

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***N. BENTHAMIANA* BİTKİSİNDE AKTİF İNSAN FAKTÖR IX
REKOMBİNANT PROTEİNİNİN VARYANTLARININ KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

İlaha MUSAYEVA

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARALIK 2017

ANTALYA

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

***N. BENTHAMIANA* BİTKİSİNDE AKTİF İNSAN FAKTÖR IX
REKOMBİNANT PROTEİNİNİN VARYANTLARININ KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**İlaha MUSAYEVA
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez Tübitak tarafından 114Z863 nolu proje ile desteklenmiştir.

ARALIK 2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***N. BENTHAMİANA* BİTKİSİNDE AKTİF İNSAN FAKTÖR IX
REKOMBİNANT PROTEİNİNİN VARYANTLARININ KLONLANMASI,
EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

İlaha MUSAYEVA
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 25/12/17 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV (Danışman)
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

ÖZET

***N. BENTHAMIANA* BİTKİSİNDE AKTİF İNSAN FAKTÖR IX REKOMBİNANT PROTEİNİNİN VARYANTLARININ KLONLANMASI, EKSPRESYONU, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

İlaha MUSAYEVA

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

Aralık 2017, 33 sayfa

Yürütülen bu çalışmada, insan FIX geni kodon optimize edildi, klonlandı ve *N.benthamiana* bitkisinde yalnız veya modifiye edilmiş enzimler, VKD-GC ve Furin ile birlikte eksprese edildi. İlaven, bitki glikolizasyonunun bitkide üretilmiş FIX'nın aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki spesifik etkisini çalışmak için FIX, deglikolizasyon enzimleri olan PNGase F veya Endo H ile ko-eksprese edildi. Bitkide üretilmiş FIX varyantları IMAC kolon kullanılarak kısmen pürifiye edildi ve kıyaslamalı enzimatik aktiviteleri hesaplandı. Bitkide üretilmiş ve kısmen pürifiye edilmiş FIX varyantlarının aktivitesi kromogenik yöntemle belirlendi. Sonuçlar, bitkide üretilen FIX'nın insan FIX'a kıyasla %10 göreceli aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Buna rağmen, yalnız üretilen ve Furin veya VKD-GC ile ko-eksprese edilen FIX proteinlerinin aktiviteleri arasında küçük farklılık ya da herhangi bir farklılık gözlemleyemedik. Furin veya Furin ve VKD-GC ile birlikte ko-eksprese edilen FIX proteininin insan FIX proteinine kıyasla yaklaşık olarak %12'lik göreceli aktiviteye sahip olduğunu gözlemledik. İlaven, biz bitkide üretilen FIX'nın farklı varyantlarının aktivite ve stabilite analizini yaptık. FIX'nın Endo H ve PNGase F deglikolize varyantlarının insan FIX'a kıyasla göreceli aktiviteleri sırasıyla 13.6 ve 12.5'dir. FIX'nın bitkide üretilmiş glikozillenmiş ve *in vivo* deglikozillenmiş formlarının stabilitesi 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra belirlendi. Glikozillenmiş FIX'nın (%50'nin kalma süresi), PNGase F *in vivo* deglikozillenmiş ve Endo H *in vivo* deglikozillenmiş formlarının *in vitro* yarı ömrü Western blot analiziyle protein bantları analiz edilerek, sırasıyla 25.80, 37.99 ve 80.57 saat olarak hesaplandı. Bu sonuçlar FIX'nın bitkide üretilmiş Endo H *in vivo* deglikolize formunun glikolize FIX ve PNGase F *in vivo* deglikolize formuna kıyasla yüksek sıcaklıkta daha stabil olduğunu gösterdi.

ANAHTAR KELİMELE: Geçici gen anlatımı, Hemofilia B hastalığı, *in vivo* deglikolizasyon, Karboksilasyon, Proteolitik kesilme.

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Doç. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

ABSTRACT

CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FACTOR IX VARIANTS IN *N. BENTHAMIANA* PLANT

İlaha MUSAYEVA

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMMEDOV

December 2017, 33 pages

In this study, human FIX was codon optimized, cloned, and expressed in *N. benthamiana* plant alone or with modified enzymes, VKD-CG and Furin. In addition, to study the specific effect of plant glycosylation on stability and activity of plant produced FIX, FIX was also co-expressed with deglycosylating enzymes, PNGase F or Endo H. Plant produced FIX variants were then partially purified using IMAC column and their comparative enzymatic activities were performed. Activities of plant produced partially purified FIX variants were determined by chromogenic assay. The results showed that plant produced FIX possess about 10% relative activity to human FIX. However, we observed very little or no difference between FIX activities, produced alone or produced with co-expression with furin or VKD-GC. About 12% relative activity to human FIX was observed for plant produced FIX, produced with co-expression with furin or furin plus VKD-GC genes. In addition, we also performed a stability and activity analysis of different variants of plant produced FIX. The activities of Endo H and PNGase F deglycosylated FIX variants were 13,6 and 12,5% relative to human FIX, respectively. The stability of plant produced glycosylated and *in vivo* deglycosylated forms of FIX were examined after incubation at 37°C for 24 hours. *In vitro* half-life (time to 50% remaining) of glycosylated, PNGase F *in vivo* deglycosylated, and Endo H *in vivo* deglycosylated forms of FIX were calculated by analyzing protein bands on Western blot, which were 25.80, 37.99 and 80.57 hours respectively. These results demonstrate that the plant produced Endo H *in vivo* deglycosylated form of FIX appeared to be more stable compared to glycosylated FIX or PNGase F *in vivo* deglycosylated counterparts at elevated temperatures.

KEYWORDS: Carboxylation, Hemophilia B disease, *in vivo* deglycosylation, Proteolytic cleavage, Transient gene expression.

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Assoc. Dr. Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Hemofilia B hastalığında tedavi amaçlı kullanılabilecek rekombinant Faktör IX proteininin varyantlarının karakterizasyonu ve tanımlanması çalışmaları yürütülmüştür. Öncelikle tez konumun belirlenmesi aşamasından itibaren, yönlendirmeleri, laboratuvar deneyimlerini hiçbir zaman bizden esirgememesi ayrıca sabırlı ve titiz bir şekilde yardım etmesiyle, tezimin sonuçlanmasını sağlayan tez danışmanım Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım boyunca teknik olarak yardımlarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan, desteklerini hiç esirgemeyen Rıfat Üngör, Kader Çiçek ve Burcu Güleç'e teşekkürü borç bilirim. Bu zorlu süreçte tüm motivasyonumu bu kişilere borçluyum.

Uzun süreli çalışmalarım sırasında her kararında yanımda olup, özgür bir şekilde yaşamımı devam ettirmeme katkısı olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	2
2.1. Hemofilia B Hastalığı	2
2.2. Faktör IX Geni ve Post-Translasyonel Modifikasyonları.....	2
2.3. Hemofilia B Tedavi Yaklaşımları.....	7
2.4. Bitkide Rekombinant Protein Üretimi	7
2.5. N- ve O- Glikolizasyon Mekanizmaları	8
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1 Genlerin tasarlanması ve kodon optimizasyonu	11
3.2. Genlerin Klonlanması ve Birlikte Ekspresyonu.....	11
3.3. Rekombinant His6 Etikteli Faktör IX Varyant Proteinlerinin Saflaştırılması	12
3.4. SDS-PAGE ve İmmunoblotlama	13
3.5. Faktör IX Kromogenik Aktivite Ölçümleri.....	13
3.6. Faktör IX Varyantlarının Stabilitate Değerlendirilmesi.....	14
3.7. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	14
3.8. Kompetan Hücre Hazırlanması	18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	20
4.1. Faktör IX Geninin Klonlanması.....	20
4.2. Plazmidlerin Oluşturulması ve Proteinlerin Heterolog Ekspresyonu	20
4.2.1. Rekombinant FIX proteininin üretimi.....	20
4.2.2. Rekombinant FIX + Furin proteininin üretimi.....	22
4.2.3. Rekombinant FIX + Furin + VKD-GC proteininin üretimi	22

4.2.4. Rekombinant FIX + Endo H ve FIX + PNGase F proteinlerinin üretimi	23
4.3. Rekombinant His6 Etik特eli Faktör IX Varyant Proteinlerinin Saflaştırılması	24
4.4. Faktör IX Varyantlarının Stabilitte Değerlendirmesi	25
4.5. Faktör IX Varyantlarının Kromogenik Aktivite Değerlendirmesi	26
5. SONUÇ	28
6. KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*N. Benthamiana* bitkisinde aktif insan faktör IX rekombinant proteininin varyantlarının klonlanması, ekspresyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25/12/2017

İlaha MUSAYEVA



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A : Angström

dk : Dakika

g : Gram

kb : Kilobaz

kDa : Kilodalton

kg : Kilogram

l : Litre

ml : Mililitre

µg : Mikrogram

µl : Mikrolitre

Kısaltmalar

a.a	: Amino asit
Ala	: Alanin
Arg	: Arjinin
Asn	: Asparajin
Asp	: Aspartat
bp	: baz çifti
Ca ⁺²	: Kalsiyum
dpi	: İnfiltrason Sonrası Geçen Gün Sayısı
EGF1	: Epidermal Büyüme Faktörü 1
EGF2	: Epidermal Büyüme Faktörü 2
Endo H	: Endo-β-N-acetilglukozaminidaz H
ER	: Endoplazmik Retikulum
Fc	: Kristalize Olabilen Fragment
FV	: Faktör V
FVIIa	: Faktör VIIa
FVIII	: Faktör VIII
FIX	: Faktör IX
FIXa	: Faktör IXa
FX	: Faktör X
FXa	: Faktör Xa
His	: Histidin
Hyp	: Hidroksiprolin
vd	: ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Faktör IX olgun proteininin şematik gösterimi	3
Şekil 2.2. İnsan FIX proteininin domain yapısı ve amino asit dizisinin şematik gösterimi	3
Şekil 2.3. FIX proteininin Gla domaini	4
Şekil 2.4. FIX'nın yüzeyinde yerleşen Mg^{+2} ionlarının Ca^{+2} ionları ile yer değiştirmesi ve FIX'nın dört derecelik rotasyonu	5
Şekil 2.5. TF/FVIIa ile FIX kompleksi arasındaki etkileşimin çizimi	5
Şekil 2.6. Koagülasyonun mekanizması	6
Şekil 2.7. Bitki ve memeli glikoproteinlerinde yaygın olarak bulunan glikan yapı ve bağlarının çeşitleri (Gomord vd. 2004)	9
Şekil 2.8. Endo H ve PNGase F enzim kesimlerinin şematik gösterimi (Mamedov vd. 2017)	10
Şekil 3.1. Faktör IX kromogenik aktivite testinin temel prensibi	14
Şekil 4.1. FIX geninin jelden geri kazanımı	20
Şekil 4.2. pEAQ-FIX ve pEAQ-FIX'in AgeI ve XhoI kesim enzimleriyle kesimi	21
Şekil 4.3. pEAQ vektörü tarafından üretilmiş rekombinant FIX proteininin Western blot analizi	21
Şekil 4.4. FIX proteininin Furin enzimiyle proteolitik kesiminin Western blot analiziyle gösterilmesi	22
Şekil 4.5. FIX proteininin Endo H ve PNGase F enzimleriyle ko-ekspresyonunun Western blot analizi	23
Şekil 4.6. <i>N. Benthiana</i> bitkisinde üretilmiş rekombinant FIX, Furin ile ko-eksprese edilmiş FIX, Furin ve VKD-GC ile ko-eksprese edilmiş FIX proteinlerinin IMAC kolon pürifikasyonu sonrası Western blot analizi	24
Şekil 4.7. <i>N. Benthiana</i> bitkisinde üretilmiş rekombinant FIX, Furin ile ko-eksprese edilmiş FIX, Furin ve VKD-GC ile ko-eksprese edilmiş FIX proteinlerinin IMAC kolon pürifikasyonu sonrası Western blot analizi	25
Şekil 4.8. Glikozillenmiş ve deglikozillenmiş FIX varyant proteinlerinin Western blot analizi	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. FIX genine ait ekzonların şematik gösterimi	2
Çizelge 2.2. Olgun FIX proteininin önemli bölgeleri	2
Çizelge 4.1. Saflaştırılmış FIX, FIX + Endo H ve FIX + PNGase F proteinlerinin stabilite değerlendirilmesi	26
Çizelge 4.2. FIX varyant proteinlerinin insan FIX proteinine göre göreceli aktivite yüzdesi	27



1. GİRİŞ

Hemofilia B hastalığı, kan koagülasyonunda önemli role sahip pıhtılaşma faktörü olan Faktör IX proteininin eksikliği durumunda ortaya çıkan X-kromozumuna bağımlı hastalıktır. Hemofilia B pıhtılaşmanın normal olarak gerçekleşmediği ve hastalık insidansının 1/30000 olduğu kanama hastalığıdır. Eskiden koagülasyon hastalıkları kan veya taze donmuş plazmanın yer değiştirilmesi yoluyla tedavi ediliyorken, artık hemofilia hastaları daha güvenli tedavi yöntemi olan yarı ömrü uzun olan rekombinant proteinlerin kana enjekte edilmesiyle tedavi edilmektedir. Hemofilia B tedavisinde kullanılacak rekombinant proteinlerin yarı ömrünün uzun olmasının istenme nedeni, kanda uzun süre parçalanmadan proteini tutabilmek ve buna bağlı olarak enjeksiyon süresini minimize ederek hastanın yaşam kalitesini yükseltmektir. Şu anda hemofilia B hastaları ya insan kanından elde edilen plazmadaki FIX'nın elde edilmesi ya da fare ovaryum hücrelerinde (CHO) üretilen rekombinant FIX ile tedavi edilmektedir. Buna rağmen bazı FIX preparatları oldukça pahalıdır ve eldesi de çok zordur.

Rekombinant Faktör IX protein üretimi için çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. Son zamanlarda insana ait rekombinant proteinlerin doğal formuna en yakın şekilde katlanabilmesi için ökaryotik anlatım sistemi olan bitkiler kullanılmaktadır. Proteinin üç boyutlu yapısı tam korunmasa da bu yapısına en yakın formda katlanabilmesi için geçirmesi gereken bazı post-translasyonel modifikasyonlar sağlanmalıdır. Şimdiye kadar rekombinant FIX üretimi için kullanılan farklı ekspresyon sistemleri post-translasyonel modifikasyonlar, güvenlik ve yüksek maliyet nedeniyle kısıtlamalara maruz kalmıştır. Hala hemofilia B tedavisi için güvenli ve düşük maliyetli terapötik protein üretimine acil olarak gereksinim vardır. Bitkiler alternatif ekspresyon sistemi olarak kullanılmaya başlanmış ve hedef proteinlerin üretimi için endüstri ve akademi tarafından geniş ölçekte kullanılmaktadır. Bitkiler diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla ökaryotik post-translasyonel mekanizmasına ve bir haftadan kısa bir süre zarfında biomasın kg başına yüzlerce mg değerinde hedef protein biriktirebilme yeteneğine sahip olması açısından daha avantajlıdır.

