapmaktadır (Jorio vd. 2008). Kanda pıhtılaşmada görevli olan faktör proteinlerinin eksikliğinden kaynaklanan hemofilinin en yaygın olan türleri faktör VIII eksikliğinde meydana gelen Hemofili A ve faktör IX proteininin fonksiyonel bozukluğundan meydana gelen Hemofili B hastalığıdır (Atilla vd. 2003).

Hemofilia B hastalığı X-kromozomuna bağlı olarak faktör IX eksikliği veya işlevsel bozukluğu ile karakterize edilen kanama hastalığıdır (Mannucci vd. 2001). Faktör IX proteini koagülasyon mekanizmasının esas yolağında yer alan ve moleküler ağırlığı 55 kDa olan tek zincirli serin proteaz ailesine ait plazma glikoproteinidir. Karaciğerde üretilen faktör IX proteini biyolojik aktivitesini kazanmak için posttranslasyonel modifikasyonlar geçirmektedir (Schuettrumpf vd. 2005).

Faktör IX proteini X kromozomunun q27.1 bandında bulunup 34 kilobaz (kb) uzunluğundadır. 8 ekzon ve 7 intron bölgesinden oluşmaktadır (Cao vd. 2013). Faktör IX plasmada zimojen halinde bulunur. Aktif hale gelebilmesi için proteaz aktivitesi gerekir. Aktivite gösterebilmesi için ise vitamin K gereklidir. Faktör IX proteini faktör XI tarafından proteolitik kesime uğrayarak iki zincirli bir yapıya dönüşür. Bunlardan birisi ağır zincir (HC) 38,000 Da ve hafif zincir (LC) 17, 700 Da'luk bir kısımdır. İlk kesim 180. ve 181. amino asit arasında gerçekleşir. Bu ilk kesimden sonra aktif form olan peptid FIXa α olarak adlandırılır. İkinci kesimde ise ağır zincirden 11,000 Da'luk bir polipeptit zinciri kesilir ve 27,000 Da'luk bir kısım oluşur. Bu ikinci kesimden sonra ise fizyolojik aktif FIXa β oluşur. Oluşan bu aktif FIXa β proteini etkili bir proteaz değildir fakat, FVIIIa ile kompleks kurarak (Ca⁺² yoluyla bağlanarak) ve fosfolipit yardımıyla Faktör X'u aktif hale getirebilir.

Ağır zincir domaini katalitik modül içerirken, hafif zincir domaini; linker (bağlanma kısmı), Gla modül ve 2 tane epiderman growth factor-like domain içerir (Bowen 2002). Daha sonra hafif ve ağır zincirlerin polipeptit (17,000 ve 27,500) kısımları disülfid bağları ile birleşerek aktif bir proteaz oluşturur. Oluşan bu proteaz Faktör X'u proteolitik olarak keserek aktifleştirir ve pıhtılaşma sürecini başlatır. Ancak faktör X'un aktifleşebilmesi için Ca⁺² iyonlarına, fosfolipitlere ve Faktör VIIIa'ya ihtiyaç vardır. Bu şekilde faktör X zincirleme bir reaksiyon oluşturarak yaralı bölgede çözülmeyen fibrin ağı oluşturup pıhtılaşmayı gerçekleştirir. Ayrıca Faktör IX Feedback yaparak daha çok Faktör IX oluşmasını sağlar ve bu bölgede daha çok pıhtı oluşumuna yardımcı olur (Brandstet vd. 1995).



Şekil 1.1. İnsan faktör IX geninin genomik organizasyonu (Bowen DJ. 2002)

Hemofili tedavisinde en yaygın olan yöntem koagülasyon faktör konsantreleri ile yerine koyma tedavisidir. Plazma kaynaklı üretilen faktörlerde viral enfeksiyon riski olması sebebiyle 1990'lı yıllar da rekombinant olan faktörlerler üretilmeye başlanmıştır (Akdeniz 2015). Faktör IX proteini rekombinant ekspresyon sistemlerinde üretilmektedir. Yapılan araştırmalara bakıldığında memeli hücre kültürlerinde üretildiği ve başarılı olduğu gözlenmiştir. Ancak bitkide geçici gen ekspresyon sisteminin ökaryotik posttranslasyonel mekanizmaya sahip olmaları, düşük maliyette üretilmeleri, memelilere ait patojen içermemeleri nedeniyle diğer ekspresyon sistemlerinden daha avantajlıdır (Schillberg vd. 2005). Ayrıca bitkilerde üretilen proteinlerin, bakteri ve memeli hücre kültürlerinde kontaminasyona neden olan toksinleri içermemektedir (Boehm 2007).

Bu çalışmanın özgünlüğü de insan FIX proteininin hafif ve ağır zincir domainlerinin bitki ekspresyon sisteminde üretilmeye çalışılmasıdır. Hedef protein bitkide transgenik ve transient ekspresyonu olmak üzere iki temel stratejiyle üretilmektedir. Transgenik sistem de üretilmek istenen hedef gen kloroplast genomuna veya bitki nükleer genomuna entegre olmaktadır (Daniell 2006). Transient sistemde ise hedef geni taşıyan bitki virüsleri konak bitkiye aktarılır ve eksprese olacak gen bitki genomuna entegre olmadan ifade olur. Bu metot hedeflenen proteinin yüksek ekspresyonu, kısa sürede üretilmesi, sistemin istikrarlı ve ölçeklenebilir olması nedeniyle stabil transformasyona nazaran daha avantajlıdır (Yusibov ve Mamedov 2010).

Yapılan bu çalışmada *N. Benthamiana* bitkisinde transient ekspresyon metodu kullanılarak faktör IX proteinine ait ağır ve hafif zincirlerin ve aralarındaki disülfid bağın oluşması ile aktif faktör IX proteinin invitro üretilebilme potansiyelini araştırılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Hemofili Hastalığı

Tarihte hemofili hastalığı ilk olarak Endülüslü bir bilgin olan Ebul-Kasım Zehravi (932-1132) tarafından bildirilmiştir. Güncel olarak baktığımızda hastalık 1803 yılında Dr. John Conrad Otto tarafından tanımlanmıştır. Hastalığın ailede ki bireylere geçiş şekli ise 1820 yılında Nasse tarafından saptanmıştır. 1839 yılında Schönlein bu hastalığa hemofili ismini vermiştir (Açıkgöz vd. 2013).

Hemofili hastalığı kanın pıhtılaşmamasından kaynaklanan ve nadir görülen bir kanama bozukluğu durumudur. Hastalığın dünya da insanları herhangi bir ırk gözetmeksizin etkilediği bilinmektedir. Ağırılık olarak erkeklerde yaygın olan bir hastalık olarak görülse de taşıyıcılığını kadınlar yapmaktadır. Genetik açıdan X'e bağlı olarak resesif geçen kanama bozukluğu durumudur. Kan da 13 çeşit pıhtılaşma faktörü bulunmaktadır. Her birinin eksikliği ayrı bir hastalık olarak tanımlanır. Ancak en yaygın ve en çok probleme sebep olan türü faktör VIII eksikliğinde meydana gelen Hemofili A ve faktör IX proteininin fonksiyonel bozukluğundan meydana gelen Hemofili B hastalığıdır (Atilla vd. 2003). Hemofili hastalığı koagülasyon mekanizmasının bozukluk derecesine göre;

- Ağır hemofili; faktör seviyesi %1 ve aşağısında olanlar
- Orta şiddette hemofili; %1-5 arası faktör bulunduranlar
- Hafif hemofili; %6-40 arası olanlar (Frachon vd. 2000-2002).

Hastaların yaralanma durumunda kanamaları uzun sürmekte veya ayak bileği, diz, dirsek gibi bölümlerde içeri kanamalar oluşmakta bu da organ ve dokulara zarar vermektedir. Sonuç itibariyle insan hayatını tehdit eden bir hastalık olduğu bilinmektedir.

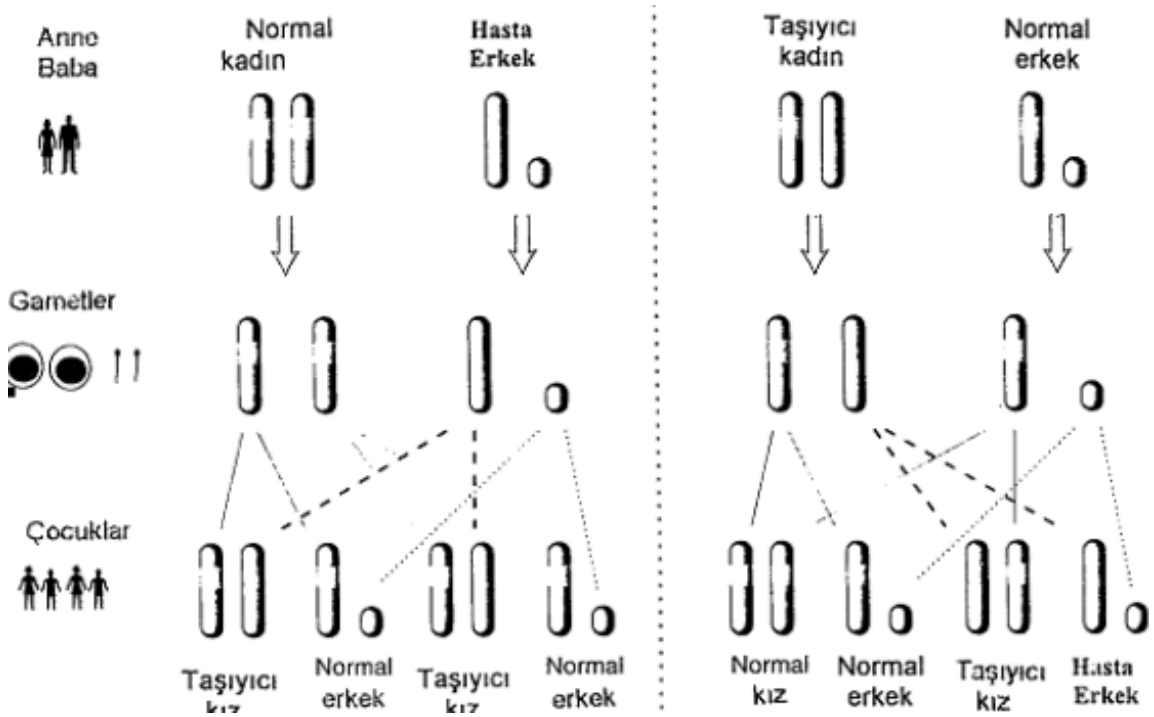
2.2. Hemofili İnsidansı

Pıhtılaşma faktörlerinin yetmezliğinden kaynaklanan hastalıkların %85'ni Hemofili A oluşturmakta, her 5.000-10.000 erkek doğumunda bir görülmektedir (Açıkgöz vd. 2013). Sıklık oranına bakıldığında Hemofili B'ye göre 5-6 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Hemofili B ise hastalıkların %15 kadarını oluşturmaktadır (Soucie vd. 1998). Hastalığın etkileri araştırıldığında dünyada ki ırklar üzerinde bir farklılık göstermediği görülmüştür. Hastalığın teşhisi ve klinik bulguları hastanın yaşı ilerledikçe saptanabilir. Hemofilinin derecesine göre teşhis daha erken ya da geç yaşlarda yapılabilmektedir (Atilla vd. 2003).