Faktör IX proteininin geçirdiği modifikasyonlar (γ -karboksilasyon, β -hidroksilasyon, N-bağı glikolizasyon, O-bağı glikolizasyon, sülfasyon, fosforilasyon, sinyal ve propeptid dizilerinin uzaklaştırılması) en kompleks protein olgunlaşma sürecidir. Şimdiye kadar γ -karboksilasyon ve propeptidin kesilip uzaklaştırılması gibi FIX'nın biyolojik aktivitesi için önemli olan modifikasyonların bitki ekspresyon sisteminde sağlanabilmesi daha önce gerçekleştirilemedi. Bu çalışmada, Faktör IX proteininin γ -karboksilasyon, N-bağı glikolizasyon, sinyal ve propeptid dizilerinin uzaklaştırılması modifikasyonlarını geçirmesi sağlanmıştır. Yürütülen bu çalışmada, insan FIX geni *N.benthamiana* bitkisinde yalnız veya modifiye edilmiş enzimler, VKD-GC ve Furin ile birlikte eksprese edildi. İlaveten, bitkiye spesifik glikolizasyonun bitkide üretilmiş FIX'nın aktivitesi ve stabilitesi üzerindeki etkisini çalışmak için FIX, deglikolizasyon enzimleri olan PNGase F veya Endo H ile ko-eksprese edildi.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Hemofilia B Hastalığı

Hemofilia yumuşak dokuları, eklemleri ve kasları etkileyen kanama hastalığıdır (Peyvandi 2016). Hemofilia B hastalığı, koagülasyon kaskadında önemli role sahip olan Faktör IX proteininin eksik üretilmesiyle bağlantılı olarak ortaya çıkan X kromozumuna bağlı kalıtsal kanama hastalığıdır. Hemofilia B plazma Faktör IX aktivitesini baz alarak şiddetli (1%), orta (1%–5%) veya hafif (5%–40%) fenotip göstermektedir (Nazeef, Sheehan 2016). Şiddetli fenotip, kas ve eklemlerde spontan ve tekrarlayan kanama epizodları ile; orta fenotip, sık-sık spontan kanama ile; hafif fenotip ise nadiren beliren spontan kanama ile karakterize edilmektedir. Hemofilia B hastalığının görülme sıklığı 1/30000 canlı doğumdur.

2.2. Faktör IX Geni ve Post Translasyonel Modifikasyonları

FIX kan koagülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Çünkü aktivitesinin yokluğu veya eksikliği X kromozumuna bağlı kalıtsal kanama hastalığı olan Hemofilia B hastalığına neden olmaktadır. FIX geni 8 ekzon ve 7 introndan oluşuyor ve 34 kb uzunluğundadır.

Çizelge 2.1. FIX genine ait ekzonların şematik gösterimi

	I		II		III		IV		V		VI		VII		VIII		
--	---	--	----	--	-----	--	----	--	---	--	----	--	-----	--	------	--	--

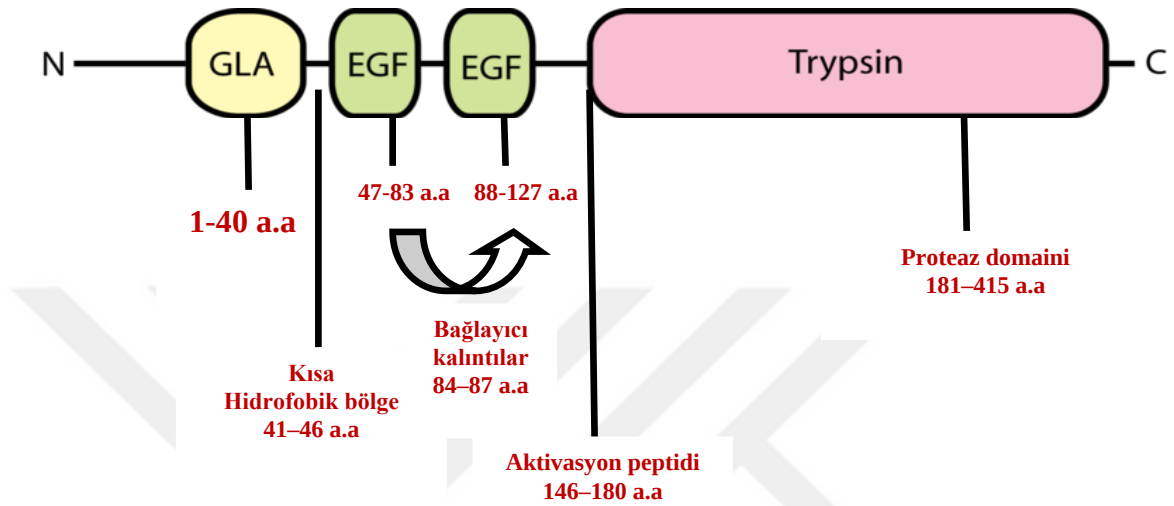
Ekzon I: FIX proteinini ER lümenine hedefleyecek hidrofobik sinyal peptidini; Ekzon II: Propeptid ve Gla domainini; Ekzon III: FIX proteinini lipid membrana bağlayacak hidrofobik heliksi; Ekzon IV ve V: EGF1 ve EGF2 domainlerini; Ekzon VI-VIII: Serin proteaz bölgesini kodluyor.

Çizelge 2.2. Olgun FIX proteininin önemli bölgeleri

Kalsiyum bağlama bölgeleri	47, 48, 53, 54, 61, 63, 66, 67, 72, 73, 76, 82, 86, 93, 94, 96, 110, 111, 281, 283, 286, 288, 291 a.a
Kalsiyum veya Magnezyum bağlama bölgeleri	82, 86 a.a
Şarj geçiş sistemi	267, 315, 411 a.a

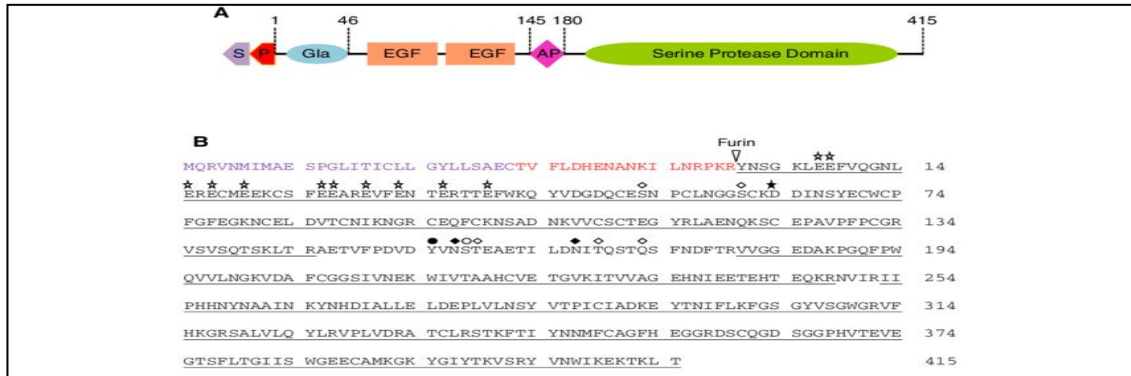
Koagülasyon faktörlerinin olgun protein olabilmeleri için post-translasyonel endoproteolitik işleme süreçlerine gereksinimleri vardır. Koagülasyon Faktör IX, 28-kalıntıdan oluşan sinyal prepeptid ve 18-kalıntıdan oluşan öncü propeptid içeren 461 a.a uzunluğunda öncü molekül olarak sentezlenen vitamin K-bağımlı glikoproteindir. Bu protein sinyal peptid ve propeptidin kesilmesi, disülfid bağın oluşması, ilk 12 glutamik asit kalıntısının γ -karboksilasyonu, Asp 64'ün kısmi β -hidroksilasyonu, Asn 157 ve Asn

167'nin N-bağlı glikozilasyonu, Ser 63, Ser 61, Thr 159;169;172 ve 179'un O-bağlı glikolizasyonu, Tyr 155'in sülfasyonu ve Ser 158'in fosforilasyonu, sinyal ve propeptid dizilerinin uzaklaştırılması dahil post-translasyonel modifikasyonlara maruz kalıyor (Furie vd. 1988; Kaufman vd. 1998). Bu şimdiye kadar gözlenen en kompleks terapötik protein olgunlaşmasıdır. Olgun FIX proteinini ağırlığının yaklaşık olarak % 17'si kadar karbohidrat taşıyan 415 a.a'ten oluşan, 57 kDa ağırlığa sahip tek zincirli kan proteinidir (Di Scipio vd. 1978).



Şekil 2.1. Faktör IX olgun proteininin şematik gösterimi.

FIX iki tane epidermal büyüme faktörü (EGF)-benzeri domain ve C-terminal serin proteaz domainini takip eden N-terminal γ -karboksiglutamik asitten oluşuyor.



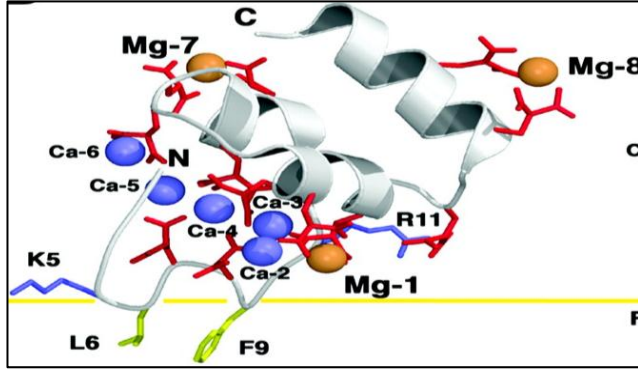
Şekil 2.2. İnsan FIX proteininin domain yapısı ve amino asit dizisinin şematik gösterimi. Sinyal peptid (S) ve propeptid (P) olgun FIX proteininden kesilip atılıyor. γ -karboksiglutamik asit: 66, 67, 74, 76, 79, 85, 86, 89, 92, 95, 99; β -hidroksilasyon: 164; O-bağlı glikolizasyon: 53, 61, 159, 169, 172; N-bağlı glikolizasyon: 157, 159; Sülfasyon: 155; Fosforilasyon: 158 (Liu vd. 2014).

Koagülasyon faktörlerinin olgun protein olabilmeleri için post-translasyonel endoproteolitik işleme süreçlerine gereksinimleri vardır. FIX proteininin olgunlaşma sürecinde endojen furin ile proteolitik olarak kesilmesi gerekmektedir. İnsan furininin

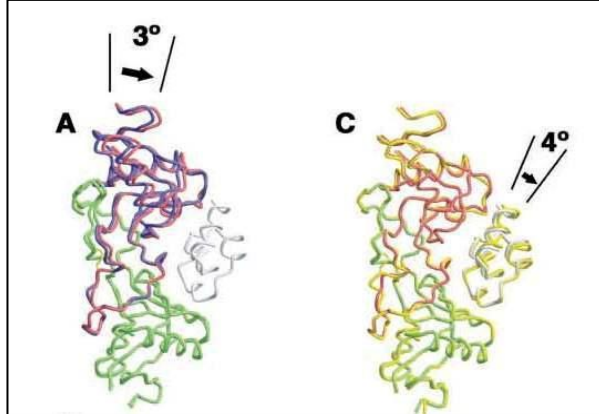
ilk translasyon ürünü 794 amino asit uzunluğundadır ve bir propeptid ve olgun proteinden oluşuyor. Molekölün C-ucuna oldukça yakın trans-membran domain olarak isimlendirilen trans golgi ağına demirlenmiş sistein zengin bölge olan, 'P' veya 'orta' domainin yanında yerleşen olgun furin proteininin katalitik domaini N-uçta yerleşiyor. Furinin C-terminal sitozolik kuyruğu furin moleküllerinin trans golgi ağı, endozomal bileşikler ve hücre yüzeyi arasındaki taşınmasından sorumludur. Furin, trans golgi ağına trans-membran domaini vasıtasıyla demirlenmiştir (Jones vd. 1995; Chapman vd. 1994; Takahashi vd. 1995; Molloy vd. 1994; Schafer vd. 1995).

Bir diğer önemli post-translasyonel değişim γ -karboksilasyondur. Koagülasyon proteinleri olan faktör II, VII, IX ve X, protein C ve protein S karaciğerde sentezleniyor ve vitamin K-bağımlı γ -karboksilaz enzimi tarafından post-translasyonel modifikasyona maruz kalıyor. Bu enzim proteinin amino ucunda yerleşen 9-12 glutamik asit kalıntısını γ -karboksiglutamik asit kalıntısına dönüştürüyor.

FIX proteininin Gla domaini 10-13 gamma-karboksiglutamik asit kalıntısından oluşuyor ve aktif üç boyutlu konformasyonunun stabilizasyonu ve membran birleşmesi için Ca^{+2} ve Mg^{+2} ionlarının her ikisine de gereksinim duyuyor. Gla domaini bazı orta ve düşük düzeyde afiniteli Ca^{+2} bağlama bölgesine sahiptir (Amphlett vd. 1981). EGF1 ve proteaz domaini ise yüksek afiniteli Ca^{+2} bağlama bölgesine sahiptir (Rao vd. 1995). Bu domainlere Ca^{+2} 'nin bağlanması FIX'nın biyolojik özelliklerine katkı sağlıyor (Freedman vd. 1995). Metal ionlarının yokluğunda Gla domaininin yapısı yüksek derecede bozuluyor, bu da metal ionlarının yapısal stabilizasyon için önemli olduğunun kanıtıdır. Kalsiyum ionlarının varlığında Gla domaini (kalsiyum ionları 5 ve 6; Gla kalıntıları 17 ve 21) fosfolipid membran üzerindeki fosfotidilserinin serin grubu ile etkileşime geçiyor (Mingdong vd. 2004).

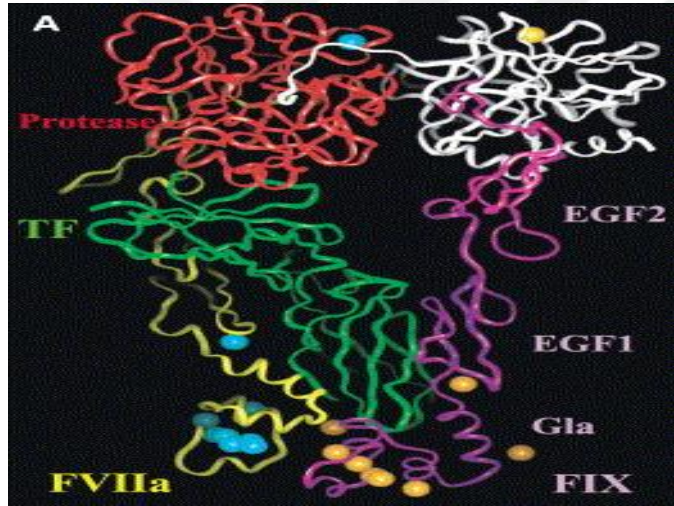


Şekil 2.3. FIX proteininin Gla domaini: FIX'nın yüzeyinde yerleşen üç tane Mg^{+2} (Mg^{-1} , Mg^{-7} , and Mg^{-8}) ionlarının her biri su molekülleri ile bipiramidal koordinasyona sahiptir. Mg^{+2} serbest koşullarda Mg^{-1} , Mg^{-7} ve Mg^{-8} ionları Ca^{+2} ionları ile yer değiştirerek ion ve oksijen atomu arasındaki bağ 2.11'den 2.34 Å'a uzuyor. Mesafedeki küçük değişiklik FIX'nın dört derecelik rotasyonuna neden oluyor (Yasuo vd. 2003).

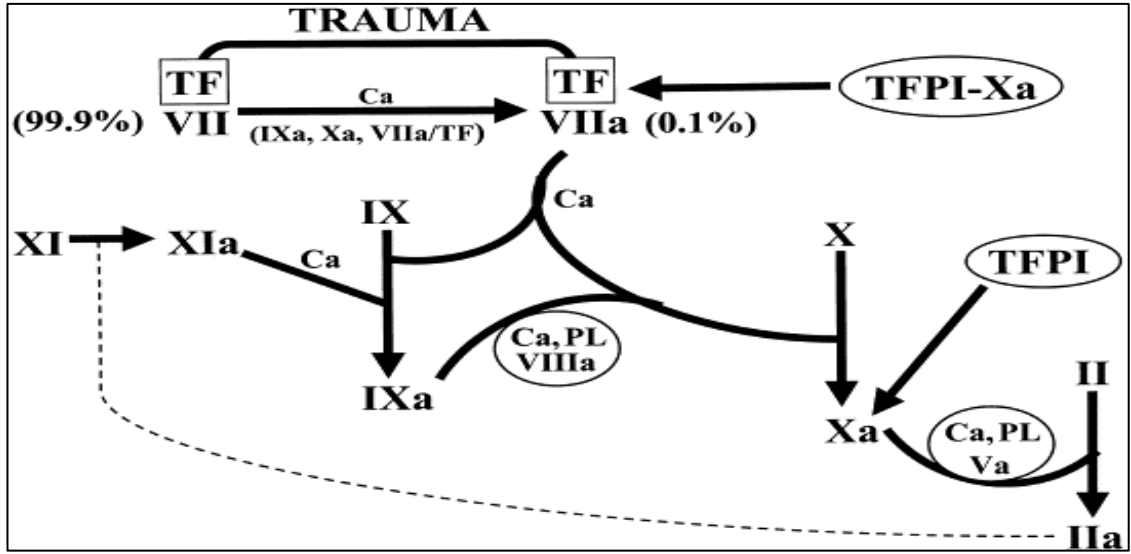


Şekil 2.4. FIX'nın yüzeyinde yerleşen Mg^{+2} ionlarının Ca^{+2} ionları ile yer değiştirmesi ve FIX'nin dört derecelik rotasyonu.

Fizyolojik koagülasyon sırasında FIX'nin aktivatörlerinden bir tanesi FVIIa/doku faktörü (TF) kompleksidir. Bu reaksiyonda Gla ve EGF1 domainleri TF ile etkileşime geçiyor.



Şekil 2.5. TF/FVIIa ile FIX kompleksi arasındaki etkileşimin çizimi: TF (sitoplazmik kuyruğu yok)-yeşil; FVIIa'nın ağır zinciri (proteaz domain)-kırmızı; hafif zincir (Gla, EGF1, EGF2)-sarı; FIX'nın ağır zinciri (proteaz domain)-beyaz; hafif zincir (Gla, EGF1, EGF2)-mor renkle gösterilmiştir. FVIIa'a bağlanmış Ca^{+2} ionları yeşilimsi-mavi renkte; FIX'a bağlı olanlar ise turuncu renkte gösterilmiştir. Bu modele (Chen vd. 2002) göre FIX'nın Gla ve EGF1 domainlerinin ikisi de TF'e bağlanıyor. FIX'nın aktivasyon peptid segmenti FVIIa'nın aktif bölgesindeki proteoliz reaksiyonu için hazırdır. FIXa; platelet yüzeyinde FVIIa ile FIX birleştiğinde oluşuyor ve daha sonra koagülasyon kaskadında FIX'ı aktivite ederek FIXa'a dönüştürüyor. Bu birleşmede EGF2 ve FIXa FVIIa'a bağlanma spesifitesi gösteriyor (Amy vd. 2003). Koagülasyonun başlamasında yer alan önemli proteinler: TF, FVIIa, FIX ve FX (Hockin vd. 2002).



Şekil 2.6. Koagülasyonun mekanizması: Koagülasyon kanın TF'e maruz kalmasıyla başlıyor ve TF ve FVII/FVIIa arasında Ca^{+2} bağımlı kompleks oluşuyor. Bu kompleks FX'ı aktive ediyor. Başlangıç FX, TF/FVIIa kompleksi sayesinde direkt olarak aktive edilerek oluşuyor ve bu sayede küçük trombin molekülleri oluşarak FXa ve FIXa'nın platelet yüzeyinde birleşmesini sağlayan FVIII ve FV'nin aktivasyonuna neden oluyorlar (Hoffman vd. 1995). FX'nın direkt aktivasyonu TFPI tarafından hızlıca durduruluyor ve FXa'nın dolaylı yoldan oluşumu FIX aracılığıyla gerçekleşiyor ve bu süreç etkili koagülasyonun devamlılığı için önemlidir (Bajaj vd. 2001). (Ca, kalsiyum; F, faktör; PL, platelet fosfolipit membran; II, protrombin; IIa, trombin; TF, doku faktörü; TFPI, doku faktör yolak inhibitörü) (Amy vd. 2003).

FIX proteininin aktivasyon süreci FIX'da Arg145-Ala146 ve Arg180-Val181 bağlarının proteolitik kesilmesi ve bunun sonucu olarak 35 amino asitten oluşan aktivasyon peptidinin ayrılmasından ibarettir (Di Scipio vd. 1978). Oluşan FIXa N-terminal 18 kDa hafif zincir (1-145 a.a), C-terminal 28 kDa ağır zincir (181-415 a.a) ve onları bir arada tutan tekli disülfid bağından oluşmaktadır. Hafif zincir Gla, EGF1 ve EGF2 domainlerinden oluşuyorken, ağır zincir katalitik triad özelliği gösteren Ser-365, His-221 ve Asp-269 amino asitlerinden oluşan serin proteaz domainini içeriyor. Gla ve EGF1 domainlerinin ikisi de FIX/TF/FVIIa üçlü kompleksinin oluşumu sırasında FIX'nın TF'ye bağlanmasında yer alıyor.

Arg-145'teki kesilmenin fizyolojik önemi FIXa ve onun önemli kofaktörü olan FVIIIa arasındaki bağlanma afinitesinin artmasıyla ilişkilidir (Lenting vd. 1995). Arg-145'teki hidroliz aktif bölge Ser-365'i çevreleyen katalitik bölgenin gelişimi için önemli olan yapısal olarak yeniden düzenlenmeye neden oluyor (Lawson vd. 1991). FIXa'nın EGF1 domainine Ca^{+2} bağlanması, FVIIIa ile optimal etkileşimi sağlamak için platelet yüzeyi üzerindeki proteaz ve EGF2 domainlerinin doğru şekilde yerleşimine neden olan yapısal elementler sağlıyor (Mathur vd. 1997).

Sonuç olarak, insan Faktör IX proteini tek zincir glikoproteini olarak kanda sirküle oluyor. *İn vitro* aktivasyonla Faktör IX disülfid bağlı ağır ve hafif zincir ve aktivasyon peptidi olarak parçalanıyor. İnsan Faktör IX proteini koagülasyon mekanizmasının iç yolağında yer alan 57 kDa moleküler ağırlığa sahip tek zincir

glikoproteinidir ve yolakta kalsiyum gerektiren reaksiyon olan aktive olmuş Faktör XI (Faktör XIa) vasıtasıyla aktive oluyor. Faktör XIa ile aktivasyon süresince aktif enzim olan Faktör IXa oluşuyor. Faktör IXa disülfid bağlı ağır ve hafif zincir ve disülfid bağlı olmayan karbohidrat zengin aktivasyon peptidinden oluşuyor (David vd. 1984).

2.3. Hemofilia B Tedavi Yaklaşımları

Kan hastalıklarının tedavisinde önemli olan rekombinant kan proteinlerinin vücut dolaşımında yarı ömrünü uzatmaktır.

Polietilen glikol (PEG) polimerlerinin terapötik ajanlara serbest sistein kalıntıları üzerinden kovalent olarak bağlanması rekombinant FIX proteininin yarı ömrünü uzatmakta umut vaat edici yaklaşımlardan birisi olmuştur (Coyle vd. 2014; Tiede vd. 2013; Negrier vd. 2011). Diğer metot ise IgG'nin kristalize edilebilir fragmentinin füzyonudur. 2014'te Fc füzyon teknolojisini kullanarak üretilen Alproliks FDA tarafından Hemofilia B hastalığının tedavisinde kullanılmak üzere onaylanan ilk biyolojik olarak tasarlanmış rekombinant FIX'dır (Peyvandi vd. 2016). Albümin füzyon teknolojisi, rekombinant FIX'nın yarı ömrünün uzatılmasında kullanılan bir diğer yöntemdir. Albümin insan plazmasında en bol bulunan proteindir ve yarı ömrünün uzunluğu ~3 haftadır (Powell vd. 2013). FIX ile albüminin birleşmesiyle oluşan yeni rekombinant füzyon proteini (rIX-FP, Idelvion) 5 kat gelişme gösterdi yani, yarı ömrü 92 saat oldu. rIX-FP proteini markete sunulan FIX ürünlerinden farmakokinetik profil olarak gelişme gösterdi (Powell vd. 2014). Faz III çalışmaları rIX-FP hemofilia B hastalarında kanamanın tedavi edilmesi ve önlenmesi için güvenli ve etkilidir (Santagostino vd. 2012; Martinowitz vd. 2015).

Diğer önemli tedavi yaklaşımlarından birisi de insan FIX proteininin rekombinant ekspresyon sistemlerinde üretilmesidir. Şimdiye kadar üretim memeli hücre kültüründe denenmiş ve başarılı olunmuştur. Ancak diğer ekspresyon sistemlerinden daha çok avantaja sahip olan ekspresyon sistemi bitkilerdir. Bu çalışmanın özgünlüğü insan FIX proteininin bitki ekspresyon sisteminde üretilmeye çalışılmasıdır.

2.4. Bitkide Rekombinant Protein Üretimi

Bitkiler üretim sistemleri olarak hayvan patojenlerinin kontaminasyonu bakımından güvenilir olmaları, yüksek üretim kapasitesi ve nispeten düşük yatırım gerektirmesi gibi bazı avantajlara sahiptir. Bugüne kadar rekombinant proteinlerin bitkilerde üretimi için nükleer transformasyon, kloroplast transformasyonu ve bitki RNA viral vektörleri ile enfeksiyon yöntemleri kullanılıyordu. Bu yöntemle üretilen proteinler hayvan modellerinde test edildiğinde bazı bitkide üretilen antijenlerin koruma için hücrel immün yanıtının gerçekleşmesi oldukça zordu.

Bitki temelli geçici ekspresyon sistemi aşı antijenleri, terapötik proteinler, antibodiler ve endüstriyel enzimler dahil çeşitli rekombinant proteinlerin üretimi için umut vaat edici teknolojidir. Bu sistemler diğer ekspresyon sistemlerine kıyasla üstün yararlar sunmaktadır; hızlı üretim çizelgesi, düşük maliyet girdisi, yüksek ölçeklenebilirlik, yüksek üretim kapasitesi ve hiçbir memeli patojenlerini içermemeleri.

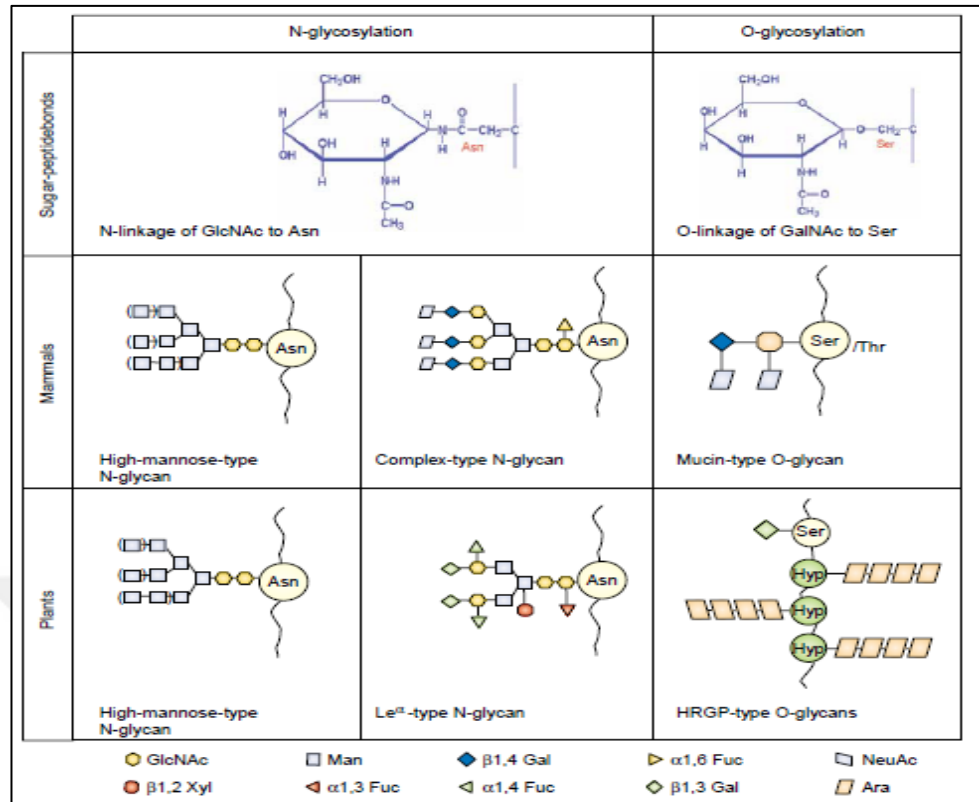
İlaveten bitkiler N-glikolizasyonun işlevsel aktiviteleri için önemli olduğu memeli proteinleri dahil çoğu glikozillenmiş proteinlerin ekspresyonu için yararlı bir teknik olan N-bağlı glikolizasyon gibi ökaryotik post-translasyonel modifikasyonlara sahiptir. Hedef proteinin bitkide üretilmesi iki temel stratejiyle gerçekleşiyor; transgenik ve transient ekspresyon. Transgenik sistemde, hedef gen bitki nükleer genomuna veya kloroplast genomuna birleşiyor (Daniell 2006; Franken vd. 1997). Transient ekspresyon sisteminde ise, hedef geni taşıyan genetik olarak tasarlanmış bitki virüsleri bitkiye dahil oluyor ve rekombinant protein bitki konak genomuna dahil olmadan eksprese oluyor. Transient ekspresyon stabil transformasyona kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir; zaman açısından verimli olması, hedef proteinin yüksek ekspresyonu, sistemin ölçeklenebilir ve istikrarlı olması, daha az çevresel hasarla üretim olanağı (Yusibov vd. 2010).

2.5. N- ve O- Glikolizasyon Mekanizmaları

Genellikle çoğu terapötik protein bioaktiviteleri, farmakokinetikleri, stabiliteleri ve çözünürlükleri için en azından proteolitik kesilme ve glikolizasyona gereksinim duyuyor.

Çoğu bitki proteini salgı yollarında preprotein olarak sentezleniyor. Diğer ökaryotik hücrelerde olduğu gibi bitki hücresinde de proteinler salgı yollarına amino terminal sinyal peptidiyle yönlendiriliyor. Sinyal peptidleri kesildikten sonra proteinler ER lümenine salınıyor. Artık protein doğru bir şekilde katlanabiliyor veya birleşebiliyor. Çoğu protein ER lümenini proprotein olarak terk ediyor ve proprotein proteinin salgı yolağında proteolitik olgunlaşması sırasında kaybolacak polipeptidler içeriyor. Karbohidratların polipeptid zincire bağlanması proteinin termal denatürasyona dayanıklılık, proteolitik parçalanmadan korunması ve çözünürlüğü gibi fizikokimyasal özelliklerini kuvvetli bir şekilde etkiliyor (Gomord vd. 2004). Aynı zamanda proteinin immünogenetik özelliği, spesifik aktivitesi ve ligand-reseptör etkileşimi gibi önemli biyolojik işlevlerini de değiştirebiliyor. Glikoprotein salgı yolağı boyunca taşınırken Asparajine N-bağlı oligosakkarit, ER ve Golgi cisimciğinde şeker ilavesi veya kesilme süreçlerini içeren bazı protein olgunlaşma reaksiyonlarına maruz kalıyor. Bitki ve memeli N-glikan olgunlaşmalarındaki temel farklılık; memelilerde Golgi cisimciğinde α (1,6)-bağlı fukoz kalıntıları ve terminal sialik asit oluşurken, bitkilerde β (1,2) ksiloz ve α (1,3) fukoz dallanması oluşuyor. N-bağlı glikolizasyon bazı ökaryotik proteinlerin katlanması için önemli değişimdir.