2.3. Hemofilinin Genetiği

Kalıtsal olan hemofili hastalığı genetik açıdan X'e bağlı, resesif olarak nesilden nesile geçen bir kanama bozukluğu olduğu bilinmektedir. Pıhtılaşma faktörleri X kromozomu tarafından taşınmaktadır. Bu durum da hemofili olan bir kadınının her iki

kromozonun hemofiliye sebep olan anormal gen taşınması gerekmektedir. Bu sebepten kadınlarda erkeklere oranla daha nadir görülen bir hastalıktır. Eğer iki X kromozomundan yalnızca biri anormal gen taşıyorsa bu durumda kadın hastalık taşıyıcısıdır. Erkekte ise X kromozomu anormal gen taşıyorsa hemofili olduğandır.

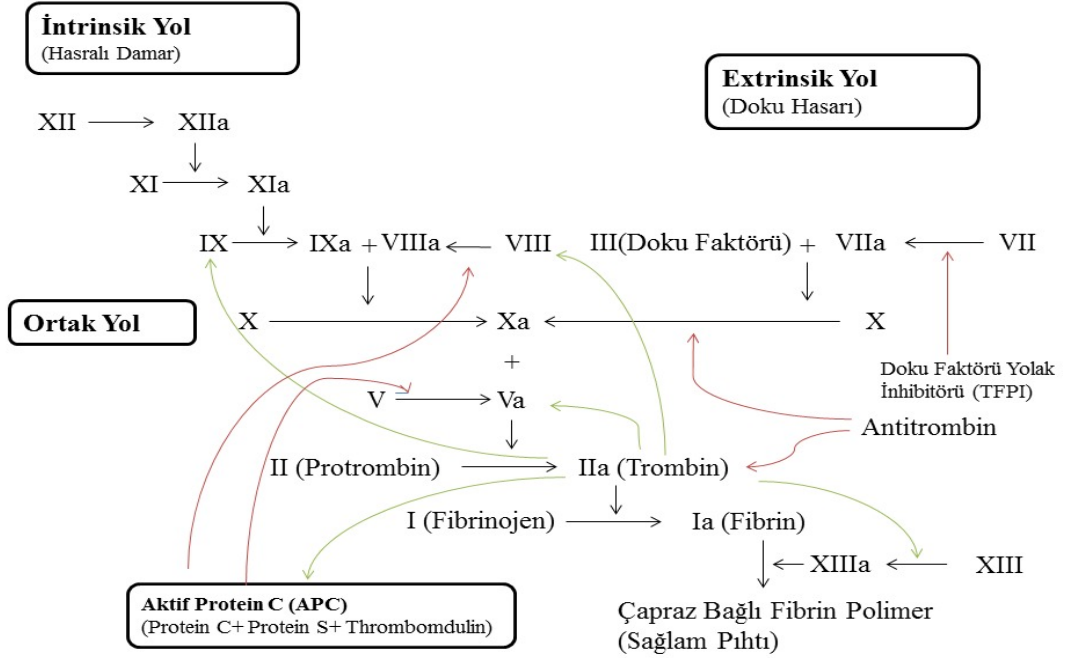


Şekil 2.1. Hemofilide herediter geçiş (Akdeniz N. 2015)

2.4. Koagülasyon Mekanizması

Vücudun yara alması durumunda kan damarlarında kanamayı durdurmak için pıhtılaşma süreci başlamaktadır. İlk olarak kan akışının azalması için serotonin salgılanır ve damar büzülür. Daha sonra trombositler devreye girer ve onların salgıladığı özel maddeler vasıtasıyla pıhtılaşma da görevli olan enzimler bir noktada toplanır. Pıhtılaşmada görevli olan trombin proteini ihtiyaç olduğu kadar üretilmektedir. Görevi suda erime özelliği olan ve plazmada serbest halde bulunan fibrinojeni, suda erimeyen fibrine dönüştürür. Fibrinler yapışkan uçları sayesinde diğer fibrinlere bağlanarak uzun zincirler oluşturmaktadırlar. Oluşan bu zincirler ağ haline gelerek kan akışını önlemektedir. Pıhtılaşma süreci intrinsek ve ekstrinsek sistem olmak üzere iki farklı yol ile başlamaktadır. İntrensek yolakta, Faktör XII damar yüzeyinde ki ilgili maddelere bağlanarak aktif hale gelir ve ilk olarak Faktör XI daha sonra sırasıyla Faktör IX ve Faktör X'u aktive eder. İntrensek yolakta kalsiyuma ihtiyaç yoktur. Ekstrinsek yolda ise dokuların tümünde bulunan ve hücre de hasar meydana gelince ortaya çıkan doku tromboplastini (Faktör III), Faktör VII ile birleşerek Faktör X'u aktif hale getirir. Faktör

X, Faktör V ile birlikte protrombini (Faktör II) trombine çevirir. Trombin ise fibrinojeni (Faktör I) fibrine çevirir. Aktive faktörler daha sonra karaciğer de yıkılırlar (Amy vd. 2003).



Şekil 2.2. Koagülasyon Kaskadı (Çolak E. 2005)

Çizelge 2.1. Pıhtılaşma faktörleri

Pıhtılaşma Faktörleri	Eş Anlamlıları
Faktör I	Fibrinojen, plazma proteindir. Trombin tarafından fibrine dönüştürülür.
Faktör II	Protrombin, Yapımı için K vitamini gereklidir. Karaciğerde sentezlenerek buradan kana verilir.
Faktör III	Doku Faktörü (Tromboplastin), protrombini trombine çeviren tromboplastinin şekillenmesinde bazı faktörler ve kalsiyum iyonu ile beraber görev yapar.
Faktör IV	Kalsiyum, kanın pıhtılaşmasında mutlaka gerekli bir iyondur.
Faktör V	Proakselerin (Labin faktör, Ac-globulin), serumda bulunmasına rağmen pıhtılaşma sırasında protrombinin trombine çevrilmesinde gereklidir.
Faktör VI	Yoktur
Faktör VII	Serum protrombin konversiyon akseleratörü (SPCA), 3. Faktör tarafından protrombin aktivatörünün şekillenmesinde gereklidir.
Faktör VIII	Antihemofilik faktör (AHF), Antihemofilik Globulin (AHG), Antihemofilik faktör A
Faktör IX	Plazma tromboplastin komponenti (PTC), Antihemofilik faktör B, Plazma tarafından protrombin aktivatörünün şekillenmesinde gereklidir.
Faktör X	Stuart faktör, Stuart power faktör; Eksikli kanamaya sebep olur.
Faktör XI	Plazma tromboplastin antesedanı (PTA), Antihemofilik faktör C, Eksikli kanamaya sebep olur.
Faktör XII	Hegeman Faktörün, kanın yabancı yüzeylerle temasında aktive olur.
Faktör XIII	Fibrin stabilize edici faktör.

2.5. FIX Pıhtılaşma Faktörünün Biyokimyası

Hemofili B kanda bulunan faktör IX proteininin yapısının bozulması, miktarının azalması veya olmaması durumunda kanın pıhtılaşmamasından kaynaklanan bir hastalıktır (Çilingir vd. 2005). Türkiye’de bulunan 5450 hemofili hastasından 950’si hemofili B vakasıdır (Anomim 1). Pıhtılaşma faktörlerinden biri olan Faktör IX proteini koagülasyon mekanizmasının da yer almaktadır. Faktör IX’un moleküler ağırlığı 55kDa kadar olup, tek zincirli serin proteaz ailesine ait plazma glikoproteinidir. Faktör IX

proteini X kromozomunun q27.1 bandında bulunup 34 kilobaz (kb) uzunluğundadır. 8 ekzon ve 7 intron bölgesinden oluşmaktadır (Cao vd.2013).

Ekzon I-FIX proteininin, ER'nin lümenine hedefleyen hidrofobik sinyal peptidini kodlar.

Ekzon II-Pro-peptid ve Gla domainini kodlar.

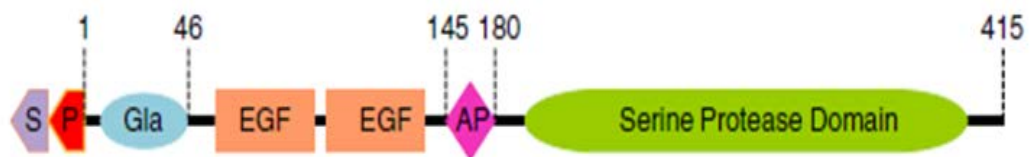
Ekzon III-FIX proteininin lipid mebranına bağlanmasını sağlayan hidrofobik heliksi kodlar.

Ekzon IV ve V-EGF1 ve EGF2'yi kodlar.

Exon VI-VIII-Serin proteaz bölgesini kodlar.

FIX proteini karaciğerde üretilmektedir. Biyolojik aktivitesini kazanabilmesi için posttranslasyonel modifikasyon geçiren serin proteaz ailesine ait zimojendir (Schuettrumpf vd. 2005). Aktif hale gelebilmesi için proteaz aktivitesi gerekir. Aktivite gösterebilmesi için ise vitamin K gereklidir.

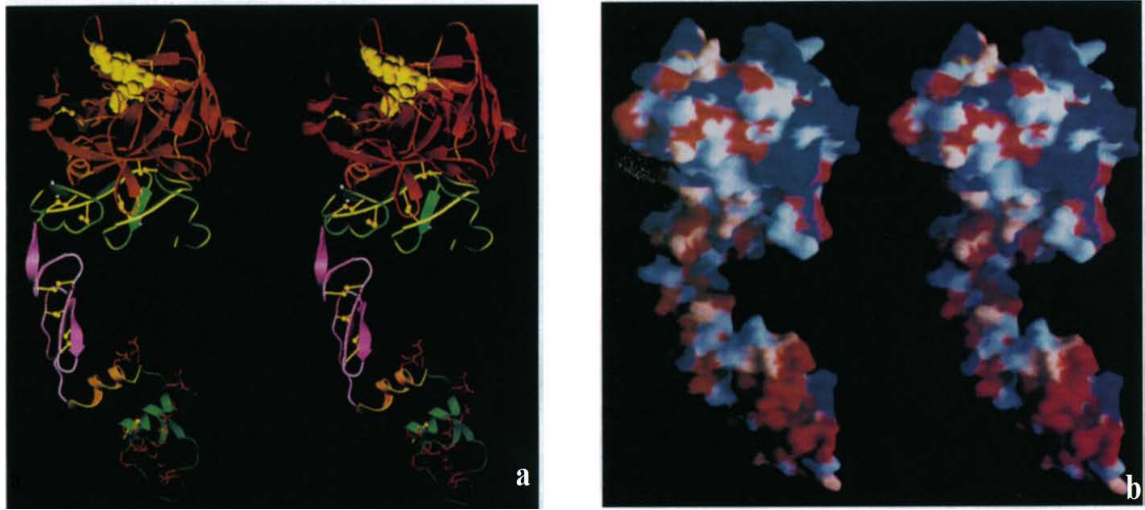
Faktör IX proteini, Faktör XI tarafından proteolitik kesime uğrayarak iki zincirli bir yapıya dönüşür. Bunlardan birisi ağır zincir (HC) 38,000 Da ve hafif zincir (LC) 17,700 Da'luk bir kısımdır. İlk kesim 180. ve 181. amino asit arasında gerçekleşir. Bu ilk kesimden sonra aktif form olan peptid FIX α olarak adlandırılır. İkinci kesimde ise ağır zincirden 11,000 Da'luk bir polipeptid zinciri kesilir ve 27,000 Da'luk bir kısım oluşur. Bu ikinci kesimden sonra ise fizyolojik aktif FIX β oluşur. Aktive olmuş Faktör IX (Faktör IXa) dört adet yapısal domainden oluşur. N-terminustan başlayarak γ -karboksiglutamik asit (Gla) domaini, iki tane epidermal büyüme faktör-benzeri domain ve proteolitik domaindir (Gui vd. 2002).