Swiss-Prot veribankasında biofarmasötik olarak kabul edilen ökaryotik proteinlerin %50'den çoğu glikoproteinlerdir (Apweiler vd. 1999). Karbohidratların proteinlere bağlanması iki farklı kategoride sınıflandırılıyor: N-Glikanlar, protein zincirinde Asn'nin amid grubuna bağlanır ve O-Glikanlar, Ser, Thr, hidroksilizin veya hidroksiprolin (Hyp) kalıntılarına bağlanıyor. N-glikolizasyon lipid-bağlı oligosakkaritlerin yeni oluşmuş polipeptidlere eş-translasyon veya translasyon sonrası transferi olacak şekilde endoplazmik retikulumda (ER) gerçekleşiyor. O-Glikanlar endoplazmik retikulum (ER) ve golgi cisimciğinde katlanmış proteinlere monosakkaritlerin transferi aşamasında sentezleniyorlar. Antibodiler, kan proteinleri ve interferonlar gibi çoğu terapötik glikoproteinlerin biyolojik aktivitesi onların glikolizasyon durumuna bağlıdır ve bu neden biofarmasötiklerin heterolog ekspresyon sisteminde glikolizasyon yetenekleriyle birlikte üretilmesi durumunu açıklıyor (Gomord vd. 2004).



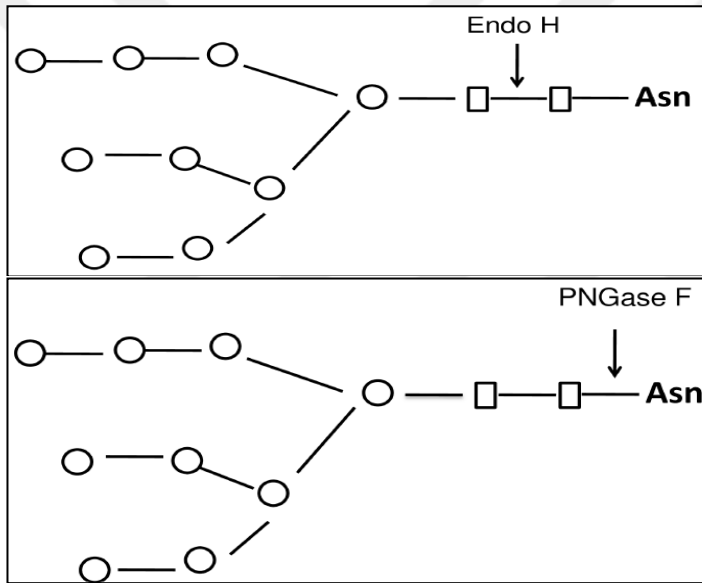
Şekil 2.7. Bitki ve memeli glikoproteinlerinde yaygın olarak bulunan glikan yapı ve bağlarının çeşitleri (Gomord vd. 2004).

Memeli glikoproteinleri transgenik bitkilerde eksprese olduklarında glikozilleniyorlar. Bitkiler insan kaynaklı biofarmasötiklerin glikolizasyonunda yetersizdir. Bu nedenle son dönemlerde insan kaynaklı biofarmasötiklerin bitkide üretimi zamanı N-glikolizasyon noktalarında optimizasyon ile değişim yapıyor. Bitkilerde N-glikolizasyonun dizaynı sırasında farklı stratejiler uygulanabiliyor. En mantıklı strateji immunojenik glikanların bitkide üretilecek farmasötiklere ilavesini engellemektir. Bunun için protein ER içerisinde depolanmalı ve immunojenik glikopeptidlerin eklendiği, Golgi sisternasına geçişi engellenmelidir. Bu nedenle proteinin karboksi terminaline KDEL dizisi ekleniyor. Bu sayede proteinin immunojenik aktvitesini düşürecek yüksek mannoz tipi N-glikanların proteine eklenmesi engellenmiş olacaktır. Bir diğer önemli strateji ise Golgi glikozil transferazların inhibisyonudur. α (1,3)-fukoziltransferaz ve β (1,2)-ksiloziltransferazların genlerinin susturulması proteinin bitkiye spesifik glikoepitoplar olmadan üretimini sağlıyor (Koprinovova vd. 2003). Bir diğer cazip strateji ise bitkilerde bitki N-glikanlarını memeli glikoziltransferazlarını eksprese edecek şekilde tasarlamaktır. Heterolog glikoziltransferazların etkili bir şekilde ekspresyonu Golgide insan β (1,4)-galaktoziltransferazın katalitik domainine *Arabidopsis Thaliana* β (1,2)-ksiloziltransferazın hedeflenmesinden sorumlu dizinin füzyonu ile başarılmıştır (Bakker vd. 2003).

Hedef proteinlerin doğal dizilerini, konformasyonlarını ve biyolojik aktivitelerini koruyorken, onları bitkilerde glikolize olmayan formda üretmek için önemli stratejilerden bir tanesi bu proteinleri bakteriyal peptid-N-glikozidaz F (PNGase

F) ve Endo- β -N-asetilglukozaminidaz (EC3.2.1.96, Endo H) enzimleri ile enzimatik deglikolizasyona uğratmaktadır.

Endo- β -N-asetilglukozaminidaz H (Endo H, EC 3.2.1.96) *Streptomyces plicatus* ve bazı diğer *Streptomyces* türlerinden salgılanan glikohidrolazdır (Tarentino vd. 1976). Bu enzim oligosakkaritlerin N-asetilglukozamin çekirdeklerinin β -1,4-glikozidik bağı kırarak kesiyor ve glikoprotein asparajin kalıntısına bağlı bir N-asetilçitobiozu uzaklaştırıyor (Trimble vd. 1978; Muramatsu 1971). Enzim yalnızca hibrid ve yüksek mannoz tipli N-glikan yan zincirlerini uzaklaştırabiliyor (Maley vd. 1989). Endo H glikoproteinlerin ve onların öncü moleküllerinin işlev ve yapılarının araştırılması için mükemmel bir araçtır. Bir glikoproteinin Endo H enzimine olan hassaslığı o molekülün veya molekülün fonksiyonel gruplarının glikan içeriğinin belirlenmesine yardımcı olur (Frisch vd. 2013). Glikopeptidaz F (PNGase F) ve Endo H gibi glikohidrolazlar glikoproteinlerden N-glikan yan zincirlerini uzaklaştırıyor (Lisowska vd. 2012).



Şekil 2.8. Endo H ve PNGase F enzim kesimlerinin şematik gösterimi. PNGase F (*in vivo* veya *in vitro* deglikolizasyon) deglikolize proteinin glikolizasyon bölgesinde (N-X-S/T) asparajinin aspartata deamidasyonu nedeniyle amino asit değişimine neden oluyor. Endo- β -N-asetilglukozaminidaz H (EC 3.2.1.96, Endo H) deamidasyona neden olmaksızın asparajine bağlı tek N-asetil-D-glukozamin kalıntısını (GlcNAc) uzaklaştırıyor. Bu enzim hem yüksek mannoz hem de hibrid N-glikanları kesebiliyor buna rağmen asparajin bağlı glikoproteinlerden kompleks N-bağlı glikanları kesemiyor (Mamedov vd. 2017).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Genlerin Tasarlanması ve Kodon Optimizasyonu

Endo H geni *N.benthamiana* bitkisinde anlatımı yapılacak şekilde kodon optimizasyonu ile tasarlandı ve GENEART AG (Thermo Fisher Scientific) şirketi tarafından sentezlendi. *N.Benthamiana* bitkisinde anlatım yapabilmesi için Endo H geninin sinyal peptid dizisi (1-42 a.a) *Nicotiana tabacum* N-terminal tütün patogeneziyle ilişkili protein 1a (PR-1a) sinyal peptid (MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA, protein sekresyonu süresince kesiliyor) dizisi ile yer değiştirildi. İlaveten C-terminal FLAG epitopu kodlama dizisi (DYKDDDDK) ve endoplazmik retikulum tutum sinyali olan KDEL içeriyor. PNGase F *N.benthamiana* bitkisinde anlatımı yapılacak şekilde kodon optimizasyonu ile tasarlandı ve Integrated DNA Technologies (IDT) şirketi tarafından sentezlendi. *N.benthamiana* bitkisinde üretilmek için optimize edilen gen bölgeleri ilaveten C-terminal FLAG epitopu kodlama dizisi (DYKDDDDK) ve endoplazmik retikulum tutum sinyali olan KDEL içeriyor. Furin geni *N.benthamiana* bitkisinde anlatımı yapılacak şekilde kodon optimizasyonu ile tasarlandı ve satın alındı. FIX geni *N.benthamiana* bitkisinde anlatımı yapılacak şekilde kodon optimizasyonu ile tasarlandı ve sentezlendi. *N.benthamiana* bitkisinde üretilmek için optimize edilen gen bölgeleri N-terminal tütün patogeneziyle ilişkili protein 1a sinyal dizisi (MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA, protein sekresyonu süresince kesiliyor) ve C-terminal çoklu histidin afinite pürifikasyon etiketi (6xHIS-CAT CAC CAT CAC CAC CAT) ve endoplazmik retikulum tutunma sinyali olan KDEL dizisi içeriyor.

3.2. Genlerin Klonlanması ve Birlikte Ekspresyonu

Genleri uçlarında AgeI/XhoI kesim bölgelerini içerecek şekilde taşıyan plazmid vektörleri satın alındı. Plazmid vektörler içinde korunan kalıp DNA'lar, uygun restriksiyon enzimleri yardımıyla kesilip çıkarıldı. Kalıp DNA fragmentleri, %1'lik agaroz jellerde yürütülüp plazmid vektörden ayrıştırıldıktan sonra jelden uygun kitler kullanılarak izole edildi. Gen bölgeleri aynı kesim bölgelerine sahip olacak şekilde sentezlenmiş uygun ekspresyon vektörlerine klonlandı. FIX poretininin Endo H, PNGase F, Furin ve VKD-GC genleri ile uygun oranlarda ko-ekspresyonu sağlanıp *in vivo* ortamda üretimleri sağlandı. FIX genini satın alınan vektörden uzaklaştırmak için, 40µL örnek üzerine 8 µL yükleme boyası (Thermo Scientific 6x, Katalog No: R0611) eklendi. GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific) ile birlikte jele yüklenerek 110V 1.5 saat yürütülerek 1.8 kb boyutundaki bant bistüri yardımıyla jelden kesilerek, üretici firmanın (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, Katalog No: D4007) önermiş olduğu protokol kullanılarak jelden geri kazanım gerçekleştirildi. Geri kazanım sonrası 1 µL örneğin üzerine 9 µL DNAaz/RNAaz/Poteaz içermeyen su ve 2 µL yükleme boyası (Thermo Scientific 6x, Katalog No: R0611) eklenerek GeneRuler 1 kb DNA Ladder ile birlikte jele yükleme yapılır. Genin boyutuna bakarak doğruluğu belirlendikten sonra modifiye edilmiş pGREEN vektörü, FIX, Furin, VKD-GC genleriyle; modifiye edilmiş pEAQ vektörü (Sainsbury F vd. 2009), FIX geniyle ligasyona uğratıldı. Ligasyon reaksiyonu 0,5 µl modifiye edilmiş pGREEN vektörü, 1 µl FIX geni, 10 µl 2x Ligasyon Tamponu, 8,5 µl DNAaz/RNAaz içermeyen su ve 1 µl Quick Ligase (NEB, ABD); 0,5 µl modifiye edilmiş pEAQ vektörü, 4 µl Furin geni, 10µl 2x Ligasyon Tamponu, 5,5 µl DNAaz/RNAaz içermeyen su ve 1 µl Quick Ligase

(NEB, ABD); 0,5 µl modifiye edilmiş pGREEN vektörü, 1 µl VKD-GC geni, 10 µl 2x Ligasyon Tamponu, 8,5 µl DNAaz/RNAaz içermeyen su ve 1 µl Quick Ligase (NEB, ABD); 1 µl modifiye edilmiş pEAQ vektörü (Sainsbury F vd. 2009), 7 µl FIX geni, 10 µl 2x Ligasyon Tamponu, 5 µl DNAaz/RNAaz içermeyen su ve 1 µl Quick Ligase (NEB, ABD) 20 dk oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Hemen sonra ligasyon ürünü plazmid, ısı şoku metodu kullanılarak, *E.coli* XL₁Blue kompetan hücrelerine transforme edildi. Bu metoda göre, ligasyon ürünü (21µl) *E.coli* XL₁Blue kompetan hücrelerinin (100µl) üzerine eklendi ve buzda 5 dk inkübe edildi. Sonrasında karışım 42°C'de su banyosunda 50 sn bekletildi ve hemen buza aktararak 5 dk buzda bekletildi. Örneğe, 400 µl LB besiyeri eklendi ve 37°C'de 225 rpm'de 1 saat inkübe edildi. Sonuçta elde edilen kültürden 2000xg'de 3 dk santrifüj yapılarak 100 µl alınıp konsantr olarak 50µg/ml kanamisin içeren LB plakaya yayma yapıldı ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. Yaklaşık 24 saat sonra plakalardan koloniler seçildi ve 50µg/ml kanamisin içeren 3 ml LB besiyerine ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edildi. Plazmidler, *E.coli* XL₁Blue hücrelerinden Zyppy Plasmid Miniprep Kitiyle (Zymo Research, ABD), üreticinin tavsiyelerine uygun olarak saflaştırıldı. *E.coli* XL₁Blue hücrelerinden pürifiye edilen plazmidler (1 µl), rekombinant FIX, FIX + Endo H, FIX + PNGase F, FIX + Furin ve FIX + Furin +VKD-GC proteinlerini eksprese etmek için, *A.tumefaciens* AGL₁ suşu kompetan hücrelerine (100µl) elektroporasyon yoluyla aktarıldı ve BBL medium (10 g/L soy hydrolysate, 5 g/L yeast extract, 5 g/L NaCl, and 50 mg/L kanamycin) içerisinde 28°C'de 1 gece çalkalamaya bırakıldı. Modifiye edilmiş pEAQ (pEAQ-FIX ve pEAQ-Furin) ve modifiye edilmiş pGREEN (pGREEN-FIX ve pGREEN-VKD-GC) konstruktları 6-7 haftalık *N.benthamiana* bitkilerine şırınga vasıtasıyla manuel olarak infiltre edildi. Modifiye edilmiş pEAQ vektörü hem istenen geni hem de baskılayıcı protein tek bir plazmit aracılığıyla eksprese edebildiği için sadece geni içeren vektörü direkt infiltre etmek yeterlidir. Modifiye edilmiş pGREEN vektörü baskılayıcı protein içermediği için bitki immün baskılayıcı protein olarak kullanıldı. FIX proteinini ve FIX varyant formlarını *in vivo* olarak üretebilmek için bitki infiltrasyonu FIX, Endo H, PNGase F, Furin ve VKD-GC proteinlerinin eksprese edecek *A.tumefaciens* suşu AGL₁ hücrelerinin farklı oranlarda (pGREEN-FIX; pGREEN-FIX (0,5) + pEAQ-Furin (0,5); pGREEN-FIX (0,5) + pEAQ-Furin (0,4) + pGREEN-VKD-GC (0,1); pEAQ-FIX (0,9) + pBI-Endo H(0,1); pEAQ -FIX (0,9) + pBI-PNGase F (0,1)) kullanımıyla gerçekleştirildi.

3.3. Rekombinant His₆ Etiketli Faktör IX Varyant Proteinlerinin Saflaştırılması

Proteinler HisPur™ Ni-NTA resin (Cat. No. 88221, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak immobilize edilmiş metal ion afinite kromatografisi (IMAC) yardımıyla saflaştırıldı. Modifiye edilmiş pGREEN vektörü tarafından üretilmiş FIX, FIX + Furin, FIX + Furin + VKD-GC için 5dpi'da (dpi-infiltrasyon sonrası geçen süre) 30 gram yaprak ağırlığının 3 katı kadar 1mM DIECA (Sodyum Dietilditiyokarbamat) içeren 20 mM fosfat temelli tamponda homojenize ve ekstrakte edildi. Ekstre 20000xg, 25 dakika, +4°C'de santrifüjasyon yöntemiyle temizlendi. Süpernatant daha önceden dengeleyici tamponla (20 mM sodyum fosfat, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4) yıkanmış HisTaq kolondan geçirildi. Kolon hacminin 10 katı (10CV) kadar dengeleyici tampon ve gene 10 katı (10CV) kadar elüsyon tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0,3 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 7.4) ile yıkandı.

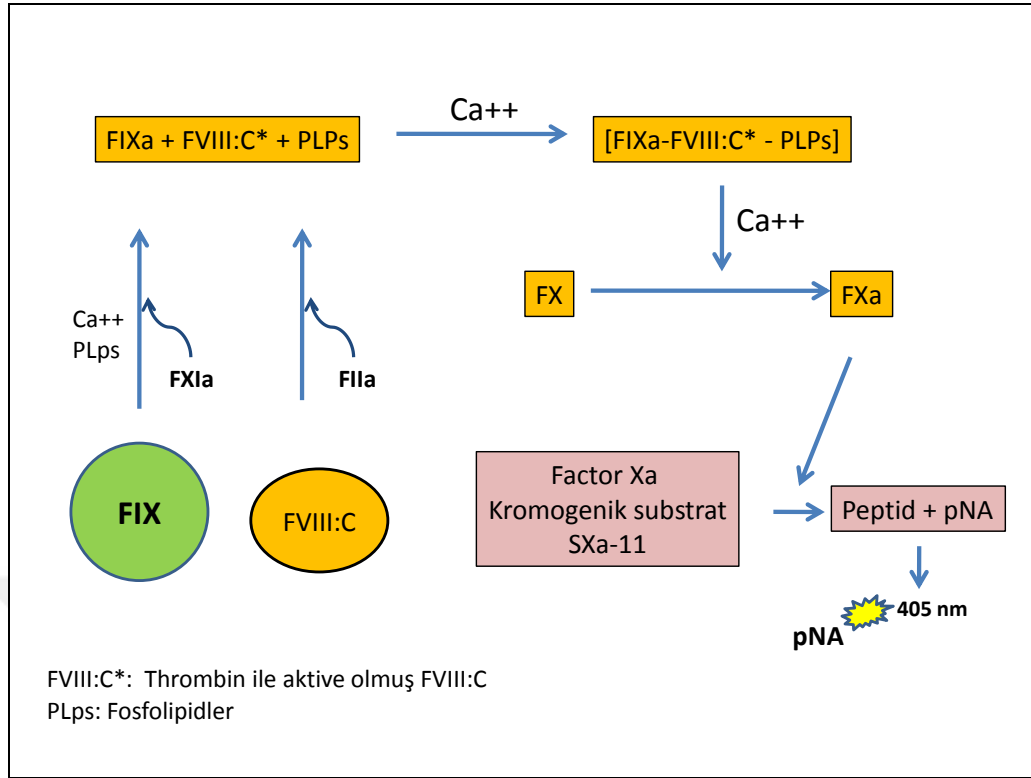
Modifiye edilmiş pEAQ vektörü tarafından üretilmiş FIX, FIX + Endo H, FIX + PNGase F için 5 dpi'da 30 gram yaprak ağırlığının 3 katı kadar 1mM DIECA (Sodyum Dietilditiyokarbamat) içeren 50 mM fosfat temelli tamponda homojenize ve ekstrakte edildi. Ekstre 20000xg, 25 dakika, +4 °C'de santrifügasyon yöntemiyle temizlendi. Süpernatant daha önceden dengeleyici tamponla (50 mM sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, pH 7,4) yıkanmış HisTaq kolondan geçirildi. Kolon hacminin 10 katı (10CV) kadar dengeleyici tampon ve gene 10 katı (10CV) kadar elüsyon tamponu (20 mM sodyum fosfat, 0,5 M NaCl, 300 mM imidazol, pH 7,4) ile yıkandı. Elüsyon sonrası pürifiye edilmiş proteinleri içeren fraksiyonlar tüplere toplandı ve proteinlerin moleküler ağırlığına uygun olarak seçilmiş Millipore 10K concentrator yardımıyla konsantre hale getirildi. Fraksiyonlardaki total protein miktarı Bradford yöntemiyle tespit edildi. Konsantre edilmiş proteinler kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.4. SDS-PAGE ve Western Blot Analizi

Protein örnekleri (5x Laemli Buffer ile hazırlanmıştır) %10 SDS-PAGE akrilamid jellerde ayrıldıktan sonra polivinilidinden florid membranlara (Millipore, Billerica, MA) transfer edildi ve membranlar 0.5% I-Block (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) çözeltisi vasıtasıyla bloke edildi. Histidin etiketli proteinler saflaştırılmış fare anti-His antikor (Cat. no. 652502, BioLegend) ile saptandı. Daha sonra membranlar 1xTBS'le (Tris Tamponlanmış Salin) yıkanarak fazla birincil antikorlar uzaklaştırıldı ve membran ikincil antikor olarak goat anti-mouse IgG H&L (HRP)'le (Cat. No. ab98790, Abcam, ABD) inkübe edildi, devamında 0.5% I-Block (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) ve 1xTBS'le (Tris Tamponlanmış Salin) yıkama yapılarak bağlanmamış ikincil antikorlar uzaklaştırıldı. Son olarak, kemiluminesans tespit, ECL western-blotting reaktifleri olan SuperSignal West Pico Stable Peroxide (2,5 ml) ve Luminol/Enhancer (2,5 ml) solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) uygulandı. Fotoğraflar GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak çekildi. GeneTools Software yardımıyla protein miktarları matematiksel olarak hesaplandı.

3.5. Faktör IX Kromojenik Aktivite Ölçümleri

Kısmen pürifiye edilmiş FIX protein varyantlarına ait örneklerin enzimatik aktivitesi üretici firmanın (BIOPHEN Factor IX kiti) önermiş olduğu protokole uygun şekilde belirlendi. Bu metot oldukça basit, hızlı ve hassastır. Ticari olarak üretilmiş rekombinant FIX proteini aktivite ölçümünde standart olarak kullanıldı ve renk gelişimi 405nm'de absorbans değeri ölçülerek belirlendi. Aktivite testinin prensibi (Şekil 2.9) trombin, fosfolipitler ve kalsiyum Faktör XIa varlığında test edilen örnekte bulunan Faktör IX'i Faktör IXa'ya aktive eder. Faktör IXa, aynı zamanda trombinle aktive edilmiş faktör VIII: C ve fosfolipitler (PLP'ler), kalsiyum ile birlikte bir enzimatik kompleks oluşturur. Bu kompleks, test sisteminde bulunan Faktör X'yı Faktör Xa'ya aktive eder. Bu aktivite, doğrudan testin sınırlayıcı faktörü olan Faktör IX miktarı ile ilgilidir. Üretilen Faktör Xa, Faktör Xa kromojenik substrat üzerindeki spesifik aktivitesi ile orantılı olarak ölçülür: Faktör Xa, substratı kesiyor ve pNA'yı serbest bırakıyor. Analiz edilen numunedeki Faktör IX miktarı ile üretilen Faktör Xa aktivitesi arasında doğrudan bir ilişki vardır ve ölçüm substrat molekülü olan pNA'nın miktarı ile bağlantılı olarak 405 nm'de ölçülüyor.



Şekil 3.1. Faktör IX kromojenik aktivite testinin temel prensibi.

3.6. Faktör IX Varyantlarının Stabilite Değerlendirilmesi

FIX poretini ve onun Endo H ve PNGase F enzimleri ile ko-ekspresyonu sağlanan varyant formlarına ait örnekler düşük bağlama kapasiteli polipropilen Eppendorf tüplerine aliquot edildi ve 37°C' de 1, 4, 8, 16, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örneklere uygun miktarda SDS yükleme boyası eklendikten sonra Western analizi yapıldı. FIX varyantlarının degradasyonunu hesaplamak amacıyla Western blot analizindeki her örneğe ait protein bantları Gene Tools yazılımı kullanılarak Syngene jel görüntüleme sistemi aracılığıyla belirlendi.

3.7. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

- **%1'lik agaroz jel:** 0,6 gr agaroz tartılıp jel beherine kondu ve üzerine 60 ml 1xTAE buffer eklendi. Agaroz tamamen çözünene kadar yaklaşık olarak 1 dk 20sn mikrodalga fırında bekletildi. Çözeltinin sıcaklığı düştükten sonra 1,2 µL Etidyum Bromid (EtBr) eklendi. Karışım tarakları önceden yerleştirilmiş yatay elektroforez küvetine kabarcık kalmadan döküldü ve jelin polimerleşmesi beklendi.
- **1M CaCl₂:** 1.47gr CaCl₂ tartıldı ve 10 mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **0.1M CaCl₂:** 1ml 1M CaCl₂ çözeltisinden alındı ve 9 ml bidistile suda çözüldü 0.1M 10 ml CaCl₂ hazırlandı.

- **0.1M CaCl₂ /%15 gliserol:** 1mL 1M CaCl₂ çözeltisinden alındı ve 3mL %50 gliserol, 6mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- **LB-Broth:** 25 gr LB-Broth 1000 ml saf su içerisinde çözöldü. 121°C’de 30dk otoklavlandı.
- **%70’lik alkol:** 70 ml etil alkol son hacim 100 ml olacak şekilde bidistile su ile karıştırıldı.
- **I-block:** 0,5 gr I-block son hacim 100 ml olacak şekilde 1xTBS içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde 3-5 saat tamamen çözünönceye kadar karıştırıldı.
- **%10’luk SDS:** 10 gr Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve üzerine 90 ml otoklavlanmış ddH₂O eklenerek tamamen çözünmesi için bırakıldı.
- **1xRunning Tamponu:** 3,03 gr Tris, 14,3 gr glisin, 10 ml %10 SDS alınarak son hacim 1000 ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- **1xTransfer Tamponu:** 5,8 gr Tris, 2,93 gr glisin, 370 µL alınarak son hacim 1000 ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- **5xTBS hazırlanması:** (20 mM Tris (pH:5,5), 150 mM NaCl) 12,115 gr Tris, 43,88 gr NaCl 800 ml olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü. pH 7,5 olacak şekilde HCl ile ayarlama yapıldı ve son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml’e tamamlandı.
- **1xTBS hazırlanması:** 200 ml 5xTBS alındı ve son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml’e tamamlandı.
- **%10’luk APS:** 60 mg APS tartıldı ve son hacim 600 µl olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- **1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8):** 92,5 gr Tris tartıldı ve 400 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü. pH 6N HCl ile 8,8’e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 500 ml’e tamamlandı.
- **0,5 M Tris-HCl (pH: 6,8):** 30 gr Tris tartıldı ve 400 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü. pH 6N HCl ile 6,8’e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 500 ml’e tamamlandı.
- **%10’luk Resolving jel (dört jellik):** 9,7 ml otoklavlanmış ddH₂O, 5 ml %40 Akrilamit-Bis solüsyonu, 5 ml 1,5 M Tris-HCl, 200 µL %10 SDS, 10 µL TEMED ve 100 µL %10’luk APS eklenerek hazırlandı.

- **%10'luk Stacking jel (dört jellik):** 7,95 ml otoklavlanmış ddH₂O, 1,25 ml %40 Akrilamit-Bisş solüsyonu, 3,15 ml 1,5 M Tris-HCl, 125µL %10 SDS, 12,5µL TEMED ve 62,5 µL %10'luk APS eklenerek hazırlandı.
- **Birincil Antikor (Western Blot 1:500):** 20 µL antikor alındı ve 10 ml I-block içerisinde çözöldü.
- **İkincil Antikor (Western Blot 1:2500):** 4 µL antikor alındı ve 10 ml I-block içerisinde çözöldü.
- **0,5M EDTA hazırlanması:** 14,612 gr EDTA tartıldı ve 80 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü. pH 8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 100 ml'e tamamlandı.
- **50xTAE tampon çözeltisi hazırlanması:** 242 gr Tris otoklavlanmış 700 ml ddH₂O içerisinde çözöldü. Karışıma 100 ml 0,5 M EDTA (pH : 8) ve 57,1 ml Glasiyal asetik asit eklenerek çözöldü. pH 8,5-8,6 olacak şekilde ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml'e tamamlandı.
- **1xTAE tampon çözeltisinin hazırlanması:** 20 ml 50x TAE tampon çözeltisinden alınarak son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml'e tamamlandı.
- **1M Tris çözeltisinin hazırlanması:** 12.114 gr Tris tartıldı ve 100 mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- **%0.01 Bromofenol mavi çözeltisinin hazırlanması:** 100 mg Bromofenol tartıldı ve 20 mL otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- **SDS/Western Jel Yökleme Solüsyonu (5x)-Laemli Bufferın hazırlanması:** 50 mL falkon içerisine 7.5 mL %25'lik 2-merkaptoetanol kondu. Üzerine 100 mg/20 mL Bromofenol mavi stok çözeltisinden 660 µL ilave edilip karıştırıldı. Karışıma 11.9 mL Gliserol, 1M Tris çözeltisinden 9.375 mL ve 3.333 mL SDS ilave edilerek pH 6.8'e HCl ile ayarlandı. Daha sonra karışım 1mL olacak şekilde tüplere aliquout edilir. Tüpler kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. Protein örnekleri jele yüklenmeden önce hacminin 1/4'i kadar (5x) Laemli Buffer eklenip kaynatılır.
- **SDS jel boyama çözeltisinin (Coomassie staining) hazırlanması:** 100 ml Asetik asit, 500 ml metanol ve 1 gr Coomassie Blue R250 son hacim 1000 mL olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.
- **SDS jel boya uzaklaştırma çözeltisinin (destaining) hazırlanması:** 200 ml metanol ve 100 ml Asetik asit son hacim 1000 mL olacak şekilde otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözöldü.

- **SYS mediumun hazırlanması:** 10 gr soyhidrolizat, 5 gr yeast extract ve 5 gr NaCl 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 1M KOH veya NaOH ile 7,0'a ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 mL'e tamamlandı. 121°C'de 30dk otoklavlandı.
- **SOC mediumun hazırlanması:** 20 gr bactotripton, 5 gr bacto yeast extract, 2 ml 5M NaCl, 2,5ml 1M KCl, 10 ml 1M MgCl₂, 10 ml 1M MgSO₄ 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldükten sonra son hacim 1000 ml'e tamamlanarak 121°C'de 30dk otoklavlandı. Çözelti otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklığın 50°C'ye kadar düşmesi beklendi. Daha sonra steril kabin altında 20 ml 1M glukoz eklendi ve +4°C'ye bırakıldı.
- **MMA mediumun hazırlanması:** 1,952 gr MES ve 10 ml 1M MgCl₂ 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü. pH 1M KOH veya NaOH ile 5,8'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 mL'e tamamlandı. 121°C'de 30 dk otoklavlandı.
- **Asetosyringene (AS) 100mM stok çözeltisinin hazırlanması:** 0,3924 gr Asetosyringene tartıldı ve 12 ml %95'lik etanolda çözündürülerek üzerine 8 ml bidistile su eklenerek son hacim 20 ml'e tamamlandı. 1L MMA için 200µl Asetosyringene gereklidir.
- **1xPBS tablet çözeltisinin hazırlanması:** 1 tablet PBS (137 mM NaCl, 2 mM KCl ve 10 mM fosfat buffer içeriyor) 100 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **1xPBS (protein pürifikasyonu için, 20mM):** 15,48 ml 1M Na₂HPO₄ ve 4,52 ml 1M NaH₂PO₄ 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü ve üzerine 17,53 gr NaCl ilave edilip tamamen çözündürülünceye kadar karıştırıldı. pH 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacim otoklavlanmış ddH₂O ile 1000 ml'e tamamlandı.
- **10mM Binding Buffer:** 5 ml 100 mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 45 ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- **25 mM Wash Buffer:** 12,5 ml 100 mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 37,5 ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- **250 mM Elution Buffer:** 0,851 gr imidazol tartıldı ve üzerine 50 ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) içerisinde çözüldü.
- **250 mM NaH₂PO₄:** 6,8995 gr NaH₂PO₄xH₂O tartıldı ve 250 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **250 mM Na₂HPO₄:** 8,8725 gr Na₂HPO₄ tartıldı ve 250 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.