Şekil 2.3. İnsan FIX proteininin yapısı ve amino asit dizisi (Liu ve ark. 2014)

Oluşan bu aktif FIX β proteini etkili bir proteaz değildir fakat, FVIIIa ile kompleks kurarak (Ca^{+2} yoluyla bağlanarak) ve fosfolipit yardımıyla Faktör X'u aktif hale getirebilir. Ağır zincir (HC) domaini katalitik modül içerirken, hafif zincir (LC) domaini; linker (bağlanma kısmı), Gla modül ve 2 tane epiderman growth factor-like domain içerir (Bowen 2002). Daha sonra hafif ve ağır zincirlerin polipeptid (17,000 ve

27,500) kısımları disülfid bağları ile birleşerek aktif bir proteaz oluşturur. Oluşan bu proteaz Faktör X'u proteolitik olarak keserek aktiveleştirir ve pıhtılaşma sürecini başlatır. Ancak faktör X'un aktiveleşebilmesi için Ca^{+2} iyonlarına, fosfolipitlere ve Faktör VIIIa'ya ihtiyaç vardır. Bu şekilde faktör X zincirleme bir reaksiyon oluşturarak yaralı bölgede çözülmeyen fibrin ağı oluşturup pıhtılaşmayı gerçekleştirir. Ayrıca Faktör IX Feedback yaparak daha çok Faktör IX oluşmasını sağlar ve bu bölgede daha çok pıhtı oluşumuna yardımcı olur (Brandstet vd. 1995).



Şekil 2.4. a) FIXaβ proteini Ribbon modeli b) FIXaβ proteini kati yüzey modeli (Brandstet H. vd.1995)

Şekil 2.4.a. Hafif zincirin N-terminal Gla domain kısmı sarı ve yeşil renlerde, Gla rezidüleri de kırmızı top ve çubuklarla gösterilmiştir. Ayrıca EGF-1 ve EGF2 (bağlayıcı peptit) açık yeşil renkte gösterilmiştir. Ağır zincirin katalitik domain kısmı ise kırmızı renkte gösterilmiştir.

Şekil 2.4.b. FIXaβ proteininin kati yüzey gösteriminde ise rezidülerin korunma durumlarına göre renklendirilmiştir. Örneğin, kanama hastalığına sebep olan (Bleeding disorder) mutasyon kırmızı renkle gösterilirken FIX proteininde spesifik korunan amino asitler pembe, diğer FIX proteininde korunan rezidüler açık mavi ve varyant rezidüler ise mavi renkte gösterilmiştir.

2.6. Hemofili Tedavisi

Hemofili bir kanama bozukluğu hastalığıdır. Kanamanın vücutta en sık olduğu yerler yumuşak dokular, kaslar ve eklemlerdir. Bazı eklemler de kanama daha sık görülebilir ve hastalığın önceliği eklem kanamalarıdır. Fakat diğer sistemlerde meydana gelen kanamalar da mortaliteyi ve morbiditeyi arttırabilmektedir. Hemofili tedavisine her şeyden önce multidisipliner yaklaşılmalıdır. Hastanın izlem ve tedavisinde Fizik

Tedavi, Ortopedi, Hepatoloji, Hematoloji, Diş Hekimliği ve İmmunoloji gibi bilim dalları birlikte yol almalıdır (Ünüvar vd. 2011).

2.6.1. Hemofili tedavisinde genel ilkeler

- Hemofili hastalarının hastalık tipi, derecesi ve kullanılan faktör düzeyi gibi bilgileri taşıyan bir kimlik kartı olmalıdır.
- Akut kanamalar 2 saat içinde tedavi edilmelidir.
- Hastaya uygun faktör verilmesine rağmen kanamanın durmaması durumunda vücutta herhangi bir inhibitör madde varlığı araştırılmalıdır.
- Hastaya uygun dozda faktör düzeyi uygulanmalıdır.
- Vücutta pıhtılaşma mekanizmasına etki eden ilaçlardan kaçınılmalıdır.
- Hastaya düzenli olarak en uygun egzersiz yöntemleri yaptırılmalıdır (Çolak 2015).

2.6.2. Faktör konsantreleri

Hemofili tedavisinde ki en büyük başarılarından biri de faktör konsantrelerinin kullanımı olmuştur. Faktör konsantreleri plazma kökenli ve rekombinant olarak iki şekilde üretilmektedir. Faktör kullanımı hemofili tedavisinde olumlu etki sağlamıştır. Ancak plazmadan elde edilen faktör konsantreleri hastalara viral enfeksiyon taşıyabileceğinden bu durumu engellemek için viral inaktivasyon sağlayan yöntemler geliştirilmiştir (Hill vd. 2003). 1990'lı yıllarda ise hemofili tedavisinde yeni bir soluk olan rekombinant faktörler üretilmeye başlanmıştır. Rekombinant faktörlerle plazmadan elde edilen faktörler arasında etkinlik açısından fark olmadığı gözlenmiştir. Rekombinant faktörler üretim açısından plazma kökenli faktörlere göre pahalı olsa da viral enfeksiyon riskinin neredeyse hiç olmadığı saptanmıştır (Mannucci 2003).

Faktör uygulamasında kilogram başına ilk verilecek doz aşağıda formülize edilen eşitlik ile hesaplanır.

$$\text{Faktör Miktarı} = (\text{Hedef faktör düzeyi} - \text{Hasta faktör düzeyi}) * \text{kg} * 0,5$$

İlk doz uygulamasından sonra hasta için hedeflenen faktör düzeyini korumak için yüklenen dozun yarısı kadarı her 8-12 saatte bir tekrarlanmaktadır.

Rekombinant faktörlerin doz hesaplamaları farklılık gösterebilir.

- ✓ Faktör VIII için ilk doz: 50 İÜ/kg, sonra 12 saat arayla 25 İÜ/kg,
- ✓ Faktör IX için ilk doz: 80-100 İÜ/kg, sonra 18-24 saat arayla 40-50 İÜ/kg uygulanır.

Hemofiliklerin tedavi süreleri ise ortalama 10-21 gündür (Ünüvar vd. 2011).

2.6.3. Taze dondurulmuş plazma (TDP)

Faktör düzeyinin istenilen miktarda olması için çok fazla TDP'ye ihtiyaç vardır. Bu da aşırı volüm yüklenmesine sebep olacağından ağır tip hemofililerin kanamalarında kullanışsızdır, ancak hafif tip hemofililerde faydalıdır (Johnson vd. 1998).

TDP 200-250 ml hacmindedir ve mililitrede Tedavi için TDP'nin günlük doz miktarına 10-20 mililitre/kilogram ile başlanmaktadır. Milimetrede 0.6-0.9 ünite FVIII faktörü ve vWF ile 0.9-1 ünite FIX içermektedirler (Hill vd. 2003).

2.6.4. Desmopressin (DDAVP)

Desmopressin damar endoteli içerisinde depolanmış Faktör VIII ve plazminojen aktivatörlerini uyararak plazmaya salınımlarını sağlar. Böylece plazma düzeyi artırılmış olur. Bu tedavi yöntemi orta ve hafif derecedeki hemofiliklerde kullanılır (Özalp 2002).

2.6.5. Antifibrinolitik tedavi

Antifibrinolitik tedavide en sık kullanılan ilaç traneksamik asittir. Burun ve ağız içi kanamaları antifibrinolitik ilaçlarla durdurulabilir. Traneksamik asit plazmini inhibe ederek kanamayı durdurabilmektedir (Çolak 2015).

2.6.6. Yardımcı tedaviler

Hemofili hastaları için tavsiye edilen yardımcı tedaviler ise öncelikle hastaların korunması, şişkinlik ve ağrı durumunda buz uygulamaları, istirahat, kompresyon ve yukarıda tutma metotlarıdır (Akdeniz 2015).

2.7. Bitkide Geçici Gen Anlatımı

Rekombinant proteinlerin üretimi için çeşitli ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları bitki, böcek, bakteri, maya ve memeli hücre kültürleridir. Bitki ekspresyon sistemi diğer ekspresyon sistemlerine göre birçok avantaja sahiptir. Üretim açısından daha düşük maliyetli olmasının yanı sıra ökaryotik translasyon sonrası modifikasyon mekanizmasına sahip oldukları için geçici gen ifadesi metodu kullanılır ve istenilen protein çok kısa bir sürede üretilmektedir (Scholthof ve Scholthof 1996; Mett vd. 2008; Yusibov ve Mamedov 2010; Yusibov vd. 2016). Bitkiden üretilen proteinler de bakteri ve memeli hücre kültürlerinden bulaşacak kontaminasyon riski çok az bulunmaktadır. Memelilere ait olan patojenleri de içermezler (Schillberg vd. 2005). Heterolog proteinler bitkilere geçici olarak transforme edilerek kısa bir zaman içerisinde çoklu olarak üretilmektedirler (Shamloul vd. 2014). Transgenik bir bitki hattının oluşturulması, hedeflenen proteinin bu bitkilerden üretilmesi uzun bir zaman gerektirdiği gibi maliyet olarakta üretimi masraflı olmaktadır. Bunun nedeni ise hedef proteinin transgenik bitkilerde düşük seviyelerde ekspre

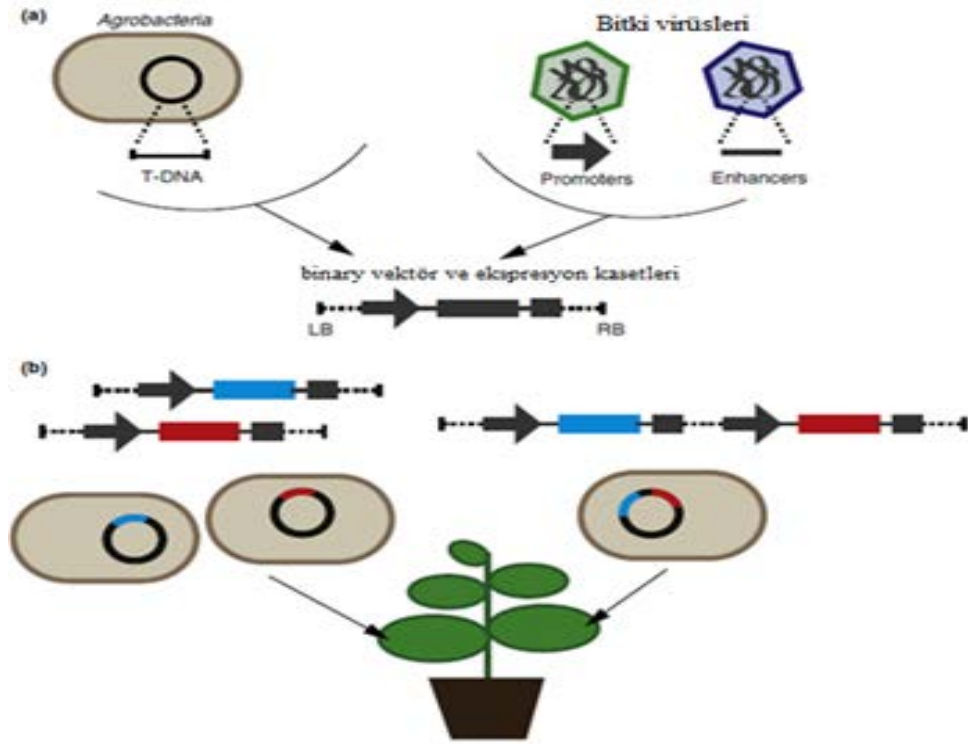
olması ve elde edilen ürünün saflaştırma sürecinin zor ve ürün maliyeti gerektirmesidir (Edelbaum vd. 1992; Kusnadi 1997).

Bitkide geçici gen ifadesi yönteminin genel olarak avantajlarına bakıldığında uygulamanın kolaylığı, kısa bir sürede üretilmesi, düşük maliyetli olması ve protein üretiminde bitki başına düşen yüksek verim miktarıdır (Kapila vd. 1997). Bitkilerde geçici protein üretiminde bitki dokularına gönderilen vektörler, rekombinant bitki viral vektörleri ya da bakteriyel binary vektörlerdir. Geçici gen ifadesindeki en gelişmiş kullanım ise agro-infiltrasyon metodu ile bitkiye gönderilen, binary vektörlerle bitki virüslerinin bileşenlerini birleştiren “launch vektörleri” dir (Shamloul 2014). Bitkiye gen aktarımında çoğunluk olarak binary vektörler kullanılsa da *Agrobacterium tumefaciens*'in bir DNA segmenti olan T-DNA vektörü bitki çekirdeğine aktarılmaktadır (Gelvin 2003).

Binary vektörler iki bölümden oluşurlar. Birinci bölüm T-DNA'yı taşıyan kasettir. İkinci bölüm ise *E. coli* ve *A. Tumefaciens*'in replikasyon fonksiyonlarını, seçiciliği sağlayan gen bölgelerini ve plazmitin hareketlilik fonksiyonlarını kodlayan genleri içerir (Komarova 2010; Komori vd. 2007; Lee ve Gelvin 2008). Bitki geçici gen ifadesi sisteminde kullanılan vektörler de kendini kopyalayabilen virüslerden yararlanılır. Bu virüslerden bazıları: Potato X virus (PVX), Tobacco mosaic virus (TMV), Tobacco etch virus (TEV), Cowpea mosaic virus (CPMV). Ayrıca bu vektörler *Agrobacterium* ile bitkiye infiltrasyon esnasında bitki hücrelerine aktarılabilmek için T-DNA'nın içersine yerleştirilebilirler.

Tüm bu yapılan araştırmalar ve uygulamalara rağmen bitkide üretilen proteinlerin verimleri bazı faktörler tarafından etkilenmektedir. Bunlardan bazıları vektörün boyutu, ifade verimliliği, gen susturulması gibi durumlardır. Agro-infiltrasyon edilen bitkide transkripsiyon sonrası gen susturulması (PTGS) rekombinant proteinin verimini etkiler. Transkripsiyon sonrası gen susturulmasını azaltmak için gen susturma bastırıcıları kullanılmalıdır. Bunlardan biri Tomato bushy stunt virus (TBSV) elde edilen p19 proteindir (Peyret ve Lomonosoff 2015; Mardanova vd. 2017).

Bitki geçici gen ifade sisteminde agro-infiltrasyon metodu kullanılarak bitki binary vektörleri vasıtasıyla elde edilen proteinlerin, durağan olarak transforme edilen bitkilere nazaran 5-20 kat daha fazla üretim elde edildiği gözlenmiştir. Böylece bu yöntemin gerek ticari olarak gerekse akademik olarak protein üretiminde tercih edilir hale geldiği saptanmıştır (Sainsbury ve Lomonosoff 2008).



Şekil 2.5. Bitkide geçici gen anlatımının gösterimi (Mardanova vd. 2017)



Şekil 2.6. a) Hücre solüsyonunun şırınga yardımıyla bitkiye infiltrasyonu; b) Bitkinin infiltrasyon sonrası durumu

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Organizma ve Plazmitler

E. coli'nin bir suşu olan XL1Blue hücreleri, Prof. Dr. Mehmet İnan aracılığıyla temin edildi (Gıda Mühendisliği, Akdeniz Üniversitesi).

A. tumefaciens AGL1-psoup hücreleri, Prof. Sophien Kamoun aracılığıyla temin edildi (The Sainsbury Laboratory, Norwich, İngiltere).

N. benthamiana bitkisi, Akdeniz Üniversitesi serasından alınarak, bitki besleme odalarında, kontrollü şartlarda, belirli oranlardaki torf ve perlit (3:1 oranında) karışımı içerisinde deneylerde kullanılmak üzere yetiştirildi. Deneylerde 6-7 haftalık gelişim sürecinde ki bitkilerden yararlanıldı.

Modifiye edilen pEAQ vektörü, p19 dahil susturma üzerine etki eden bastırıcıları ve çoklu ekspresyon kasetlerinin anlatımını sağlar. Ayrıca genleri kesim enzimi bazlı klonlama ve GATEWAY ile bitkiye doğrudan aktarabilir.

3.2. Besiyerleri

LB-Broth besiyeri

- Distile su 1000 ml
- LB-Broth 25 g

Besiyeri bileşenleri hassas terazi ile ölçülüp bir araya getirilerek distile su içerisinde çözdürüldü. pH:7.0'a ayarlandı ve 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak sterilhale getirildi.

SYS (BBL) besiyeri

- Soyhidrolizat 10 g
- Yeast extract 5 g
- NaCl 5 g
- Distile su 1000 ml

Besiyeri bileşenler hassas terazi ile ölçülüp bir araya getirilerek distile su içerisinde çözdürüldü. pH: 7.0'a ayarlandı ve 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak sterilhale getirildi.

SOC besiyeri

- Bactotripton 20 g
- Bacto yeast extract 5 g
- NaCl 5M 2 ml

- KCl 1M 2,5 ml
- MgCl₂ 1M 10 ml
- MgSO₄ 10 ml
- Distile su 1000 ml

Besiyeri bileşenler hassas terazi ile ölçülüp bir araya getirilerek distile su içerisinde çözdürüldü ve 121 °C'de 30 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi. Besiyeri otoklavdan alınarak sıcaklığın 50°C'ye kadar düşürüldü ve daha sonra steril kabin içinde 20 ml 1M glukoz eklendi.

MMA besiyeri

- MES 1,952 g
- MgCl₂ 10 ml
- Distile su 1000 ml

Besiyeri bileşenler hassas terazi ile ölçülüp bir araya getirilerek distile su içerisinde çözdürüldü. pH: 5.8'e ayarlandı ve 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi. 1L MMA besiyerine kullanılmadan önce 150µl Asetosyringene eklendi.

Asetosyringene (AS, 100 mM) stok çözeltisi

- Asetosyringene 0,3924 g
- Etanol (%95) 12 ml
- Distile su 8 ml

1L MMA besiyerine 150µl Asetosyringene eklenilmiştir.

3.3. Çözeltiler ve Tamponlar

Agaroz Jel Elektroforezi

TAE Tamponu (50X)

- Tris-base 242 g
- Glasiyal asetik asit 57.1 ml
- EDTA (0.5 M, pH 8.0) 100 ml
- Distile su 1000 ml

EDTA (0,5 M, pH: 8.0, 100 ml)

- EDTA 14,612 g
- Distile su 100 ml

Agaroz Jel (%1'lik)

0,6 g agaroz hassas terazide tartılarak üzerine 60 ml 1XTAE tamponundan eklendi. Agarozun homojen halde çözünmesi için yaklaşık olarak 2 dakika mikrodalga fırında eritildi. Agaroz tamamen eridikten ve sıcaklığı elle tutulabilir sıcaklığa düştükten sonra 1,2 µl Etidyum Bromid (EtBr) eklendi ve karıştırıldı. Karışım istenilen boyutta tarağın yerleştiği elektroforez tankına döküldü. Kabarcıklar uzaklaştırıldı. Oda sıcaklığında jel donmaya bırakıldı.

Kompetan Hücre Hazırlanması**1 M CaCl₂**

- CaCl₂ 1,47 g
- Distile su 10 ml

0,1 M CaCl₂

- 1 M CaCl₂ 1 ml
- Distile su 9 ml

%50 Gliserol Solüsyonu

- Gliserol 50 g
- Distile su 50 ml

Hassas terazi üzerinde tartılan 50 g sıvı gliserol ile 50 ml distile su homojen şekilde çözdürüldü. Karışım 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril olması sağlandı.

0.1M CaCl₂ %15 gliserol

- 1 M CaCl₂ 1 ml
- %50 gliserol 3 ml
- Distile su 6 ml

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)**Tris HCl (1.5 M, pH: 8.8)**

- Tris-base 92,5 g
- Distile su 250 ml

pH, HCl ile düşürülerek 8.8'e getirildi ve distile su ile 500 ml'e tamamlandı.

Tris HCl (0.5 M, pH: 6.8)

- Tris-base 30 g
- Distile su 250 ml

pH, HCl ile 6.8'edüşürüldü ve distile su ile 500 ml'e tamamlandı.

Yürütme Tamponu (1X)

- Tris-base 3,03 g
- Glycine 14,3 g
- SDS (%10) 10 ml
- Distile su 990 ml

Örnek yükleme tamponu (5X, Laemli Buffer)

- Tris-HCl (1 M) 9,375 ml
- Glycerol 11,9 ml
- SDS 3,33 gr
- 2-merkaptotanol (%25) 7,5 ml
- Bromofenol mavi stok çözeltisi (100 mg/20 ml) 660 µl

pH, HCL ile 6,8'e düşürüldü ve distile su ile hacim 40 ml'e tamamlandı. -20 °C'de dolapta muhafaza edildi.

Jel boyama çözeltisi (Coomassie staining)

- Coomassie Blue R-250 1 g
- Metanol 500 ml
- Glacial acetic acid 100 ml
- Distile su 400 ml

Boya uzaklaştırma çözeltisi (Destaining)

- Methanol 200 ml
- Glacial acetic acid 100 ml
- Distile su 700 ml

APS Solüsyonu (%10)

- 60 mg APS, 600 µl distile su içerisinde çözdürüldü (Her kullanımda taze hazırlandı).

SDS Solüsyonu (%10)

- 10 g SDS hassas terazide tartılarak 90 ml distile su içerisinde çözdürüldü.

Jellerin hazırlanması (%10, 4 jel için)**Çizelge 3.1. Jel hazırlama**

	Resolving jel	Stacking jel
Distile su	7,95 ml	9,7 ml
%40 Akrilamit-Biss solüsyonu	1,25 ml	5 ml
1,5 M Tris-HCl	-	5 ml
0,5 M Tris-HCl	3,15 ml	-
% 10 SDS	125µl	200 µl
TEMED	12,5µl	10 µl
% 10 APS	62,5 µl	100 µl

Stacking jel döküldükten sonra hava ile temas eden üst fazın oksijenle etkileşime girmemesi ve yüzeyin pürüzsüz donması için pipetler aracılığıyla üzerine 500 µl izopropanol ilave edildi ve oda sıcaklığında donmaya bırakıldı.

Western Blotting**Transfer Tamponu (1X)**

- Tris 5,8 g
- Glisin 2,93 g
- SDS (%10) 370 µl
- Distile su 1000 ml

TBS (5X)

- Tris-base 12,115 g
- NaCl 42,88 g
- Distile su 1000 ml

Bileşenler tartılarak distile su içerisinde çözdürüldü ve pH: 7,5'e getirildi.

I-Block

- 0,5 g I-block hassas terazide ölçülerek 100 ml 1XTBS içerisinde yaklaşık 3 saat manyetik karıştırıcı üzerinde çözdürüldü.

Birincil antikor (primary antibody, 1:1000)

- 10 µl antikor, 10 ml I-block içerisinde çözdürüldü.

İkincil antikor (secondary antibody, 1:2500)

- 4 µl antikor, 10 ml I-block içerisinde çözdürüldü.