- **500 mM NaCl:** 29,22 gr NaCl tartıldı ve 1000 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde çözüldü.
- **50 mM Sodium Fofat (PBS) Pürifikasyon Çözeltilisinin Hazırlanması:** 500 ml otoklavlanmış ddH₂O içerisinde 29,22 gr NaCl çözdürüldü. Karışım içerisinde 162 ml 250 mM Na₂HPO₄ solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. pH 7,5 olacak şekilde 250 mM NaH₂PO₄ kullanılarak ayarlandı ve son hacim 1L'e tamamlandı. Solüsyon 0,45 µm'lik filtreden geçirelerek steril edildi.
- **100 mM imidazol stok çözeltisinin hazırlanması:** 0,3404 gr imidazol tartıldı ve 50 ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) içerisinde çözüldü.
- **20 mM Binding Buffer:** 10 ml 100 mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 40 ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- **20 mM Wash Buffer:** 10 ml 100 mM imidazol stok çözeltisinden alındı ve üzerine 40 ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) ilave edilip karıştırıldı.
- **300 mM Elution Buffer:** 1,0212 gr imidazol tartıldı ve üzerine 50 ml 50 mM Sodium Fofat (PBS) içerisinde çözüldü.

3.8. Kompetan Hücre Hazırlanması

XL₁Blue E.coli kompetan hücre hazırlanması:

- 1- 100 µL XL₁Blue hücreleri 10 mL LB'ye inoküle edilerek 37°C ısıtmalı çalkalayıcıda 1 gece bekletildi.
- 2- Ertesi gün O.D ölçüldü. OD₆₀₀=4.12
- 3- 1 gün önceki kültürden 412 µL alınarak 100 mL LB'ye inoküle edilerek 37°C ısıtmalı çalkalayıcıda 3 saat çalkalamaya bırakıldı.
- 4- Örnekler 10 dk buz üzerinde bırakıldı.
- 5- 1M CaCl₂ (1.47 gr CaCl₂ + 10 mL ddH₂O=1M CaCl₂) hazırlandı.
- 6- 10 mL 0.1M CaCl₂ (1M CaCl₂ + 9 mL ddH₂O=0.1M CaCl₂) hazırlanarak buz üzerine bırakıldı.
- 7- Hücreler 50mL falkon içerisinde transfer edildi ve 600 rpm, +4°C'de 3 dk santrifüjlendi. Supernatant atıldı.
- 8- Pellet üzerine 10 mL soğuk 0.1M CaCl₂ eklenerek pellet çözdürüldü.
- 9- Çözdürüldükten sonra karışım 20 dk buz üzerinde bekletildi.
- 10- 0.1M CaCl₂/15% gliserol hazırlandı.
- 11- Buz üzerindeki karışımın üzerine 5 mL soğuk 0.1M CaCl₂/15% gliserol eklenerek, invert edilerek karıştırıldı.
- 12- 100 µL olacak şekilde 1.5 mL ependorf tüplere alıquot edilerek -80°C dondurucuya bırakıldı.

p-soup içeren Agl₁ kompetan hücre hazırlanması:

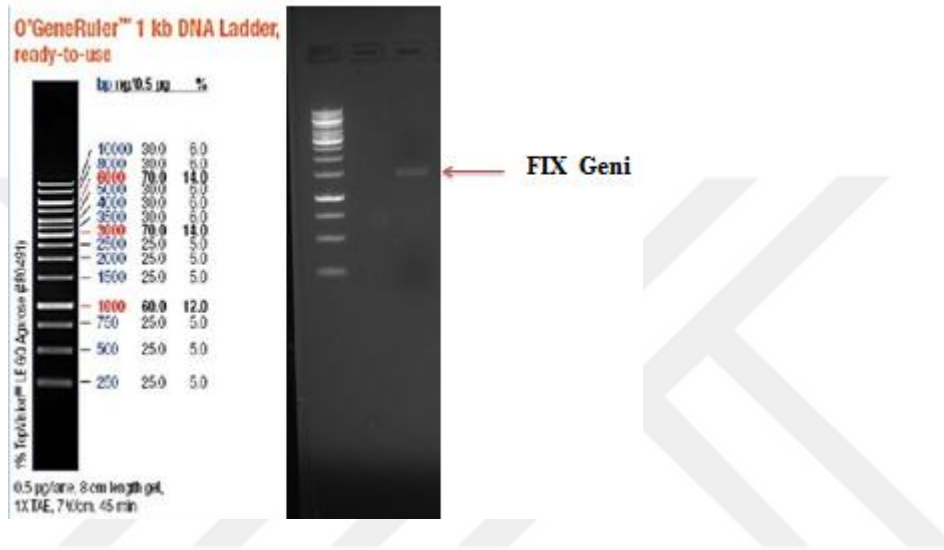
- 1- 100 µL p-soup içeren Agl₁ hücreleri içerisinde 15 µL karbamisilin ve 3 µL rifamisin eklenmiş 5 mL LB'ye inoküle edilerek 28°C ısıtmalı çalkalayıcıda 1 gece bekletildi.
- 2- Ertesi gün O.D ölçüldü. OD₆₀₀=4.152
- 3- Hücreler 50 mL falkon içerisinde transfer edildi ve 5 dk buz üzerinde bırakıldı.

- 4- 3000xg +4°C’de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine %10’luk gliserol eklenerek karıştırıldı.
- 5- 3000xg +4°C’de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 2,5 ml %10’luk gliserol eklenerek karıştırıldı.
- 6- 100 µL olacak şekilde 1.5 mL ependorf tüplere aliqout edilerek -80°C dondurucuya bırakıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Faktör IX Geninin Klonlanması

FIX geninin nükleotid dizisi verileri NCBI veri tabanında mevcuttur. Bu dizilere dayanarak, FIX geninin kodlama bölgesinin uçlarında AgeI ve XhoI kesim bölgesi içeren vektörler satın alındı. Enzim kesimi ve jelden geri kazanım işlemleri materyal ve metot'da belirtilen şekilde uygulandı. FIX geninin jelden geri kazanım sonrası görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği gibi beklenen boyuttaki 1,8 kb gen ürünü elde edildi.



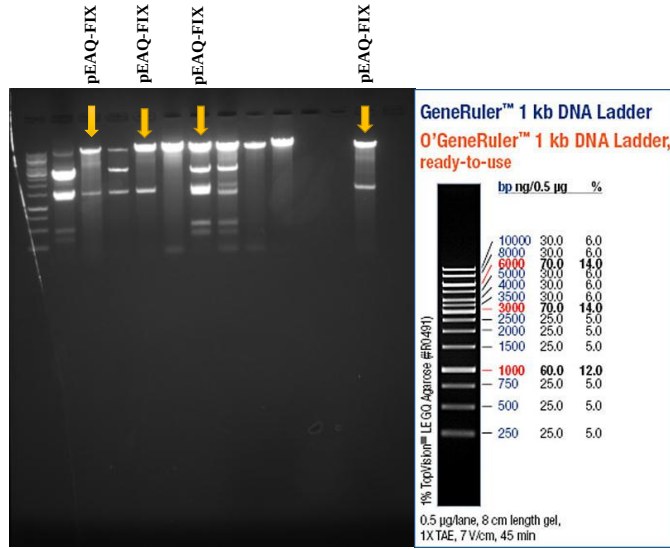
Şekil 4.1. FIX geninin jelden geri kazanımı

4.2. Plazmidlerin Oluşturulması ve Proteinlerin Heterolog Ekspresyonu

FIX geni varyantlarının işlevsel bir proteini kodladığını deneysel olarak kanıtlamak amacıyla, genin varyantlarının kodlama bölgeleri *E. coli* ekspresyon vektörü modifiye edilmiş pGREEN ve pEAQ vektörüne (Sainsbury F vd. 2009) klonlandı ve ekspresyon suşu *E.coli* XL₁BLUE'a transforme edildi. pEAQ-FIX plazmidlerinin, bağlanma bölgeleri olan AgeI ve XhoI enzimleriyle kesilmesiyle plazmidlerin doğru şekilde kurulduğu gösterildi. Rekombinant FIX varyantları Ag₁psoup kompetan hücrelerinde, fazladan 6 N-bakiyeli terminal uzatmayla (Histidin etiketi), füzyon proteini olarak eksprese edildi. Beklenen protein boyutları Western blot ve SDS-PAGE analizleriyle gösterildi.

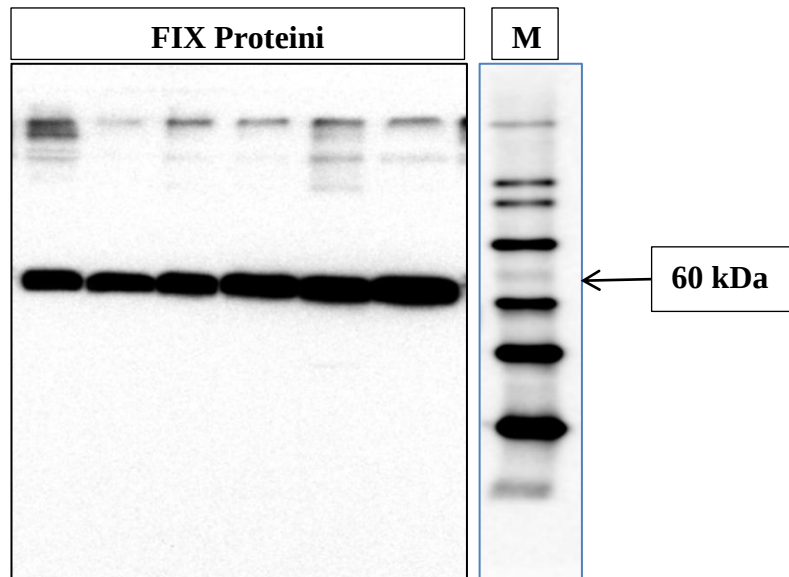
4.2.1. Rekombinant FIX proteininin üretimi

FIX geni kodon optimizasyonu ile tasarlandıktan sonra modifiye edilmiş pEAQ vektörüne klonlandı ve ekspresyon suşu *E.coli* XL₁BLUE'a transforme edildi ve LB Agar plate'e yayma yöntemiyle ekildi. Ertesi gün kolonilerden izole olanlar seçildi ve kanamisin içeren LB sıvı besiyerine inokule edildi. Bir sonraki gün Zymy Plasmid Miniprep Kitiyle (Zymo Research, ABD), üreticinin tavsiyelerine uygun olarak plazmid izolasyonu yapıldı. Agaroz jele yükleme yapılarak gerçek koloniler seçildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. pEAQ-FIX'in AgeI ve XhoI kesim enzimleriyle kesimi: 1) GeneRuler 1kb DNA Ladder

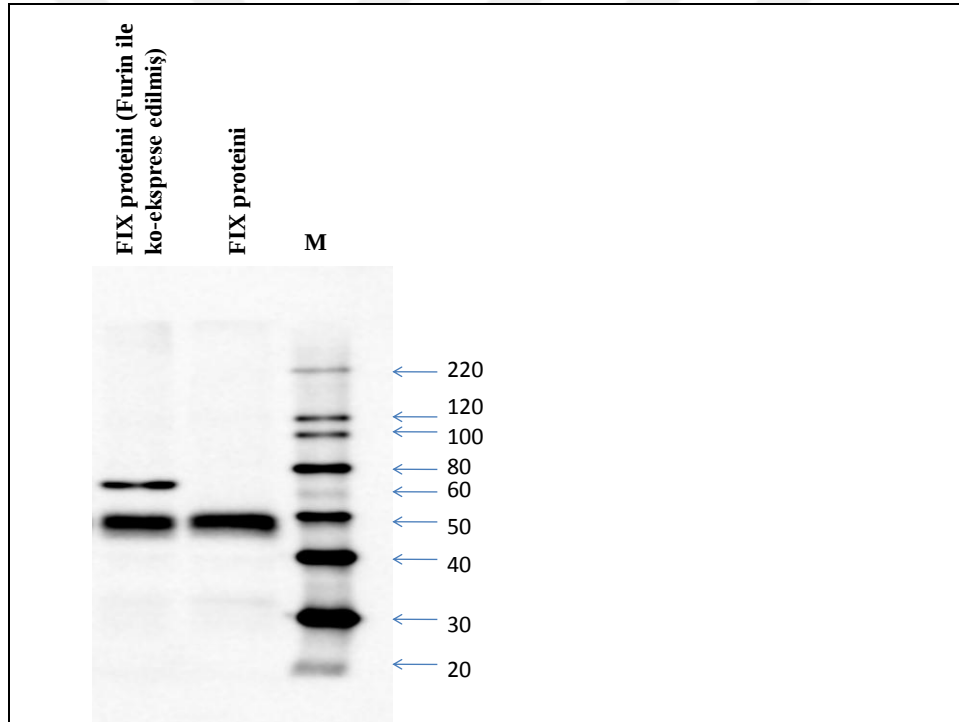
İşaretlenmiş koloniler hem geni (1.8 kb) hem de vektörü (10 kb) taşımaktadır. Belirlenmiş kolonilerden % 90'lık gliserol ile stok hazırlanarak Agl₁'a transformasyon aşamasına geçilmiştir. Agl₁'a transformasyon sonrası 5 dpi'da yapraklar toplanarak materyal ve metot'da belirtildiği gibi ekstraksiyon yapılarak, western analizi yapıldı. Elde edilen bulgular doğrultusunda (Şekil 4.3) 57 kDa boyutundaki FIX proteininin *in vivo* olarak üretilbildiğini göstermiş olduk.



Şekil 4.3. pEAQ vektörü tarafından üretilmiş rekombinant FIX proteinin Western blot analizi: M: Magic Marker XP Western Protein Standardı (ThermoFisher Scientific).

4.2.2. Rekombinant FIX + Furin proteininin üretimi

FIX'nın aktivasyon süreci FIX'da Arg145-Ala146 ve Arg180-Val181 bağlarının proteolitik kesilmesi ve bunun sonucu olarak 35 amino asitten oluşan aktivasyon peptidinin ayrılmasından ibarettir (Di Scipio vd. 1978). Bu süreç için gereken enzim endojen furindir. Furin enzimi serin proteaz ailesinin bir üyesi olan Vitamin K-bağımlı proteinlerin proteolitik işleme sürecinde kilit rol üstlenmektedir. Yapılan bir çalışmada furin sitozolik ve trans-membran domainlerinden yoksun olacak şekilde C-terminalinden 87 a.a uzaklaştırılarak 6xHistidin içeren bölge ile değiştirildi ve kısaltılmış versiyonda üretimi sağlandı (Louise vd. 1993). Daha önceki bir çalışmada ise trans-membran domain içermeyen rekombinant furin üretilmiş ve trans-golgi ağında kalmak yerine hızlı bir şekilde süpernatanta salgılandığı tespit edilmiştir (Rehmetulla vd. 1992). Bu nedenle furinin doğru bir şekilde ekspresyonu için trans-membran domaini kodlayan bölgenin elimine edilmesi gerekmektedir. Bu literatür bilgisinden yararlanarak furin enzimi tasarlandı. FIX proteininin proteolitik kesimini sağlamak amacıyla furin enzimi ile ko-ekspresyonunu sağladık ve *in vivo* üretilebilirliğini Western analiziyle ispatlamış olduk.



Şekil 4.4. FIX proteininin Furin enzimiyle proteolitik kesiminin Western blot analiziyle gösterilmesi. M: Magic Marker XP Western Protein Standardı (ThermoFisher Scientific).