Protein Pürifikasyonu**1 M NaH₂PO₄**

- NaH₂PO₄(H₂O) 13,8 g
- Distile su 100 ml

1M Na₂HPO₄

- Na₂HPO₄ 28,38 g
- Distile su 200 ml

Sodyum fosfat tamponu (20mM)

- 1 M Na₂HPO₄ 15,48 ml
- 1 M NaH₂PO₄ 4,52 ml
- NaCl 17,53 g
- Distile su 800 ml

Bileşenler hassas terazide ölçülerek karıştırıldı ve pH:7.0'a getirildikten sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

100 mM imidazol stok çözeltisi

- İmidazol 0,34g
- Sodyum fosfat tamponu 50 ml

Bileşenler hassas terazide ölçülerek karıştırıldı ve +4°C'de dolapta muhafaza edildi.

10 mM Bağlayıcı Tampon (Equilibration Buffer, His-tag)

- 100 mM imidazol stok çözeltisi 5ml
- Sodyum fosfat tamponu 45 ml

Ekstraksiyon Tamponu (His-tag)

Örnek için yeterli miktarda ki 10 mM Dengeleyici Tampon içerisine 1mM olacak şekilde DIECA ölçülerek homojen olacak şekilde karıştırıldı.

25 mM Yıkama Tamponu (Wash Buffer, His-tag)

- 100 mM imidazol stok çözeltisi 12,5 ml
- Sodyum fosfat tamponu 37,5 ml

250 mM Elüsyon Tamponu (Elution Buffer, His-tag)

- İmidazol 0,851 g
- Sodyum fosfat tamponu 50 ml

1X PBS tablet çözeltisi

1 tablet PBS (2 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mM fosfat buffer) 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü.

3.4. Ticari Gen ve Plazmitin Kesimi

AgeI ve XhoI restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgelerini içeren ticari genlerin ve plazmidin kesimi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.2. Ticari genin kesimi bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
pBSK-FIX- HC/pBSK-FIX-LC	20
AgeI	2
XhoI	2
1.1 Buffer (BioLabs)	4
DNAaz içermeyen su	12
Toplam	40

Çizelge 3.3. Plazmid kesimi bileşen ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
Plazmid	20
AgeI	2,5
XhoI	5
1.1 Buffer (BioLabs)	5
DNAaz içermeyen su	17,5
Toplam	50

Çizelge 3.3.'de ki bileşenler sırayla miktarlarına göre deney tüpüne aktarılıp karıştırıldı. Kesim için 37°C'lik inkübatörde 1 saat bekletildi.

3.5. Ticari Gen ve Plazmitin Agaroza Jelden Geri Kazanımı ve Saflaştırılması

Uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen plazmid ve genler yeterli miktarda ki 6X örnek yükleme tamponu (Thermo Scientific 6X, Katalog No: R0611) ile karıştırıldı. Geri kazanım için uygun boyutta tarağın yerleştirildiği elektroforez tankına %1'lik jel hazırlanılıp döküldü. Donduktan sonra örnekler yüklendi ve yürütüldü. Jel için: 1,2 g agaroz hassas terazi üzerinde tartıldı ve 120 ml 1XTAE tampon içerisine

eklendi. Agarozun homojen biçimde erimesi için 5 dk kadar mikrodalga da ısı işleme maruz bırakıldı. Sıcaklığı düştükten sonra 2,4 µl Etidyum Bromid (EtBr) eklendi ve karıştırıldı. Hazırlanan bu karışım önceden hazırlanan uygun taraklı elektorforez tankına kabarcık olmayacak şekilde döküldü. Jelin oda sıcaklığında donması beklendi ve ardından örnekler pipet yardımıyla jele yüklendi. Örneklerin boyutunun doğru belirlenmesi amacı ile ilk kuyuya GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) yüklendi. Yürütme işlemi 100 V da 45 dakika yapıldı. Jel daha sonra transimülatör üzerine yerleştirilerek UV altında analiz edildi. Uygun boyutlarda ki bantlar bistüri ile kesilerek tüplere alındı.

Jelden geri kazanım “Zymoclean Gel DNA Recovery Kit” (Katalog No: D4007) protokolüne uygun olarak proses yürütüldü ve örnekler kazanıldı. Kazanılan örneklerin doğrulanması için %1’lik jelde 110 V da 30 dk yürütüldü. Doğrulan örnekler dolapta -20°C’de muhafaza edildi.

3.6. Ligasyon Reaksiyonu

Çizelge 3.4. Ligasyon reaksiyonu miktar ve bileşenleri

Bileşen	Miktar (µl)
Plazmid	1
FIX-HC / FIX-LC	5
2X Quick Ligase Buffer	10
Quick T4 Ligase	1
DNAaz içermeyen su	4
Toplam	21

Çizelge 3.4.’de miktarları belirlenen bileşenler mikrosantrifüj tüpünde homojen halde karıştırılmak için düşük hızda santrifüjlendi. Reaksiyonun başlaması için 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Transformasyon için karışım buz üzerine alındı. (-20 de muhfaza edilebilir)

3.7. *E. coli* XLI-Blue Kompetan Hücre Hazırlanması

100 µl *E. coli* XLI Blue hücreleri 10 ml LB besiyerine ekildi ve 37°C’lik çalkalamalı inkübatörde 1 gece inkübe edildi. Sonraki gün O.D. ölçüldü (O.D.:4.12). Hücre solüsyonundan 412 µl alınarak 100 ml LB besiyerine ekim yapıldı ve 37°C’lik çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücre solüsyonunun belirli aralıklarla

O.D.'si ölçüldü ve yeterli hücre yoğunluğuna ulaşıldığında hücreler inkübasyon alındı. Hücreler 50 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 10 dk. buzda inkübe edildi. Aynı zamanda 1 M ve 0,1 M CaCl₂ hazırlandı ve buza kondu. Hücreler inkübasyonun ardından +4°C 6000 rpm'de 3 dk. santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Pelet üzerine soğuk 0,1 M CaCl₂ eklenerek hücreler çözdürüldü ve buz üzerinde 20 dk. inkübasyona bırakıldı. Bu esnada 0,1 M CaCl₂/%15 gliserol solüsyonu (1 ml 1 M CaCl₂, 3 ml %50 gliserol, 6 ml distile su) hazırlanarak buza kondu. İnkübasyonun ardından hücreler +4°C 6000 rpm'de 3 dk. santrifüjlendi ve üst faz atıldı. Pelet 5 ml soğuk 0,1 M CaCl₂ / %15 gliserol solüsyonu içinde çözdürüldü ve 1,5 ml'lik tüplere 100 µl olacak şekilde paylaştırılarak -80°C'de saklandı.

3.8. *E. coli* Hücrelerine Transformasyon ve Plazmid İzolasyonu

Ligasyon sonrası ürünler *E. coli* hücrelerine ısı şoku yöntemi ile transforme edildi. Ligasyon işlemi yapıldıktan sonra örneğin üzerine -80°C'de dolapta muhafaza ettiğimiz 100 µl *E. coli* XL1Blue hücresi ilave edildi. Elde edilen karışım pipetaj yapılarak karıştırıldı ve buzun üzerinde 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi biter bitmez örnekler 42°C'lik su banyosuna konularak 50 saniye tutuldu ve ani olarak buz üzerine alındı. 5 dk. inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde steril kabin içinde üzerlerine 400 µl LB besiyeri eklenerek, çalkalamalı inkübatörde 37°C'de 225 rpm'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücreler 2000 Xg'de 3 dk. santrifüjlendi. Çökmüş olan pellet kısmında ki hücreler 100 µl süpernatant ile çözdürüldü. Daha sonra 50µg/ml kanamisin içeren LBA plaklarına steril öze yardımıyla yayma yapıldı ve 37°C'lik inkübatörde bir gece inkübasyona bırakıldı. Yaklaşık 16 saat sonra petrilere koloniler gözlenmeye başlandı. Koloniler 50 µg/ml kanamisin içeren 5 ml LB sıvı besiyerine ekildi. Son olarak 37°C'de 225 rpm'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

Plazmidler, *E. coli* XL1Blue hücrelerinden Zyppy Plazmid Miniprep Kiti (Zymo Research, ABD) protokolüne uygun olarak izole edildi. Deneylede kullanılmak üzere dolapta -20°C'de muhafaza edildi.

3.9. *A. tumefaciens* AGLI psoup Kompetan Hücre Hazırlanması

A. tumefaciens AGLI psoup hücreleri steril kabin içinde 5 µg/ml tetrasiklin içeren 20 ml LB sıvı besiyeri içerisine ekildi. İnkübasyon için 28 °C'lik çalkalamalı inkübatörde 225 rpm'de bir gece bekletildi. İnkübasyon süresi bitiminde spektrofotometre cihazı ile O.D. ölçü yapıldı.

Örnekler 50 ml'lik santrifüj tüplerinde 5 dk buz üzerinde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra örnekler +4 °C 3000 Xg'de 5 dk. santrifüjlendi. Hücreler pellet kısmında olduğu için üst faz atıldı. Pelet üzerine 20 ml %10'luk gliserol eklenerek çözdürüldü. Tekrar +4 °C 3000 Xg'de 5 dk. santrifüjlenerek üst faz atıldı. Son olarak

pellet üzerine 2,5 ml %10'luk gliserol ilave edilerek çözdürüldü ve mikrosantrifüj tüplerine 100 µl olacak şekilde paylaştırılarak -80 °C'de muhafaza edildi.

3.10. *A. tumefaciens* Hücrelerine Transformasyon ve *N. benthamiana* Bitkisine İnfiltrasyon

E. coli hücrelerinde çoğaltılan ve izolasyonu yapılan FIX-HC ve FIX-LC genlerini içeren PGreenII plazmidi istenen proteini üretmesi için *A. tumefaciens* hücrelerine elektroporasyon metodu kullanılarak aktarıldı. Önceden hazırlanarak -80°C'de muhafaza edilen 100 µl'lik *A. tumefaciens* AGL1 psoup kompetan hücrelerine 1 µl plazmid ilave edilerek karıştırıldı. Karışım pipet yardımıyla elektroporasyon kuvvetinin tam merkezine aktarıldı ve elektrik şoku uygulandı. Elektro şok sonrası hücrelerin üzerine 1ml SOC besiyeri eklenerek pipetaj yapıldı ve örnekler mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücreler inkübasyon için 28°C'lik çalkalamalı inkübatörde 2 saat 225 rpm'de bekletildi. İnkübasyon süresi dolan örnekler 2000 xg'de 3 dk. santrifüjlendi. Daha sonra 50µg/ml kanamisin içeren LBA plaklara öze ile yayma yapıldı ve 28°C'lik inkübatörde üç gece bekletildi. İnkübasyon süresi bitiminde oluşan koloniler seçilerek 50µg/ml kanamisin içeren BBL sıvı besiyerine ekildi. Örnekler 28°C'lik çalkalamalı inkübatörde bir gece gelişim için bekletildi.

İnkübasyon süresi dolan örneklerin spektrofotometre cihazı ile optik dansitesi ölçüldü (O.D. \geq 1) ve değerler not edildi.

Örneklerin belirli bir miktarı stok için %90'luk gliserol çözeltisi ile 1:1 oranında olacak şekilde karıştırılarak mikrosantrifüj tüplerine 1ml olarak paylaştırılarak -80°C'de dolapta muhafaza edildi. Örneklerin geri kalan kısmı +4°C 5000 Xg'de 5 dk. santrifüjlendi. Hücreler pellet kısmında olduğu için süpernatant atıldı. Pellet asetosyringene içeren MMA besiyerinde O.D.:1 olacak şekilde çözdürüldü. Son olarak hücreler manyetik karıştırıcı üzerinde 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun ardından FIX-HC ve FIX-LC genlerini içeren hücre solüsyonu O.D.:1 olacak şekilde ayarlandı ve enjektör yardımıyla bitkiye infiltre edildi.

3.11. Bitkiden Protein Ekstraksiyonu

Enjektör ile bitkinin yapraklarına infiltre edilen örnekler 5 gün sonra (dpi, day post infiltration) toplandı. İnfiltrate edilmiş yapraklar üst üste getirilerek 1g olacak şekilde parça alındı ve üzerine yaprak ağırlığının üç katı 1XPBS tamponu ilave edilerek havan içersinde havaneli kullanılarak ezildi. Pipet ile 1ml homojenattan alınıp 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra 20000 Xg'de 5 dk. santrifüjlendi. süpernatanttan analizler için 40 µl örnek alındı ve üzerine örnek yükleme tamponundan 10 µl ilave edildi. Geriye kalan süpernatant ayrı bir tüpe alınarak -20°C'de muhafaza edildi.

3.12. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

SDS-PAGE analizini yapmak için %10'luk jel hazırlandı. Örnekler yüklenmeden önce 100°C'de 5 dk. su banyosunda kaynatıldı. Kaynayan örnekler önce 100 V'da 13 dk. daha sonra 200 V'da 45 dk. yürütüldü. Yürütme işlemi bittikten sonra üst tarafta olan stacking jel kesilip atıldı. Tamponu uzaklaştırmak için karıştırıcı üzerinde 5 dk distile su ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından distile su uzaklaştırılarak jelin üzeri kapanacak şekilde jel boyama çözeltisi eklendi ve boyamanın gerçekleşmesi için 1 saat boyunca karıştırıcıda bekletildi. Boyama işlemi bitince jelin boyadan arınması için 15 dk'lık aralarla jel boya uzaklaştırma solüsyonu ile yıkaması yapıldı. Jelin üzerinde bantlar belirgin hale geldiğinde görüntüsü alındı.

Western Blot analizinde de SDS-PAGE'de olduğu gibi %10'luk jel hazırlandı. Örnekler su banyosunda 100°C'de 5 dk. kaynatıldıktan sonra jele yüklendi. Kasetler western tankına yerleştirilerek üzerlerine yürütme tamponu ilave edildi. Yürütme önce 100 V 13 dk. sonra 200 V'da 45 dk. yürütüldü. Yürütme tamamlandıktan sonra üst fazda olan stacking jel kesilerek atıldı. Jelde ki bantların membrana geçebilmesi için jel sandwich modeli şeklinde membran ve filtre kağıtlarının arasına yerleştirildi. Daha sonra kasetler tanka yerleştirilerek üzerlerine transfer tamponu ilave edildi ve 100 V da 1 saat yürütüldü. Yürütmenin ardından membran karıştırıcı üzerine alınarak % 0,5'lik I-Block solüsyonu içinde 1 saat bekletildi. Böylece istenmeyen bantlar engellenmiş olacak. Bloklama işleminden sonra membrana 1 saat süreyle birincil antikor uygulandı. (Histidin etiketli proteinlerin analizi için anti-6XHis monoklonal antikor Cat. no. 652502). Bu işlem sonunda antikor membranından uzaklaştırmak için 3X5 dk. olacak şekilde I-Block solüsyonu içinde yıkandı. Yıkamalardan sonra membrana 1 saat süreyle ikincil antikor uygulandı. Bu uygulamadan sonra membran yine 3X5 dk. tekrarlarla I-Block içinde 1X TBS ile yıkandı. Son olarak membranın üzerine görüntüleme ışın yapabildiği için SuperSignal West Pico Stable Peroxide (2,5 ml) ve Luminol/ Enhancer (2,5 ml) solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) uygulanarak 5 dk bekletildi. Görüntüleme için Membran GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanıldı.

3.13. 6XHis Etiketli FIX-HC ve FIX-LC genlerinin pürifikasyonu

FIX-HC ve FIX-LC genlerinin His etiketli formları, HisPur Ni-NTA (Thermo) yerçekimi akış (gravity-flow) kolon kromatografisi kullanılarak *N. Benthamiana* bitkisinin yapraklarından pürifiye edildi. FIX-HC ve FIX-LC genlerinin pürifikasyonu için ayrı ayrı; 25 g dondurulmuş yapraklar havan ve havaneli yardımıyla yaprağın 3 katı olacak şekilde 75 ml ekstraksiyon tamponu (1XPBS/ 10mM Imidazole, 1mM DIECA pH:7.4) içinde öğütülerek öz suyu çıkartıldı. Elde edilen posalı sıvı gazlı bezden geçirilerek posa kısmı ayrıştırıldı, alta geçen süzüntü ise +4 derecede 20000Xg' de 30 dk santrifüjlendi. Süpernatant 0.45 µm'lik filtreden enjektör yardımıyla geçirildi. HisPur Ni-NTA (Thermo) yerçekimi akış kolonu (HisPur Ni-NTA rezin, Thermo) protokole

uygun olarak hazırlandı. Kolona rezin aktarılarak, rezini miktarının 2 katı kadar bağlayıcı tampon (1XPBS/10mM İmidazole, pH 7.4) ile yıkandı. Elde edilen 75 ml süpernatant, bağlayıcı tampon ile yıkanmış olan 2 ml rezinin bulunduğu kolon içinden geçirildi. Daha sonra kolon rezinin 10 katı kadar yıkama tamponu (1XPBS/25mM İmidazole, pH: 7.4) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra, rezine bağlanan proteinlerin ayrıştırılabilmesi için elüsyon tamponu (1XPBS/250 mM İmidazole, pH: 7.4) kolondan geçirilerek örnekler fraksiyonlar halinde mikrosantrifüj tüplerine toplandı. Ayrıştırılmış fraksiyonlar sonrasında SDS-PAGE metodu ile analiz edildi. İstenilen ölçüde protein içeren fraksiyonlar tek tüpte birleştirilerek Amicon Ultra 0.5 ml santrifüj filtrelerinde konsantre edildi. Konsantre edilen örnekler -80°C dolapta muhafaza edildi.

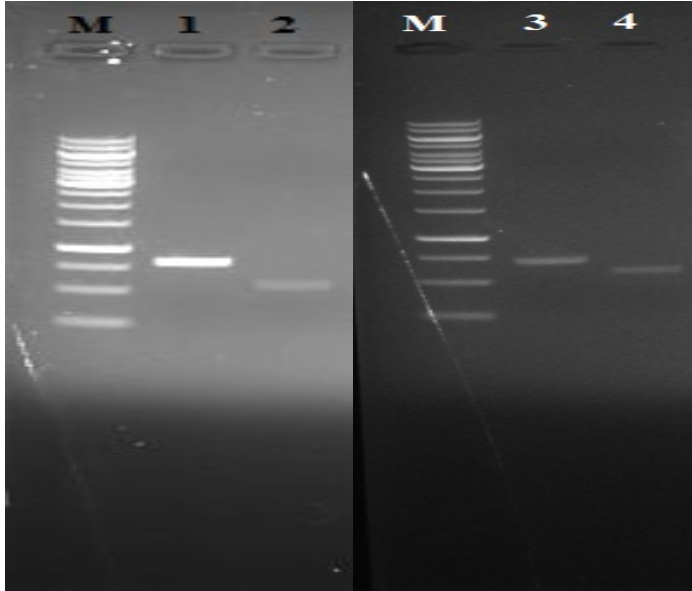
3.14. Saflaştırılmış FIX-HC ve FIX-LC domainlerinin Kromojenik Aktivite Testi

Saflaştırılan örneklerden 50 ul mikrosantrifüj tüplerine alındı. Üzerine sırasıyla protokole uygun olarak 50 ul R1 (human faktör X) ilave edilerek karıştırıldı ve 37°C'de 2 dk inkübe edildi. Süre bitiminde üzerine 50 ul R2 (FXIa, trombin, Ca⁺², fosfolipid) ilave edilip 37°C de 3 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örneğin üzerine 50 ul R3 (FXa) ilave edilerek 37°C de 2 dk inkübe edildi. Son olarak reaksiyonu durdurmak için 50 ul %20'lik asetik asit ilave edildi. Totalde 250 ul olan örnekler plate yüklendi ve 25 °C'de 405 nm dalga boyunda 40 sn süreyle spektrofotometrede ölçüme alındı.

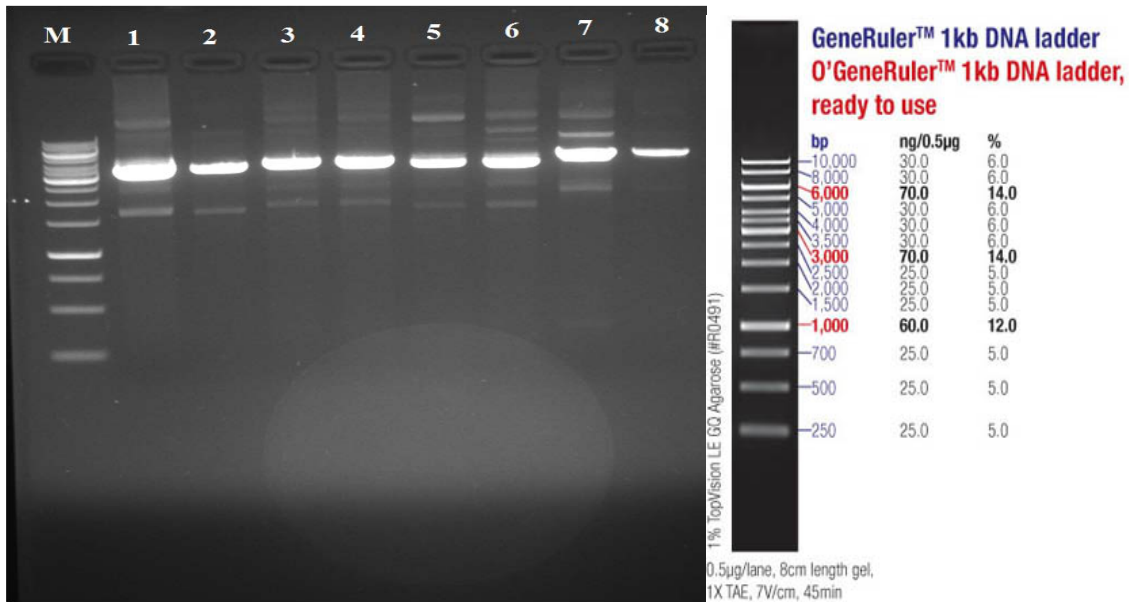
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. FIX-HC ve FIX- LC Ticari Genlerinin Jelden Geri Kazanımı

BIOMATIC ve IDT tarafından sentezlenen FIX-HC ve FIX-LC genleri uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek jelde doğrulandı.