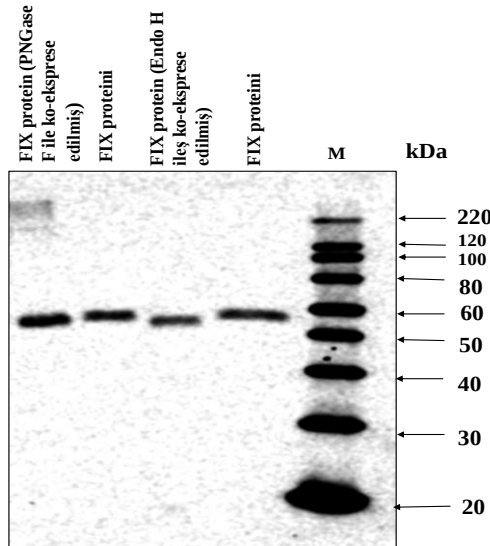
4.2.3. Rekombinant FIX + Furin + VKD-GC proteininin üretimi

Biz FIX'ı modifiye edilmiş proteinler olan Furin ve VKD-GC ile ko-eksprese ettik. Yukarıda gösterildiği gibi bitkide üretilen furinin ekspresyonu Western blot analiziyle doğrulandı (Şekil 4.4). Bitkide üretilen furinin aktivitesi daha önce bizim laboratuvarımızda gösterilmiştir. Yani, bitkide üretilen furinin *in vivo* ve *in vitro* olarak

aktivitesi doğrulanmıştı. FIX'nın propeptidi, Gla domaininin N-terminal 18 amino asitlik kısmıdır. Furin bu 18 amino asitlik küçük fragmenti kesip uzaklaştırmaktadır. FIX ile Furin ile kesilmiş FIX bantları arasındaki boyut farkı çok küçük olduğundan, Western blot analizinde bu farkı görmek oldukça zordur. Fakat biz hala Western blot analizinde küçük boyut farkını görebiliyoruz (Şekil 4.4). VKD-GC transmembran protein olduğu için bitkide üretilen VKD-GC'nin aktivitesi ve ekspresyonunu doğrulamak çok zordur. VKD-GC *in vitro* aktif olmayabilir, aksine *in vivo* koşullarda ise aktif olabilir. Buna rağmen, yalnız üretilen veya Furin veya VKD-GC ile ko-eksprese edilen FIX proteinlerinin aktiviteleri arasında küçük farklılık ya da herhangi bir farklılık gözlemleyemedik. Furin veya Furin ve VKD-GC ile birlikte ko-eksprese edilen FIX proteinini insan FIX proteinine kıyasla yaklaşık olarak %12'lik göreceli aktiviteye sahiptir. Bu sonuçlar, dolaylı olarak bitkide trans-membran domainiyle birlikte tam uzunlukta üretilen VKD-GC'nin FIX protein kalitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir ve muhtemelen VKD-GC, *N. benthamiana* bitkisinde *in vivo* aktif değildir. Laboratuvarımızın şuanki çalışma konusu olan VKD-GC'nin işlevsel olarak aktif halde bitkide ekspresyonunun geliştirilmesi oldukça önemlidir.

4.2.4. Rekombinant FIX + Endo H ve FIX + PNGase F proteinlerinin üretimi

Normalde FIX glikoprotein olmadığı halde *N. benthamiana* bitkisinde rekombinant üretimi zamanı belirttiğimiz olası glikolizasyon noktalarında istenmeyen bir durum olarak glikolizasyona uğramaktadır. *In vivo* FIX üretimini ve aktivitesini artırmak için Endo H ve PNGase F enzimleriyle ko-ekspresyon yapmanın mantıklı olacağı doğrultusunda strateji geliştirdik. Western analizi sonucu Şekil 4.6'da görüldüğü gibi yaklaşık olarak 5 kDa'lık boyutsal eksilme ile FIX proteininin deglikolizasyona uğradığını deneysel olarak kanıtlamış olduk.

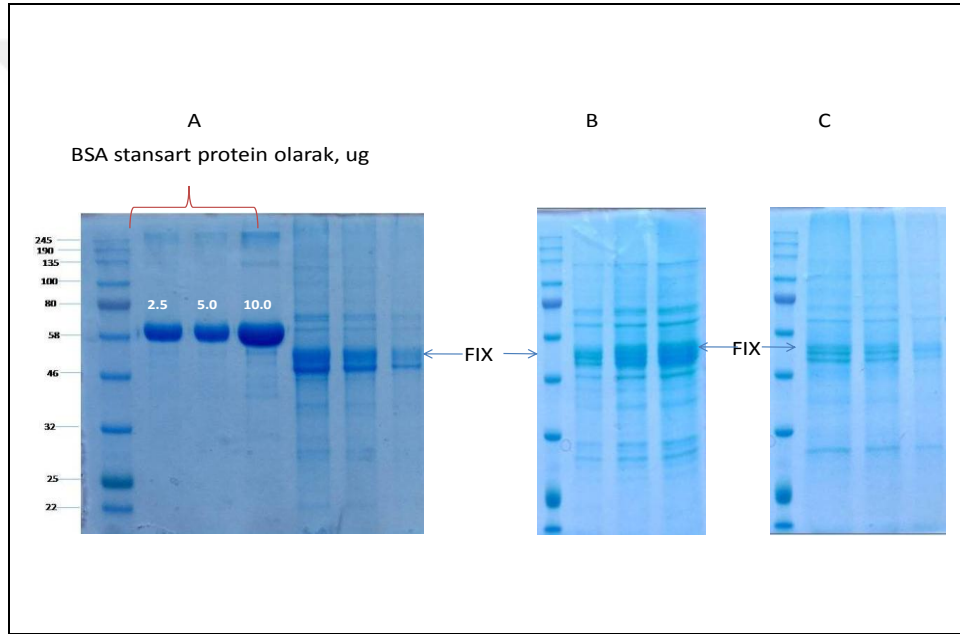


Şekil 4.5. FIX proteininin Endo H ve PNGase F enzimleriyle ko-ekspresyonunun Western blot analizi. M: Magic Marker XP Western Protein Standardı (Thermo Fisher Scientific).

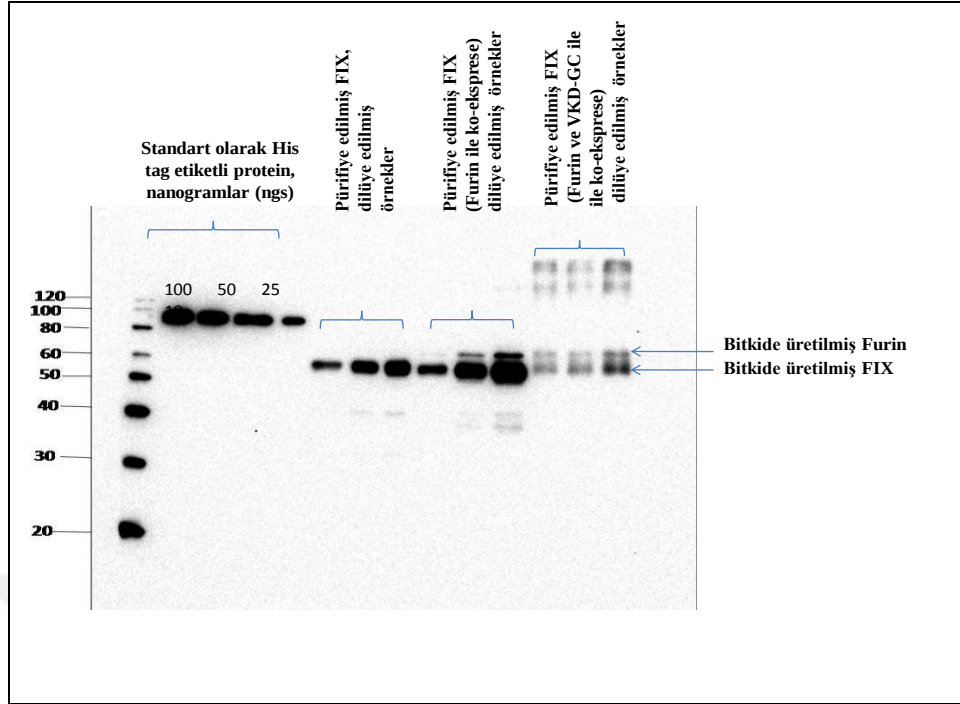
4.3. Rekombinant His6 Etikteli Faktör IX Varyant Proteinlerinin Saflaştırılması

Rekombinant Faktör IX ve varyant proteinlerinin HisPur™ Ni-NTA rezin (Cat. No. 88221, Thermo Fisher Scientific) yardımıyla nikel yüklenmiş, immobilize metal afinite kromatografisi yöntemiyle süpernatant fraksiyonundan etkili şekilde pürifiye edilmesiyle, proteinin yüksek derecede çözülebilir olduğu görülmüştür.

FIX, FIX + Furin ve FIX + Furin + VKD-GC proteinleri IMAC yöntemiyle saflaştırıldıktan sonra SDS-PAGE ve Western analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Saflaştırma sonrası SDS-PAGE analiziyle kendi proteinimiz dışında bitkide baskın oranda bulunan kendi proteini olan Rubisco da gözlemlendiği ve FIX proteininin boyutunun Rubisconun boyutuna yakın olduğu için western analizi yapılarak proteinimize spesifik antikorlar aracılığıyla deneysel analizini tamamlamış olduk.

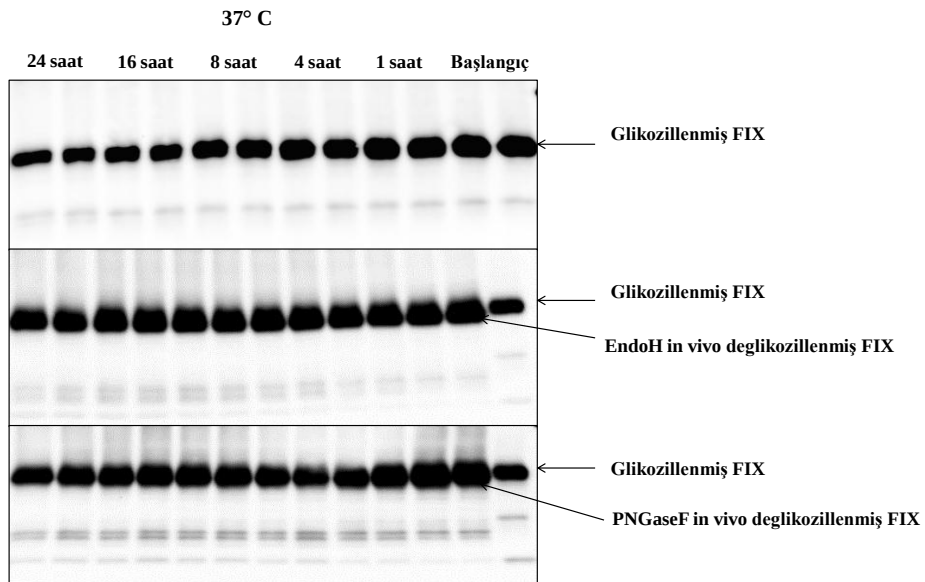


Şekil 4.6. *N. benthamiana* bitkisinde üretilmiş rekombinant FIX (A), Furin ile ko-eksprese edilmiş FIX (B) ve Furin ve VKD-GC ile ko-eksprese edilmiş FIX (C) proteinlerinin IMAC kolon pürifikasyonu sonrası SDS-PAGE (Coomassie Blue'yla boyanmış) analizi.



Şekil 4.7. *N. benthamiana* bitkisinde üretilmiş rekombinant FIX, Furin ile ko-ekspres edilmiş FIX, Furin ve VKD-GC ile ko-ekspres edilmiş FIX proteinlerinin IMAC kolon pürifikasyonu sonrası Western blot analizi. Farklı miktarlardaki Histaq proteini (100, 50, 25 ve 10 ng) pürifiye edilmiş örneklerdeki FIX miktarlarının belirlenmesinde standart olarak kullanıldı.

4.4. Faktör IX Varyantlarının Stabilité Değerlendirmesi



Şekil 4.8. Glikozillenmiş ve deglikozillenmiş FIX varyant proteinlerinin Western Blot analizi.

Çizelge 4.1. Saflaştırılmış FIX, FIX + Endo H ve FIX+ PNGase F proteinlerinin stabilite değerlendirilmesi

Proteinler ve Kayıp yüzdeleri	Başlangıç	37°C 1 saat	37°C 4 saat	37°C 8 saat	37°C 16 saat	37°C 24 saat
FIX	100%	86.93%	72.08%	69.10%	50.99%	46.51%
FIX-Kayıp Protein Yüzdesi	0%	13.07%	27.92%	30.90%	49.01%	53.49%
FIX + Endo H	100%	98.78%	98.55%	98.54%	94.72%	84.91%
FIX+ PNGase F	100%	92.39%	73.88%	69.42%	68.99%	62.59%
FIX+ PNGase F- Kayıp protein yüzdesi	0%	7.61%	26.12%	30.58%	31.01%	37.41%

Saflaştırılmış pEAQ vektörü tarafından üretilmiş FIX protein örneklerinin 37°C’de belirlenen sürelerde bekletildikten sonra yapılan Western blot analiz sonuçlarının GeneTools programı yardımıyla başlangıç proteine 100 değeri verilerek, diğer proteinlere denk gelen değerler hesaplandı. Bu sonuca göre FIX proteinin yarı ömrü **25,80** saattir.

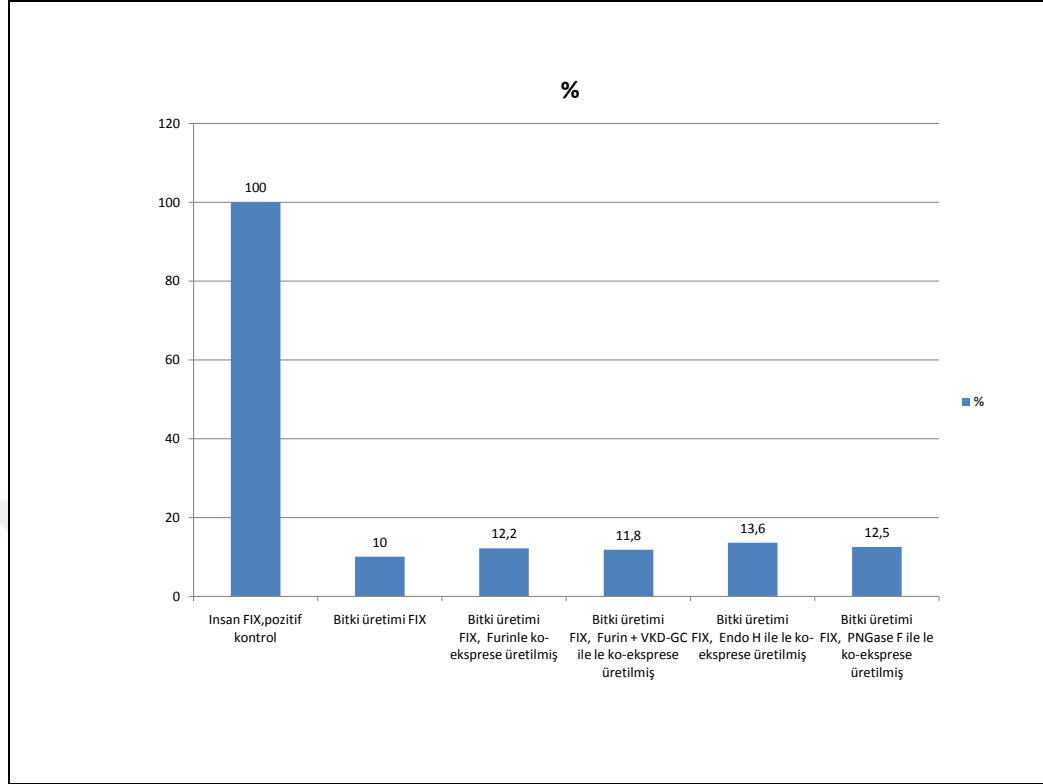
Saflaştırılmış FIX + EndoH protein örneklerinin 37°C’de belirlenen sürelerde bekletildikten sonra yapılan Western blot analiz sonuçlarının GeneTools programı yardımıyla başlangıç proteine 100 değeri verilerek, diğer proteinlere denk gelen değerler hesaplandı. Bu sonuca göre FIX + Endo H proteinin yarı ömrü **80,57** saattir.