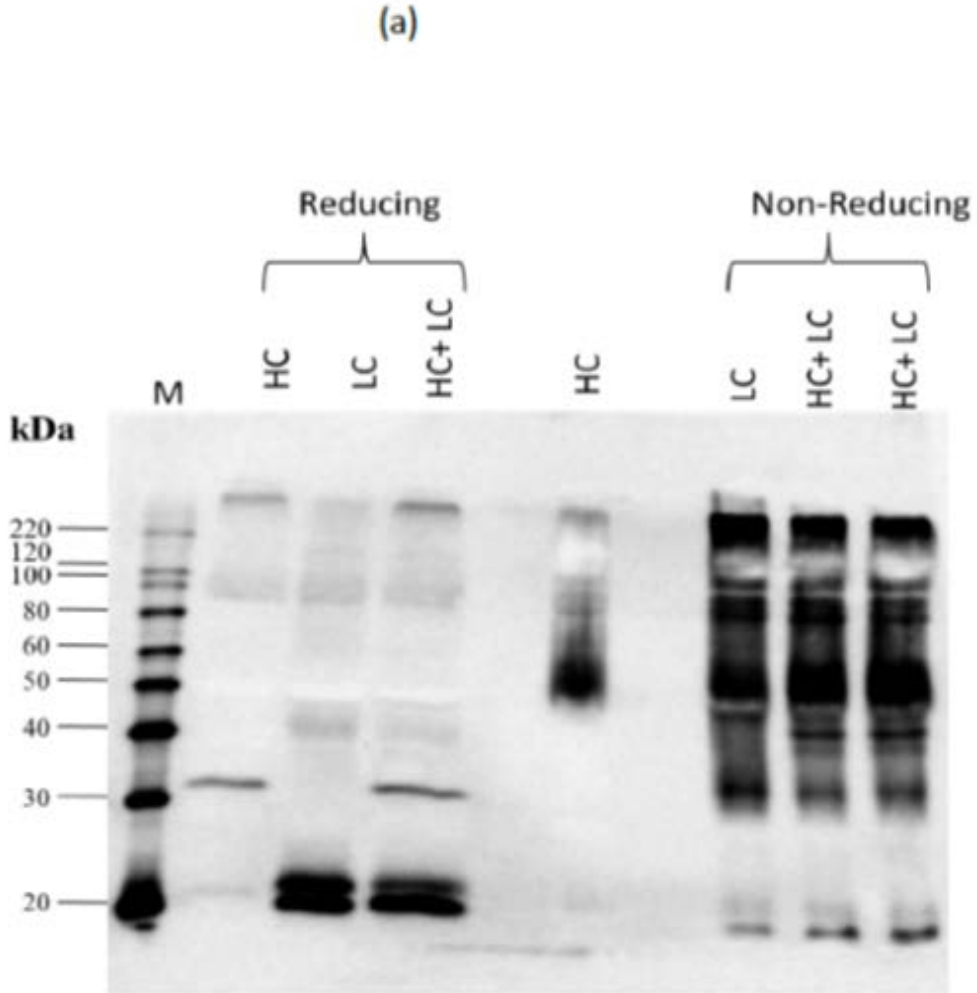
Şekil 4.1. Jelden geri kazanım ürünleri. **1:** FIX-HC (IDT) **2:** FIX-LC (IDT) **3:** FIX-HC (BIOMATIC) **4:** FIX-LC (BIOMATIC) **M:** Gene Ruler 1kb DNA Ladder

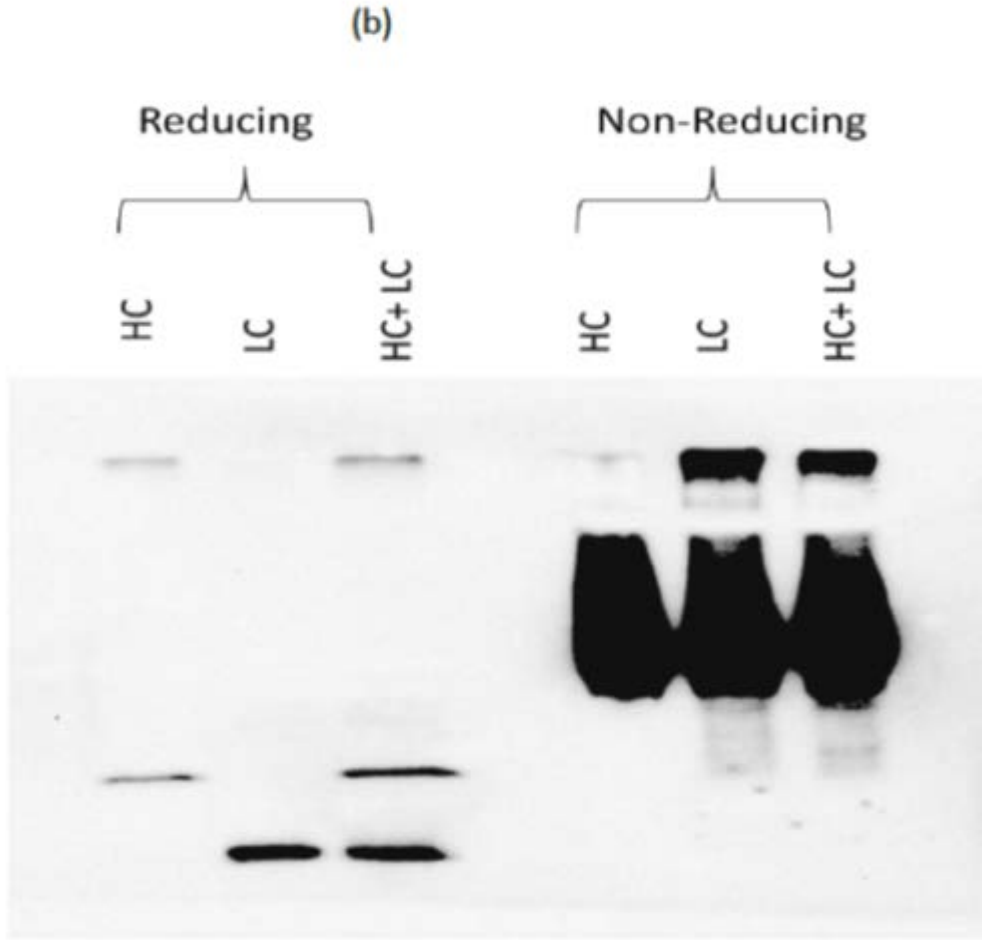


Şekil 4.2. FIX-HC ve FIX-LC ticari genlerin plazmit izolasyonu sonrası doğrulama amaçlı xhoI enzimi ile kesimi

4.2. Rekombinant FIX-HC ve FIX-LC Domainlerinin Üretilmesi

PGreenII-FIX-HC ve PGreenII-FIX-LC plazmitleri *E. coli* XLI Blue hücrelerine aktararak çoğaltıldı ve doğrulanması için uygun olan restriksiyon enzimleri ile kesildi. Doğrulanmış plazmitler *A. tumefaciens* AGL1-psoup kompetan hücrelerine elektroporasyon metodu kullanılarak aktarıldı. Plazmit içeren *A. tumefaciens* hücreleri, protein üretimini sağlamak amacıyla materyal-metot kısmında anlatıldığı gibi manuel olarak enjektör yardımıyla bitkiye infiltre edildi. İnfiltrasyon edilmiş olan bitkiler, kontrollü şartlarda bitki büyütme odasında gözetim altına alındı. Bitki yaprakları infiltrasyondan beş gün sonra toplanarak ekstrakte edildi. Elde edilen örneklerden protein üretiminin olup olmadığını gözlemlemek amacıyla western blot analizi yapıldı. Western analizi ile üretilen proteinlerin boyutları incelendi ve doğruluğu kanıtlandı.

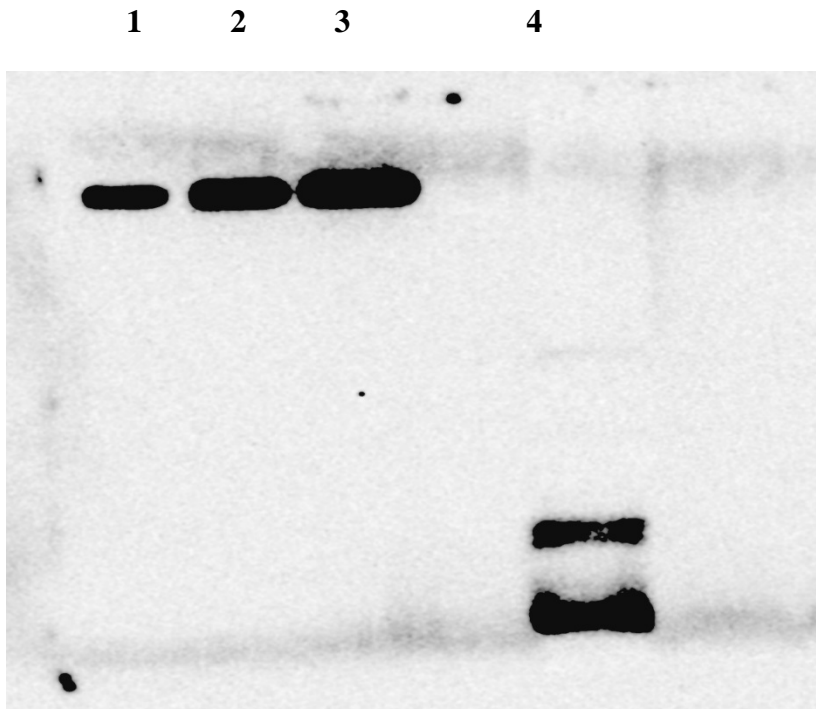




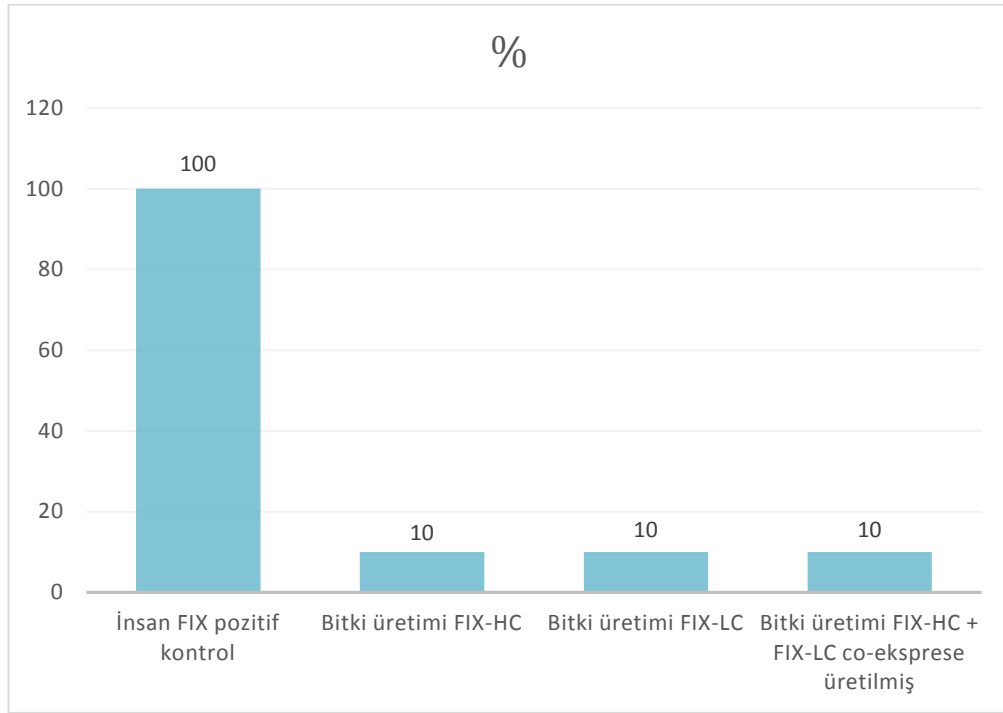
Şekil 4.3. a) Optimize edilen oranlar kullanılarak yapılan western blot analizi. **M:** MagicMark™ XP Western Protein Standard, Catalog number: LC5602, ThermoFisher Scientific. Reducing ve non-reducing şartlarda FIX'in LC, HC ve LC+HC ifadesinin Western blot analizi. HC: FIX'in ağır zinciri, LC: FIX'in hafif zinciri. LC+HC: HC ve LC'nin tek hücrelerde birlikte ekspresyonu; **b)** Biyokütle western blot analizi. Reducing ve non-reducing şartlarda FIX'in LC, HC ve LC+HC ifadesinin Western blot analizi. HC: FIX'in ağır zinciri, LC: FIX'in hafif zinciri. LC+HC: HC ve LC'nin tek hücrelerde birlikte ekspresyonu

4.3. Rekombinant FIX-HC ve FIX-LC Domainlerinin Saflaştırılması

Histidin etiketli rekombinant rekombinant FIX-HC ve FIX-LC domainlerinin saflaştırılması materyal ve metot kısmında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Histidin etiketli rekombinant FIX-HC ve FIX-LC domainlerinin saflaştırılması sonucu yapılan analizlerde protein saflığının yeterli olduğu saptanmıştır. Saflaştırma işleminden sonra pürifiye edilen proteinler fraksiyonlar halinde tüplere toplandı ve proteinlerin moleküler ağırlığına uygun olarak seçilen Millipore konsantratör yardımıyla konsantre hale getirildi. Fraksiyonlardaki total protein miktarı Bradford yöntemiyle tespit edildi.



Şekil 4.4. Saflaştırılmış HC+LC (co-express)'in Western blot analizi. Bitki üretimli PA83 protein standart (1:25 ng 2:50 ng ve 3:100 ng). LC+HC infiltrasyon yapılmış bitkiden saflaştırılmış proteinin WB analizi (co-express, pürifiye protein)



Şekil 4.5. FIX domainlerinin insan FIX proteinine göre aktivite yüzdesi

Elde edilen bulgularda insan FIX proteinine kıyasla göreceli kromojenik aktivite testini %10 olarak belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Hemofili hastalığı genetik olarak meydana geldiği için tedavisi ömür boyu sürmektedir. Bu yüzden tedavisinde kullanılan yöntemler hastanın gerek sağlığı gerekse yaşam standartları konforu açısından büyük önem arz etmektedir. Tedavisi için birçok farklı yöntem uygulansa da en yaygın olanı eksik olan faktörün vücuda verilerek giderilmesidir. Vücutta eksik olan bu faktörler günümüzde rekombinant olarak üretilmektedir.

Rekombinant üretim; viral bulaşma riskinin düşük olması, güvenirliliği, üretim için kaynak çeşitliliği, kolay ve düşük maliyetli olması nedeni ile tercih sebebi olmuştur. Rekombinant proteinlerin üretiminde bakteri, maya, böcek ve memeli hücre kültürleri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalara bakıldığında faktör üretiminin; insan plazması, çin hamster ovaryum hücreleri ve bebek hamster böbrek hücrelerinde üretildiği gözlenmiştir. Fakat viral inaktivasyon için çeşitli prosesler ve zaman gerekir. Bu çalışmada ise bitkide geçici gen anlatımı metodu kullanılarak, eksiliğinde Hemofili B'ye neden olan faktör IX proteininin hafif ve ağır zincir dominleri rekombinant olarak üretilmeye çalışılmıştır. Kaynak olarak bitkide üretilmesinin sebebi ise; insan patojenleri taşımaması, viral enfeksiyon riskinin düşük olması, bir hafta kadar kısa sürede istenilen düzeyde protein üretebiliyor oluşu ve tabiki kolay ve düşük maliyette olmasıdır.

Yapılan bu çalışmada kodon optimizasyonu yapılarak satın alınan ticari FIX-HC ve FIX-LC genleri uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek, jelden geri kazanım metodu uygulanmış ve klonlanmıştır. Genler istenilen plazmite aktarılarak uygun taşıyıcı vektör olan *A. tumefaciens* 'e elektroporasyon yöntemiyle transforme edilmiştir. Elde edilen örnekten doğru koloniler seçilerek bitkiye enjektör yardımıyla manuel olarak infiltre edilmiş ve bitkide 5-6 gün içerisinde protein üretimi sağlanmıştır. Üretilen proteinin western analizleri yapılarak doğruluğu kanıtlanmıştır. Proteinler kromatografik yöntemlerle saflaştırılmıştır. Son olarak aktivasyon testine tabi tutulup insan albümini stabilizatör olarak karşılaştırıp %10'luk bir aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, FIX'in HC ve LC domainlerinin uygun bir şekilde bir araya getirilebilmesi için daha fazla araştırma ve mühendisliğe ihtiyaç vardır. Buda, laboratuvarımızın hedeflediği yakın gelecekteki araştırma konularından biridir.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz, M. M., Güven, G., Zülfikar, B., Ak, G. 2013. Oral Cerrahide Hemofili Hastalarına Güncel Yaklaşımlar. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi. Cilt: 47, Sayı: 3 Sayfa: 33-40.
- Akdeniz, N. 2015. Hemofili A ve B Hastalarının Kız Kardeşlerinde Kanama Semptomları Ve Kanamaya Yönelik Laboratuvar Parametrelerinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır, 82s.
- Amy, E. S., Paul, B. Structure–Function Relationships in Factor IX and Factor IXa. Trends Cardiovasc Med 2003; 13:39–45
- Anomim 1: <https://www.haberler.com/turkiye-de-5-bin-450-kisi-hemofili-hastasi-7206487-haberi/>[Son Erişim Tarihi: 18.02.2018].
- Atilla, B., Pekmezci, M., Tokgözoğlu, M., Alpaslan, M. 2003. Hemofilide Kas-İskelet Sistemi Problemleri ve Ortopedik Tedavi Girişimleri, 2:3-4
- Boehm R. 2007. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. Ann. N.Y.Acad. Sci.1102: 121134.
- Bowen DJ. 2002. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. Mol Pathol 2002;55:127-144.
- Brandstet, H., Bauer, M., Huber, R., Lollar, P., Bode, W. 1995. X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92, pp. 9796-9800.
- Cao1, D. H., Liu, X. L., Mu, K., Ma1, X.W., Sun1, J.L., Bai1, X.Z., Lin, C.K., Jin, C.L. 2013. Identification and Genetic Analysis of a Factor IX Gene Intron 3 Mutation in a Hemophilia B Pedigree in China. Research Article DOI: 10.4274/tjh.2013.0275.
- Çolak, S. T. 2015. Eklem İçi Kanamanın Eklem Hasarı Üzerindeki Etkisi Tavşanlarda Diz Eklemine Deneysel Çalışma. Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 74s.
- Çilingir, O., Müslümanoğlu, M.H., Özdemir, M., Kavaklı, K., Solak, M., Artan, S. 2005. Türk Hemofili B Hastalarında Faktör IX Geni Mutasyonları. Tıp Dergisi, 6:1:6.
- Daniell H. 2006. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. Biotechnol. J. 1: 1071-1079.
- Dural Özalp EA: Farmakoloji. 3. Bask. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2002; 139-592.
- Edelbaum, O. vd. 1992. Expression of active human interferon-b in transgenic plants. J. Interferon Res, 12; 449–453.
- Frachon, X., Pommereuil, M., Berthier, A. M., Lejeune, S., Hourdin-Eude, S., Qué'ro, J., Me'zie`re, X., Mello, G. Garnier, J. 2005. Management options for dental extraction in hemophiliacs: A study of 55 extractions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99:270-5.

- Frank G. H. Hill. 2003. Guidelines on the selection and use of therapeutic products to treat haemophilia and other hereditary bleeding disorders. *Haemophilia* (2003), 9, 1–23.
- Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool*. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. p. 16–37.
- Gui, T., Lin, HF., Jin, DY., Hoffman, M., Straight, D.L., Roberts, H.R., Stafford, D.W. 2002. Circulating and binding characteristics of wild-type factor IX and certain Gla domain mutants in vivo. *The American Society of Hematology*. 100:153-158
- Iorio A, Oliovecchio E, Morfini M, et al. Italian Registry of Haemophilia and Allied Disorders. Objectives, methodology and data analysis. *Haemophilia* 2008; 14: 444-53.
- Johnson WT, Leary JM: Management of dental patients with bleeding disorders:review and update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1988;66(3):297-303
- Kapila, J., De Rycke, R., Montagu, M. ve Angenon, G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci*, 122, 101–108.
- Komori, T. vd. 2007. Current status of binary vectors andsuperbinary vectors. *Plant Physiol*, 145,1155–1160.
- Komarova, T.V., Baschieri, S., Donini, M., Marusic, C., Benvenuto, E. ve Dorokhov, Y.L. 2010. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Review of Vaccines*, 9:8, 859-876.
- Lee, L.Y. ve Gelvin, S.B. 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol*. 146, 325–332.
- Mardanova, E.S., Blokhina, E.A., Tsybalova, L.M., Peyret, H., Lomonossoff, G.P. ve Ravin, N.V. 2017. Efficient Transient Expression of Recombinant Proteins in Plants by the Novel pEff Vector Based on the Genome of Potato Virus X. *Front. Plant Sci*, 8:247.
- Mannucci PM., Tuddenham EG. The hemophilias--from royal genes to gene therapy. *N Engl J Med* 2001; 344: 1773-9
- Mannucci, P . M. 2003. Hemophilia: treatment options in the twenty-first century. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1: 1349–1355.
- Mett, V., Farrance, C.E., Green, B.J. ve Yusibov, V. 2008. Plants as biofactories. *Biologicals*, 36:354-8.
- Peyret, H. ve Lomonossoff, G. P. 2015. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnol. J*, 13: 1121–1135.
- Sainsbury, F. ve Lomonossoff, G.P. 2008. Extremely High-Level and Rapid Transient Protein Production in Plants without the Use of Viral Replication. *Plant Physiology*, 148: 1212–1218.

- Schillberg S., Twyman R.M., Fischer R. 2005. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants - technology assessment. *Vaccine* 23: 1764-1769.
- Scholthof, H.B. ve Scholthof, K.G. 1996. Plant virus gene vectors for transient ekspression of foreign protein in plants. *Annu. Rev. of Phytopathol*, 34:299–323.
- Schuettrumpf, J., Herzog, R. W., Schlachterman, A., Kaufhold, A., Stafford, D. W., Arruda, V. R. 2005. Factor IX variants improve gene therapy efficacy for hemophilia B. *The American Society of Hematology*. 105:2316-2323
- Shamloul, M., Trusa, J., Mett, V., Yusibov, V. 2014. Optimization and Utilization of Agrobacterium-mediated Transient Protein Production in Nicotiana. *Journal of Visualized Experiments*. 10.3791/51204.
- Soucie JM, Jackson D, Evatt B. Occurrence of hemophilia in the United States: The Hemophilia Surveillance System Project Invest. *Am J Hematol* 1998; 59: 288-94.
- Ünüvar, A., Demir, M., Başlar, Z. 2011. Hemofilide Kanama Tedavisi. *Ulusal Tedavi Kılavuzu*. 2:13.
- Yusibov, V.M. ve Mamedov, T.G. 2010. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Proc ANAS (Biol Sci)*, 65:195–200.
- Yusibov V.M., Mamedov T.G. 2010. Plants as an Alternative System for Expression of Vaccine Antigens. *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)*, 65(5-6): 195-200.
- Yusibov, V., Kushnir, N. ve Streatfield, S.J. 2016. Antibody Production in Plants and Green Algae. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 67:19.1–19.33.

ÖZGEÇMİŞ

Rabia AKÇORA
rabia.akcora64@gmail.com



EĞİTİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2016-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2011-2015	Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum

ESER

- 1- Mamedov, T., Musayeva, I., ACSORA, R., Gun, N., Guleç, B., Mammadova, G., Cicek, K., Hasanova, G., 2019. Engineering, and production of functionally active human Furin in *N. benthamiana* plant: *In vivo* post-translational processing of target proteins by Furin in plants. *PLoS ONE*.14(3): e02134

PROJE

- 1- 2016-2018 “*N. benthamiana* Bitkisinde Aktif İnsan Faktör IX Rekombinant Protein Üretimi” (TÜBİTAK projesi)