Saflaştırılmış FIX + PNGaseF protein örneklerinin 37°C’de belirlenen sürelerde bekletildikten sonra yapılan Western blot analiz sonuçlarının GeneTools programı yardımıyla başlangıç proteine 100 değeri verilerek, diğer proteinlere denk gelen değerler hesaplandı. Bu sonuca göre FIX + PNGase F proteinin yarı ömrü **37,99** saattir.

4.5. Faktör IX Varyantlarının Kromogenik Aktivite Değerlendirmesi

Faktör IX varyant proteinlerinin Bradford analizine göre protein miktarları belirlendikten sonra kromogenik aktivite değerlendirilmesi yapılarak bulunan absorbands değeriyle insan FIX standart proteiniyle kıyaslanarak göreceli olarak aktivite yüzdesi belirlendi.

Çizelge 4.2. FIX varyant proteinlerinin insan FIX proteinine göre göreceli aktivite yüzdesi



Elde edilen bulguya göre FIX varyantları içerisinde insan FIX proteinine kıyasla en yüksek göreceli kromogenik aktivite değerini FIX + Furin vermektedir. Furin enziminin kromogenik aktivite değerleri ölçüt alındığında FIX proteininin aktivasyonu için gerekli olan proteolitik kesimi sağladığı ve FIX proteininin hem *in vivo* hem de *in vitro* aktivitesi üzerine artırıcı etki gösterdiği gözlemlenmiştir.

5. SONUÇ

Faktör IX kan koagülasyon yolağının iç ve dış yolağında önemli rol oynayan 55 kDa ağırlığında, tek zincirli, vitamin K-bağımlı plazma zimojenidir. Bu çalışmada biz

N. benthamiana bitkisinde insan FIX varyantlarının kodon optimize ettik, klonladık, eksprese ettik, ürettik ve işlevsel aktivitelerini değerlendirdik. İnsan FIX proteinini bitkisinde yalnız veya modifiye edilmiş enzimler, VKD-GC ve Furin ile birlikte üretildi.

Bitkide üretilmiş FIX varyantları IMAC kolon kullanılarak kısmen pürifiye edildi ve kıyaslamalı enzimatik aktiviteleri hesaplandı. Bitkide üretilmiş ve kısmen pürifiye edilmiş FIX varyantlarının aktivitesi kromogenik yöntemle belirlendi. Biz bitkide üretilen FIX'nın insan FIX'a kıyasla %10 göreceli aktiviteye sahip olduğunu belirledik. Buna rağmen, yalnız üretilen veya Furin veya VKD-GC ile ko-eksprese edilen FIX proteinlerinin aktiviteleri arasında küçük farklılık ya da herhangi bir farklılık gözlemleyemedik. Furin veya Furin ve VKD-GC ile birlikte ko-eksprese edilen FIX proteininin insan FIX proteinine kıyasla yaklaşık olarak %12'lik göreceli aktiviteye sahip olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar, dolaylı olarak bitkide trans-membran domainiyle birlikte tam uzunlukta üretilen VKD-GC'nin FIX protein kalitesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir ve muhtemelen VKD-GC, *N. benthamiana* bitkisinde *in vivo* aktif değildir.

Biz aynı zamanda *N. benthamiana* bitkisinde FIX'nın deglikozillenmiş varyant formlarını ürettik ve spesifik bitki glikozilasyonunun FIX stabilite ve aktivitesi üzerinde olan etkisini gözlemledik ki, her ikisi de protein katlanmasıyla bağlantılıdır. Rekombinant proteinlerin glikolizasyonu enzim aktivitesi, protein stabilitesi, farmakokinetik ve immünojeniteyi etkilediği için oldukça önemlidir (Varki vd. 1999). İnsan Faktör IX zimojeni olası N-glikolizasyon bölgeleri olarak aktivasyon peptidinde (11 kDa, amino asitler 146–180), Asn-157 ve Asn-167 noktalarına sahiptir ve bu bölge FXIa veya FVIIa doku faktörü tarafından proteolitik olarak kesilip, uzaklaştırılıyor (Kurachi vd. 1982). Kan koagülasyonunun iç yolağında Faktör IX'nın, FXIa tarafından Faktör IXa'ya aktivasyonu sırasında, 11 kDa'lık aktivasyon peptidi, bahsi geçen iki N-glikolizasyon bölgeleri arasındaki peptid bağın kesilmesiyle Faktör IX molekülünden uzaklaştırılıyor. FIX'nın bitkide üretilmiş glikozillenmiş ve *in vivo* deglikozillenmiş formlarının stabilitesi 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra belirlendi. Glikozillenmiş FIX'nın (%50'nin kalma süresi), PNGase F *in vivo* deglikozillenmiş ve Endo H *in vivo* deglikozillenmiş formlarının *in vitro* yarı ömrü Western blot analiziyle protein bantları analiz edilerek, sırasıyla 25.80, 37.99 ve 80.57 saat olarak hesaplandı. Bu sonuçlar FIX'nın bitkide üretilmiş Endo H *in vivo* deglikolize formunun glikolize FIX ve PNGase F *in vivo* deglikolize formuna kıyasla yüksek sıcaklıkta daha stabil olduğunu gösterdi. Şunu da belirtelim ki, insan plazmasında Faktör IX'nın konsantrasyonu 2.5-5 µg/ml arasında değişmektedir ve yarı ömrü yaklaşık olarak 24 saattir. Bizim sonuçlarımız FIX'nın bitkide üretilmiş Endo H *in vivo* deglikolize formunun glikolize FIX ve PNGase F *in vivo* deglikolize formuna kıyasla yüksek sıcaklıkta daha stabil olduğunu gösterdi. İlaveten, Endo H deglikozillenmiş varyantın aktivitesinin aynı proteininin glikozillenmiş veya PNGase F deglikozillenmiş formlarından birazcık daha fazladır. Bu sonuçlar dolaylı olarak, bitkide üretilen FIX'nın protein katlanması üzerinde bitkiye spesifik glikolizasyonun etkisinin olduğunu göstermektedir.

Özetle, bitkide üretilen FIX'nın insan FIX'a kıyasla %10-12 göreceli aktiviteye sahip olmasına rağmen bitki ekspresyon sistemi hızlı, güvenli (patojen içermemesi) ve maliyet açısından uygun olması nedeniyle bu şekilde bitkide üretilen FIX çoğu uygulamada kullanılabilir. Örneğin, savaş sırasında özellikle askeri personellerin yaralanması durumunda kanamayı durdurmak için FIX pedlerin yapımında çok kullanışlı olacaktır.



6. KAYNAKLAR

- Amphlett, G.W., Kisiel, W., Castellino, F.J. 1981. The interaction of Ca^{2+} with human factor IX. *Arch Biochem Biophys*, 208: 576–585.
- Amy, E. S., Paul, B. 2003. Structure–Function Relationships in Factor IX and Factor IXa. *Trends Cardiovasc Med*, 13: 39–45.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N. 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 4–8.
- Bajaj, M.S., Birktoff, J.J., Steer, S.A., Bajaj, S.P. 2001a. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost*, 86: 959–972.
- Bakker, H., Florack, D., Bosch, H., Rouwendal, G. 2003. Optimizing glycan processing in plants. 25 September, PatentWO 03/078637. Plant Research International B.V. (<http://www.plant.wageningen-ur.nl/>).
- Chapman, R.E., Munro, S. 1994. Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J*, 13: 2305–2312.
- Coyle, TE., Reding, M.T., Lin, J.C., Michaels, L.A., Shah, A., Powell, J. 2014. Phase I study of BAY 94-9027, a PEGylated B-domain–deleted recombinant FVIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A. *J Thromb Haemost*, 12: 488–96.
- Daniell, H. 2006. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J*, 1: 1071-1079.
- David, L.E., Arthur, R.T. 1984. Cleavage and Activation of Human Factor IX by Serine Proteases. *Blood*, Vol 64 No 4 pp 821-831.
- Di Scipio, R.G., Kurachi, K., Davie, E.W. 1978. Activation of human factor IX (Christmas factor). *J Clin Invest*, 61: 1528–1538.
- Franken, E., Teuschel, U., Hain, R. 1997. Recombinant proteins from transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol*, 8: 411-416.
- Freedman, S.J., Furie, B.C., Furie, B., Baleja, J.D. 1995. Structure of the calcium ion-bound gamma-carboxyglutamic acid-rich domain of factor IX. *Biochemistry* 34:12,126–12,137.
- Frisch, E., Schwedler, C., Kaup, M., Iona, B. E., Gröne, J., Lauscher, J.C., et al. 2013. Endo- β -N-acetylglucosaminidase H de-N-glycosylation in a domestic microwave oven: Application to biomarker discovery. *Analytical Biochemistry*, 433: 65-69.doi:10.1016/j.ab.2012.10.015PMID: 23088875.
- Furie, B.C. 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, 53: 505-518.
- Gomord, V., Faye, L. 2004. Post-translational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 171–181. pmid: 15003218.

- Gomord, V., Fitchette, A.C., Menu-Bouaouiche, L., Saint-Jore-Dupas, C., Plasson, C., Michaud, D., Faye, L. 2010. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal*, 8, pp. 564-587.
- Hockin, M.F., Jones, K.C., Everse, S.J., Mann, K.G. 2002. A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem*, 277: 18,322–18,333.
- Hoffman, M., Monroe, D.M., Oliver, J.A., Robert, H.R. 1995. Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. *Blood*, 86: 1794–1801.
- Jones, B.G., Thomas, L., Molloy, S.S., Thulin, C.D., Fry, M.D., Walsh, K.A and Thomas, G. 1995. Intracellular trafficking of Furin is modulated by the phosphorylation state of a casein II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J*, 14: 5869–5883.
- Kaufman, R.J. 1998. Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function. *Thromb Haemost*, 79: 1068-1079.
- Koprinovova, A., Lienhart, O., Decker, E.L., Stemmer, C., Wagner, S., Gorr, G. , 2003. Modifying glycosylation patterns in moss, Conference on Plant-Made Pharmaceuticals: 2003 March 16-19; Quebec City, California. CPMP. (<http://www.cpm2003.org/pages/en/home/home.html>).
- Kurachi, K., Davie, E.W. 1982. Isolation and characterization of a cDNA coding for human Factor IX. *Proc Natl Acad Sci, USA* 79:6461–6464.
- Lawson, J.H., Mann, K.G. 1991. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem*, 266:11, 317.
- Lenting, P.J., Matt, H., Clijsters, P.P.F.M., Donath, M-JSH, Van Mourik, J.A., Mertens, K. 1995. Cleavage at arginine 145 in human blood coagulation factor IX converts the zymogen into a factor VIII binding enzyme. *J Biol Chem*, 270: 14,884.
- Lisowska, E., Jaskiewicz, E. Protein Glycosylation, an Overview. *eLS*. 2012. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0006211.pub3/full>.
- Liu, J., Jonebring, A., Hagstrom, J., Nystrom, A.C., Lovgren, A. 2014. Improved Expression of Recombinant Human Factor IX by Co-expression of GGCX, VKOR and Furin. *Protein J*, 33: 174–183 DOI 10.1007/s10930-014-9550-5.
- Louise, C. W., Alnawaz, R., J. Andrew, B., Randal, J. K. 1993. PACE/Furin Can Process the Vitamin K-dependent Pro-factor IX Precursor within the Secretory Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 12, 8458-8465.
- Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., Plummer, T.H. 1989. Characterization of glyco proteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Analytical Biochemistry*, 180: 195–204. PMID: 2510544.

- Mamedov, T., Cicek, K., Gulec, B., Ungor, R., Hasanova, G. 2017. *In vivo* production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expression with Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo H) of *Streptomyces plicatus*. *PlosOne*, 12(8):e0183589.
- Martinowitz, U., Lissitchkov, T., Lubetsky, A., Jotov, G., Barazani-Brutman, T., Voigt, C., Jacobs, I., Wuerfel, T., Santagostino, E. 2015. Results of a phase I/II open-label, safety and efficacy trial of coagulation factor IX (recombinant), albumin fusion protein in haemophilia B patients. *Haemophilia*, 21: 784-90.
- Mathur, A., Zhong, D., Sabharwal, A.K. 1997. Interaction of factor IXa with factor VIIIa. Effects of protease domain Ca²⁺-binding site, proteolysis in the autolysis loop, phospholipid and factor X. *J Biol Chem*, 272:23,418–23,426.
- Mingdong, H., Barbara, C. F., Bruce, F. 2004. Crystal Structure of the Calcium-stabilized Human Factor IX Gla Domain Bound to a Conformation-specific Anti-factor IX Antibody. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 14, Issue of April 2, pp. 14338–14346.
- Molloy, S.S., Thomas, L., Van Slyke, J.K., Stenberg, P.E., Thomas, G. 1994. Intracellular trafficking and activation of the Furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J*, 13: 18–33.
- Muramatsu, T. 1971. Demonstration of an endo-glycosidase acting on a glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*. 246(17): 5535–5537. PMID: 4108054.
- Nazeef, M., Sheehan, J.P. 2016. New developments in the management of moderate-to-severe hemophilia B. *Journal of Blood Medicine*, 7: 27-38.
- Negrier, C., Knobe, K., Tiede, A., Giangrande, P., Moss, J. 2011. Enhanced pharmacokinetic properties of a glycoPEGylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B. *Blood*, 118: 2695-2701.
- Peyvandi, F., Garagiola, I., Biguzzi, E. 2016. Advances in the treatment of bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* Nov; 14(11): 2095-2106. doi: 10.1111/jth.13491.
- Powell, JS., Pasi, KJ., Ragni, MV., Ozelo, MC., Valentino, LA., Mahlangu, J.N., Josephson, NC., Perry, D., Manco-Johnson, MJ., Apte, S., Baker, RI., Chan, GC., Novitzky, N., Wong, RS., Krassova, S., Allen, G., Jiang, H., Innes, A., Li, S., Cristiano, LM., et al. 2013. Phase 3 study of recombinant factor IX Fc fusion protein in hemophilia B. *N Engl J Med*, 369: 2313-23.
- Powell, JS., Perry, D., Baker, RI., Shapiro A., Manco-Johnson MJ., Potts J., Robinson B., Mei B., Pierce G. 2014. Analysis of clinical target joint bleeding on prophylactic regimens with recombinant Factor IX Fc fusion protein in patients with severe hemophilia B. Abstracts of the WFH 2014 World Congress, *Haemophilia*, 20 (Suppl. s3): 1-200.
- Sainsbury, F., Thuenemann, EC., Lomonossoff, GP. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol* 7(7): 682–93. [https:// doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x) PMID: 19627561.

- Santagostino, E., Negrier, C., Klamroth, R., Tiede, A., Pabinger- Fasching, I., Voigt, C., Jacobs, I., Morfini, M. 2012. Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients. *Blood*, 120: 2405–11.
- Schafer, W., Stroh, A., Berghofer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.L., Kern, H.F., Klenk, H.D., Garten, W. 1995. Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase Furin. *EMBO J*, 14: 2424–2435.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth J. 1999. *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Exploring the biological roles of glycans; pp. 57–68.



ÖZGEÇMİŞ

İLAHA MUSAYEVA
e-mail: ilahe1210@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2015-2017	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans 2011-2015	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul