T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN İNTERLÖKİN 7 GENİNİN (*IL7*) MOLEKÜLER KLONLAMASI

GAMZE KORKUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. SEMRA HASANÇEBİ

Eş Danışman: Arş. Gör. Dr. GÜNSELİ KURT GÜR

EDİRNE-2019

GAMZE KORKUT'un hazırladığı "İNSAN İNTERLÖKİN 7 GENİNİN (*IL7*) MOLEKÜLER KLONLAMASI" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri: İmza

Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YABAŞ

Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ

Tez Savunma Tarihi: 27/08/2019

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ
Tez Danışmanı

Arş. Gör. Dr. Günseli KURT GÜR
İkinci Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

27/08/2019

Gamze Korkut

Yüksek Lisans Tezi
İnsan İnterlökin 7 Geninin (*IL7*) Moleküler Klonlaması
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

İnsana ait interlökin 7 (IL-7) immünolojide uzun süredir T hücreleri ve B hücreleri üzerindeki etkileri bilinen bir sitokindir. IL-7'nin B ve T hücresi proliferasyonu için gerekli olduğu ve IL-7'nin eksikliğinin immün sistem hücrelerinin gelişimin durmasına neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar, IL-7'nin antijene spesifik T-hücre yanıtlarını uyarma veya arttırma kabiliyeti ve geniş sitotoksik aktiviteleri nedeniyle antitümör ve antiviral tedavi için *in vitro* kullanılabileceğini ortaya konmuştur. Ek olarak hematopoetik kök hücreleri mobilize etme kabiliyeti sayesinde, radyasyona maruz kalma, kemoterapi ve kemik iliği/kök hücre nakli sonrası T-hücre homeostazisinin rekonstrüksiyonuna önemli bir katkı sağladığı da gösterilmiştir. Bu araştırmalar sonucu IL-7'nin, T hücresi azalmış/tükenmiş hastalarda (kanser, kemik iliği nakli ve AIDS) umut verici bir potansiyele sahip olduğu ve bu hastalarda terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışmasında; IL-7'ye olan talep göz önüne alınarak *IL7*'nin *Escherichia coli* (*E.coli*) bakterisine klonlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla; *IL7*'nin insan mononükleer beyaz kan hücrelerinden izolasyonu yapılmış ve iki farklı klonlama vektörü (pCR-BluntII-TOPO ve pJET 1.2/Blunt) kullanılmıştır. h*IL7* DNA'sı yerleştirilmiş rekombinant vektörlerin, *E. coli* bakterisinin *DH5α* suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Trasformasyon sonucu elde edilen olası transgenik bakteri kolonileri, moleküler analizlerle doğrulanmaya çalışılmış ve h*IL7* taşıyan 3 adet *E.coli* bakteri kolonisi elde edilmiştir. Tez çalışması ile IL-7'nin bakteriyel sistemler tarafından

rekombinant üretimi için gerekli ilk adımı oluşturulmuş ayrıca bilgi ve kaynak yaratılmak istenmiştir.

Yıl : 2019

Sayfa Sayısı : 75

Anahtar Kelimeler : IL-7, *IL7*, Rokombinant IL-7, Rekombinant DNA Teknolojisi, Biyoteknoloji, Biyofarmasötik ilaçlar

Master's Thesis
Molecular Cloning of Human Interleukin 7 Gene (*IL7*)
Trakya University Institute of Natural Sciences
Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Human interleukin 7 (IL-7) is a cytokine whose effects on T cells and B cells have long been known in immunology. It is known that IL-7 is necessary for B and T cell proliferation and that the deficiency of IL-7 causes the development of the immune system cells to halt. Furthermore, studies have shown that IL-7 can be used in vitro for antitumor and antiviral therapy because of its ability to stimulate or enhance antigen-specific T-cell responses and its broad cytotoxic activities. In addition, its ability to mobilize hematopoietic stem cells has been shown to make a significant contribution to the reconstruction of T-cell homeostasis after radiation exposure, chemotherapy and bone marrow/stem cell transplantation. These studies have shown that IL-7 has a promising potential in T-cell depleted/depleted patients (cancer, bone marrow transplantation and AIDS) and can be used as a therapeutic agent in these patients. In this thesis; in view of the demand for IL-7, it was aimed to clone the *IL7* into *Escherichia coli* (*E.coli*). For this purpose; The *IL7* was isolated from human mononuclear white blood cells and two different cloning vectors (pCR-BluntII-TOPO and pJET 1.2/Blunt) were used. Recombinant vectors with *IL7* DNA insert were transformed into the *DH5α* strain of *E. coli*. Possible transgenic bacterial colonies obtained from the transformation were tried to be confirmed by molecular analysis and three *E. coli* bacterial colonies bearing the *IL7* were obtained.

In this thesis, the first step of IL-7 for recombinant production by bacterial systems was accomplished and intended for information and resource to create.

Year: 2019
Number of Pages:75
Keywords: IL-7, *IL7*, Recombinant IL-7, Recombinant DNA Technology, Biotechnology, Biopharmaceuticals

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tezinin gerçekleşmesinde, iki yıl süreyle her türlü desteğini esirgemeyen akademik danışmanım Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ'ye (Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) teşekkürlerimi borç bilirim. Çalışmalarımızı yürütmemizde bize destek veren Prof. Dr. Oğuzhan DOĞANLAR (Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı) ve Prof. Dr. Zeynep Banu DOĞANLAR (Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı)'a teşekkür ederim. Yardımını esirgemeyen Uzm. Ayten Doğan' a ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan annem, babama ve sevgili kardeşim Emre KORKUT'a sonsuz teşekkürler ediyorum.

Gamze KORKUT, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR vii
İÇİNDEKİLER viii
SİMGELER DİZİNİ xi
KISALTMALAR DİZİNİ xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ xv
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 6
GENEL BİLGİLER 6
2.1. Rekombinant DNA Teknolojisi 6
2.2. Rekombinant Biofarmasötikler 8
2.3. İlaç Sektörü ve Biyoteknolojik İlaçlar 10
2.4. Türkiye'de Biyoteknolojik İlaçlar 12
2.5. Sitokinler ve Rekombinant Formları 13
2.6. *IL7* ve Klonlama Çalışmaları 18
BÖLÜM 3 21
MATERYAL VE METOD 21
3.1. *IL7* İzolasyonu 21
3.1.1. Materyal 21
3.1.2. Mononükleer Beyaz Kan Hücrelerinin Ayrıştırılması 21
3.1.3. DNA İzolasyonu 22
3.1.4. Primer Dizaynı 23
3.1.5. gDNA'dan *IL7*'nin PCR ile Çoğaltımı 24
3.1.6. Total RNA İzolasyonu 27

3.1.7. cDNA Sentezi ... 28
3.1.8. Geninin Çoğaltılması ... 28
3.1.9. *IL7*'nin Jelden Geri Kazanımı ... 29
3.2. *IL7*'nin Klonlanması ... 30
3.2.1. Klonlama Vektörleri ... 30
3.2.2. *IL7* 'nin pJET 1.2/ Blunt Vektörüne Yerleştirilmesi ... 31
3.2.3. *IL7*'nin pCR-BluntII-TOPO Vektörüne Yerleştirilmesi ... 32
3.2.4. Bakteriye Transformasyon ... 32
3.2.4.1. Bakteri Kaynağı ... 32
3.2.4.2. Besiyeri ... 33
3.2.4.3. Transformasyon ... 33
3.3. Transformantların Analizi ... 35
3.3.1. Besiyerinde Seleksiyon ... 35
3.3.2. PCR ile Doğrulama ... 35
3.3.3. Dizi Analizi ile Doğrulama ... 37
3.3.3.1. Plasmid İzolasyonu ... 37
3.3.3.2. Plasmid DNA'sından PCR ile *IL7* Eldesi ve Dizi Analizi ... 37
3.4. Transformant Bakterilerin Stoklanması ... 38
BÖLÜM 4 ... 39
BULGULAR ... 39
4.1. *IL7*'nin İzolasyonu ... 39
4.1.1. Mononükleer Beyaz Kan Hücrelerinin Ayrıştırılması ... 39
4.1.2. DNA İzolasyonu ... 39
4.1.2. DNA İzolasyonu ... 40
4.1.3. gDNA'dan *IL7*'nin PCR ile Çoğaltımının Optimizasyonu ... 40
4.1.4. cDNA'dan *IL7*'nin PCR ile Çoğaltımı ... 42
4.2. *IL7*'nin Klonlanma Vektörüne Bağlanması ... 43
4.2.1 *E. coli*'ye Transformasyon ... 43
4.3. Transformantların Analizi ... 45
4.3.1. PCR ile Doğrulama ... 45
4.3.1.1. pJET1.2/Blunt İçin PCR ile Doğrulama ... 45
4.3.1.2. pCR-BluntII-TOPO İçin PCR ile Doğrulama ... 47
4.3.2. Dizi Analizi ile Doğrulama ... 49
BÖLÜM 5 ... 51

TARTIŞMA VE SONUÇ.....51
KAYNAKLAR 54
EK.....59
EK-1. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Raporu.. 59
ÖZGEÇMİŞ.....60

SİMGELER DİZİNİ

%:	Yüzde
°C:	Santigrat derece
µl:	Mikrolitre
bç:	Baz Çifti
Da:	Dalton
dk:	Dakika
g:	Gram
kDa:	Kilo Dalton
M:	Molarite
mg:	Miligram
mL:	Mililitre
mm:	Milimetre
mM:	Milimolar
µM:	Mikromolar
ng:	Nanogram
pg:	Pikogram
rpm:	Rounds Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
s:	Saniye
U:	Ünite
vd.:	Ve diğerleri
xg:	Relative centrifugal force (RCF) birimi

KISALTMALAR DİZİNİ

AIDS:	Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
$CaCl_2$:	Kalsiyum Klorür
cDNA:	Komplementer DNA
CHO:	Çin Hamster Yumurtalık Hücresi
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
DPBS:	Dulbecco fosfat tamponlu salin
E. coli:	*Escherichia coli*
E5:	Elüsyon buffer
FDA:	Amerikan İlaç ve Gıda Onay Dairesi (Food and Drug Administration)
G-CSF:	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
gDNA:	Genomik DNA
hIL-7:	İnsan İnterlökin 7
HIV:	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPV:	İnsan Papilloma Virüsü
IFN:	İnterferon
IL:	İnterlökin
IL7:	İnsan İnterlökin 7 Proteini
IL-1:	İnsan İnterlökin 1 Proteini
IL-1β:	İnsan İnterlökin 1β Proteini
IL-2:	İnsan İnterlökin 2 Proteini
IL-3:	İnsan İnterlökin 3 Proteini
IL-6:	İnsan İnterlökin 6 Proteini
IL7:	İnsan İnterlökin 7 Geni
IL-7:	İnsan İnterlökin 7 Proteini

IL-7Ra:	İnsan İnterlökin 7 Reseptör Alfa
IL-9:	İnsan İnterlökin 9 Proteini
IL-11:	İnsan İnterlökin 11 Proteini
IL-20:	İnsan İnterlökin 20 Proteini
İEİS:	İlaç Endüstrisi İşverenler Sendikası
İ.Ü.:	İstanbul Üniversitesi
LB:	Luria-Bertani
mAb:	Monoklonal Antikor
MCS:	Çoklu Klonlama Bölgesi (Multi Cloning Site)
NaCl:	Sodyum Klorür
NCBI:	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
NF Su:	Nükleazdan Ari Su
ORF:	Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
PCR:	Polymerase Chain Reaction
rDNA:	Rekombinant DNA
rhIL-7:	Rekombinant İnsan İnterlökin 7 Proteini
RNA:	Ribonükleik Asit
T1DM:	Tip 1 Diabetes Mellitus
Tm:	Erime Sıcaklığı
TNF:	Tümör Nekrozis Faktör
TNF-α:	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
TOPO:	Topoizomeraz
VEGFR:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
WBI:	Yıkama Tamponu I (Wash Buffer I)
WBII:	Yıkama Tamponu II (Wash Buffer II)
RE:	Restriksiyon Enzimi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2018 Dünya ilaç pazar payları 11
Şekil 2.2. Dünya genelinde reçeteli ilaç satışlarını dağılımı ve tahminleri 11
Şekil 2.3. Değer bazında biyoteknolojik İlaçlar 13
Şekil 2.4. *IL7*'nin genomdaki konumu 18
Şekil 3.1. pJET1.2 / Blunt vektörü haritası 30
Şekil 3.2. pCR ™ -Blunt II-TOPO vektör haritası 31
Şekil 4.1. Santrifüj sonrası kan-histopaque karışımında mononükleer beyaz kan hücreleri 39
Şekil 4.2. gDNA jel görüntüsü 40
Şekil 4.3. IL-7 Forward / IL-7 Reverse primer çifti ile gDNA gradient PCR jel görüntüsü 42
Şekil 4.4. Platinum taq DNA polymerase ile cDNA'dan çoğaltılan IL7'nin jel görüntüsü 43
Şekil 4.5. pJET 1.2/Blunt vektörle transformasyon (LB+50 mg/mL ampisilin) 44
Şekil 4.6. pCR-BluntII-TOPO vektörle transformasyon (LB+50 mg/mL kanamisin) 44
Şekil.4.7. *IL7*'ye ait primerler ile yapılan koloni PCR sonucu 45
Şekil 4.8. pJET 1.2/Blunt vektör haritası 46
Şekil 4.9. pJET1.2/Blunt vektörü dizileme primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu 46
Şekil.4.10. *IL7*'ye ait primerler ile yapılan koloni PCR sonucu 47
Şekil 4.11. pCR-Blunt II-TOPO vektör haritası 48
Şekil 4.12. pCR –BluntII-TOPO vektörünün primerleri (M13) ile yapılan koloni PCR sonucu 48
Şekil 4.13. pJET1/2.Blunt vektörüne klonlama sonucu elde edilen kolonilerden izole edilen plazmit DNA'ları 49
Şekil 4.14. Dizi analizi için plazmid DNA'sı kullanılarak çoğaltılan *IL7*'yi temsil eden DNA (650 bç) bantları 50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. FDA onaylı bazı biyofarmasötik proteinler 4
Çizelge 2.1. Rekombinant Sitokinler 15
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan primerler 24
Çizelge 3.2. gDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan PCR İçeriği(Taq Polimeraz)25
Çizelge 3.3. gDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan PCR İçeriği (Farklı Master Miksler + Farklı Konsantrasyon $MgCl_2$) 25
Çizelge 3.4. gDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan PCR İçeriği (AQ90 DNA Polimeraz + Farklı Konsantrasyon $MgCl_2$)..... 26
Çizelge 3.5. gDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan PCR İçeriği (Platinum Taq DNA Polimeraz + Farklı Konsantrasyon $MgCl_2$)..... 26
Çizelge 3.6. gDNA'da uygulanan gradient PCR metodu 27
Çizelge 3.7. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyonun içeriği..... 28
Çizelge 3.8. IL-7'nin çoğaltılması için hazırlanan PCR içeriği 28
Çizelge 3.9. IL-7'nin çoğaltılması için hazırlanan PCR Metodu..... 29
Çizelge 3.10. Küt uç oluşturma reaksiyonu içeriği 31
Çizelge 3.11. pCR-BluntII-TOPO vektörüne bağlanma karışımı 32
Çizelge 3.12. LB Besiyeri İçeriği 33
Çizelge 3.13. Koloni PCR İçeriği 36
Çizelge 3.14. PCR Metodu 36
Çizelge 4.1. *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan optimizasyon çalışmalarının sonuçlrı.... 41

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İlk olarak 1919'da Karl Ereky'nin "Biyolojik sistemler yardımıyla hammaddelerin yeni ürünlere dönüştürüldüğü işlemler" olarak tanımladığı biyoteknoloji; günümüze kadar gelişen ve değişen modern tekniklerin uygulanması ile önemli ölçüde hem tanım, hem anlam ve hem de kapsam olarak gelişerek değişmiştir. Geleneksel biyoteknoloji zamanlarında organizmalar hiçbir modifikasyona uğratılmadan, ekmek, peynir, alkollü içecekler, alkol, sirke, yoğurt gibi maddelerin üretiminde uygulanmıştır. Disiplinler arası bir bilim olan biyoteknoloji; yaşam bilimleri, bilgisayar ve mühendislik bilimlerindeki gelişmeler ve yeni buluşlar ile daha ileriye taşınmış, var olan problemlere çözüm sağlar ve yenilerine çözümler arar hale gelmiştir. Böylece ortaya çıkan modern biyoteknoloji kavramı; DNA ve proteinler üzerinde modifikasyonlar yaparak organizmaları, insan için farklı amaçlarla kullanılabilir hale getirmeyi başarmış, sağlıktan gıdaya, endüstriden çevreye çok fazla uygulama alanı bulmuştur.

Günümüzde dünya nüfusundaki artış hızı, insanların temel ihtiyaçlarını karşılama konusunda bir takım sorunları da beraberinde getirmektedir. Doğal kaynakların verimli kullanımı bile insan artışından kaynaklı ihtiyacı karşılayamaz hale gelmiştir. Bu durum göz önüne alındığında biyoteknolojinin sunduğu innovatif ve hızlı çözümler diğerleri arasında öne çıkmaktadır. Modern biyoteknoloji; tedavi edilemeyen hastalıklara tedavi imkânı, çevre ayak izimizi azaltma, dünya gıda problemine çözüm, daha az ve daha temiz enerji kullanımına olanak, üretim süreçlerinin verimini arttırmaya yönelik araçlar ve teknolojiler sunmaktadır.

Biyoteknolojinin şüphesiz ki en önemli uygulama alanlarının başında insan sağlığı gelmektedir ve bu alanda proteinler geniş kullanım potansiyelinden dolayı başlıca öneme

sahip moleküllerdir. Dolayısıyla proteini kodlayan DNA molekülü ve üzerinde modifikasyon yapabilme yetisi, insanoğluna ufku çok geniş bir alan açmıştır. 1953 yılında James D. Watson ve Francis Crick'in DNA'nın bugün kabul görmüş yapısını Nature dergisinde öne sürmelerinden 20 yıl sonra, 1973'te San Francisco'daki California Üniversitesi'nden Herbert Boyer ve Stanford Üniversitesi'nden Stanley Cohen, farklı türlerden genetik bilgiyi birleştiren ve çoğaltan fonksiyonel organizmaların inşasını bildirmişlerdir. Yaptıkları deneyler; rekombinant DNA teknolojisinin tıp ve farmakoloji, endüstri ve tarım üzerindeki potansiyelini çarpıcı bir şekilde göstermiştir. Böylece yeni ilaç geliştirmedeki bakış açısı, küçük moleküllü bileşiklerden büyük moleküllü proteinlere diğer bir deyişle biyofarmasötiklere (biyolojik/biyoteknolojik ürünler) yönelmiş ve 1982 yılında ilk biyofarmasötik ürün olan, rekombinant insülin-(Humulin), FDA tarafından onaylanmıştır (Quianzon&Cheikh, 2012).

Günümüzde modern tıp, hormonlar ve enzimler gibi biyolojik olarak aktif proteinleri yaygın olarak kullanmaktadır. Bu proteinlerin eldesi önceleri sadece hayvan vücutlarından ekstrakte edilerek sağlanmıştır. Günümüzde artan protein talebi için geleneksel hammadde kaynakları yetersiz kalmakta ve alternatif kaynaklar arasında biyoteknolojinin sunduğu çözümler göz doldurmaktadır. Bugün biyoteknoloji alanındaki hızlı gelişmeler, çeşitli biyolojik kaynaklardan hızlı ve yüksek miktarlarda rekombinant protein üretimine olanak sağlamaktadır.

Biyolojik yöntemlerle (kontrollü gen ekspresyonu, rekombinant DNA teknolojisi, antikor üretim metotları vb.) canlı organizmalardan (bakteri ve mantarlar, bitki ve hayvan hücre/dokuları) elde edilen polipeptid ya da protein yapıdaki ürünlere biyofarmasötikler denir. Bu kavram zaman zaman biyolojik/biyoteknolojik ürünler olarak da ifade edilmektedir.

Biyofarmasötiklerin birçok klinik uygulaması vardır. Hastalıkların önlenmesi, tedavi ve tanıda çeşitli avantajlar sağlarlar. Terapötik biyofarmasötik türleri esas olarak rekombinant protein terapisi, antikor terapisi ve hücre terapisini kapsar. Biyolojik aktivite göstererek hastalıkları güvenli ve etkili bir şekilde tedavi edebilir, hastalık patolojisi üzerine etki ederek spesifik işlevleri yerine getirebilirler. Örneğin aşılar, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi amaçlı kullanılan önemli biyofarmasötiklerdir. Günümüzde aşılar, genellikle patojene benzeyen bir biyolojik ajan içerir ve toksoidlerden (toksinler)

veya patojenin yüzey antijenlerinin (alt birimler) bir bölümünden yapılır. Geleneksel aşılar yalnızca bulaşıcı hastalıkları önlemek için kullanılırken biyoteknolojiye dayalı aşılar kanserler, tip I diabetes mellitus (T1DM), Alzheimer hastalığı gibi pek çok bulaşıcı olmayan hastalığı önlemek için de geliştirilmektedir; örneğin, insan papilloma virüsü (HPV) aşısı rahim ağzı kanserlerinin önlenmesi için onaylanmıştır. Hastalık tanısında kullanılan biyofarmasötiklere örnek olarak ise monoklonal antikorlar verilebilir. Monoklonal antikorlar bazı kanserlerin ve bulaşıcı hastalıkların tanısında başarıyla uygulanmıştır ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Belirli bir maddeye spesifik antikor üretildiğinde, bu maddenin varlığını tespit etmekte kullanılmaktadır. Antikorlar sabit doku bölümlerinde antijenleri tespit eden immünohistokimyada ve donmuş doku bölümlerinde veya canlı hücrelerde maddeyi tespit eden immünofloresans tanı testlerinin geliştirilmesi için de yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Chen&Yeh, 2018).

Biyofarmasötiklere birçok örnek verilebilir. Örneğin Neumega adıyla onaylanan oprelvekin, IL-11'in rekombinant formudur. *Escherichia coli*'de (*E. coli*) rekombinant DNA teknolojisi ile üretilir. Oprelvekin, kemoterapinin neden olabileceği düşük trombositleri önlemek için trombositler üretmek üzere kemik iliğini uyarmak için kullanılır. Trombositler kanın pıhtılaşmasını sağlayan ve kanamayı önleyen kan hücreleridir, bundan dolayı trombosit transfüzyonu ihtiyacını azaltmak için Oprelvekin verilebilir. Kanser tedavisine destek ilacı olarak 1997 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Oprelvekin, 2016) .

Bir diğer biyofarmasötik örneği Recombivax HB, maya hücrelerinde rekombinant DNA tekniği ile Hepatit B virüsüne karşı üretilen bir aşıdır. FDA tarafında 1986 yılında onaylanmıştır (Recombivax HB, 2018).

Etken maddesi Alteplazın olan Activase, FDA'nın Haziran 1996'da onayladığı bir doku plazminojen aktivatörüdür. Akut miyokard infarktüsü, akut iskemik inme ve akut masif pulmoner emboli tedavisi için aktivaz endikedir. Çin hamsterı yumutalık hücrelerinde rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmiştir (Tu, 2015).

FDA tarafından onaylanmış diğer bazı biyofarmasötik proteinler Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. FDA onaylı bazı biyofarmasötik proteinler (Lagassé vd., 2017)

Onaylanma tarihi	İlaç [Ticari adı, Sponsor]	Sınıf [Tanımı]	Tedavi alanı [Genel belirtiler]
09.03.2011	Belimumab [Benlysta, Human Genome Sciences]	mAb [İnsan anti-B-hücre aktive edici faktör (BAFF)]	İmmünology [Otoimmünite (lupus)]
25.03.2011	Ipilimumab [Yervoy, Bristol Myers Squibb]	mAb [İnsan anti-CTLA-4]	Dermatoloji/Onkoloji [Kanser (metanoma)]
15.06.2011	Belatacept [Nulojix, Bristol Myers Squibb]	Fc fusion [CTLA-4 Fc-fusion]	İmmünology/Nefroloji [Nakil reddi (böbrek)]
19.08.2011	Brentuximab vedotin [Adcetris, Seattle Genetics]	Antikor ilaç eşleniği [Fare/insan kimerik anti-CD30]	Hematoloji/Onkoloji [Kanser (lenfoma)]
18.11.2011	Asparaginase erwinia chrysanthemi [Erwinaze, Jazz Pharmaceuticals]	Enzim [Asparaginase erwinia chrysanthemi]	Hematoloji/Onkoloji [Kanser (lösemi)]
17.01.2012	Glucarpidase [Voraxaze, BTG International]	Enzim [Glucarpidase]	Nefrolofi [Böbrek yetmezliği]
01.05.2012	Taliglucerase alfa [Elelyso, Pfizer]	Enzim [β-glucocerebrosidase]	Endokrinoloji/ Gastroenteroloji [Genetik bozukluk (Gaucher)]
03.08.2012	Ziv-aflibercept [Zaltrap, Sanofi-Aventis U.S.]	Fc-fusion [VEGFR Fc-fusion]	Gastroenteroloji/ Onkoloji [Kanser (kolorektal)]
29.08.2012	Tbo-fligrastim [Granix, Cephalon]	Büyüme faktörü [G-CSF]	Hematoloji/Onkoloji [Nötropeni]
17.10.2012	Ocriplasmin [Jetrea, ThromboGenics]	Enzim [Ocriplasmin]	Oftalmoloji [Göz durumu (semptomatik virteomaküler adezyon)]
14.12.2012	Raxibacumab [Raxibacumab, Human Genome Sciences]	mAb [İnsan anti-antraks koruyucu antijen (PA)]	Enfeksiyon ve Bulaşıcı hastalıklar [Bulaşıcı hastalık (inhalasyonel antraks)]
22.02.2013	Ato-trastuzumab emtansine [Kadcyla, Genentech]	Antikor ilaç eşleniği [Hümanize anti-HER2/neu emtansine konjuge	Ebelik, Jinekoloji/ Onkoloji [Kanser (meme)]
18.07.2013	Golimubab injection, for IV use [Simponi Aria, Janssen Biotech]	mAb [İnsan anti-TNFα]	Kas iskelet/Romatoloji [Otoimmünite (romatizmal artrit)]
21.10.2013	Tocilizumab [Actemra, Genentech]	mAb [İnsan anti-IL-6 reseptör]	Kas iskelet/Romatoloji [Otoimmünite (romatizmal artrit; jüvenil idiyopatik artrit)]

Biyoteknolojik ilaçların konvansiyonel ilaçlara göre daha iyi tedavi edici olmaları, yüksek aktivite göstermeleri, yan etkilerinin daha az olması ve az dozlarda dahi etki etmeleri açısından üstünlük sağlamaktadır. Tedavi edilemeyen hastalıklara çözüm

sunmaları popülerliğini giderek arttırmış ve dünya ilaç pazarının %25 ini oluşturmalarını sağlamıştır (Orhan, 2018).

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Rekombinant DNA Teknolojisi

Biyoteknolojinin kapsadığı birçok alt alan vardır ancak bunlar arasında genetik mühendisliği özel bir öneme sahiptir ve biyoteknolojiyi geleceğe taşıyacak olan en önemli bileşendir. Genetik mühendisliği ile bir organizmanın genomunda yapılabilen değişiklik, bazen tek bir baz değişimi ile bazen tüm bir gen dizisinin veya DNA bölgesinin eklenmesi veya çıkarılması şeklinde, bazen de tüm çekirdek DNA'sının değiştirilmesi veya füzyonu biçiminde olabilmekte hatta bazı durumlarda mitokondri ya da kloroplast modifikasyonu/transferi şeklinde gerçekleştirilebilmektedir. Bununla birlikte tüm bu değişikliklerin gerçekleştirilmesi için bir veya birçok aşamada rekombinant DNA (rDNA) teknolojisinden yararlanılmaktadır. rDNA bir yapay DNA formudur, moleküler klonlama gibi laboratuvar teknikleri kullanılarak farklı kaynaklardan genetik materyalleri biraraya getirip biyolojik organizmada bulunmayan yeni diziler yaratmaktır. Tüm organizmaların DNA moleküllerinin kimyasal yapısının aynı olması ve sadece nükleotid dizilimleri bakımından farklılık göstermeleri rDNA'yı mümkün kılmıştır. rDNA teknolojisi DNA segmentlerini biraraya getirmek (rekombine etmek) için kullanılan prosedür serileridir. Bir rDNA molekülü, iki veya daha fazla farklı DNA molekülünün bölümlerinden oluşturulur ve belirli koşullar altında bir hücreye transfer edilebilir, burada kendi başına veya bir kromozomal DNA ile bütünleştikten sonra replike olur (Shinde, Chavhan, Sapkal&Shrikhande, 2018).

rDNA, ilk olarak 1973'te Kaliforniya Üniversitesi'nden Herbert Boyer ve Stanford Üniversitesi'nden Stanley Cohen'nin *E. coli* restriksiyon enzimlerinin kullanarak yabancı DNA'nın plazmidlere entegre edilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Cohen, Chang, Boyer&Helling, 1973).

rDNA teknolojisi, bir takım özel enzimleri, özel tasarımlı vektör DNA moleküllerini, istenen dizilere sahip DNA moleküllerini kullanır. Bunlardan bir birine uygun uçlu DNA molekülleri yaratır ve tekrar farklı kombinasyonlarda bir araya getirip birleştirerek yeni DNA moleküllerinin üretimine yol açar. rDNA oluştururken kullanılan kaynak DNA molekülü herhangi bir türden olabilir örneğin bir bitki DNA'sı bir bakteri DNA'sı ile birleştirilebilir, bir insan DNA'sı başka bir memeli DNA'sı ile birleştirilebilir. Bunun dışında doğada bulunmayan DNA dizileri yapay olarak sentezlenip çok farklı organizmalara aktarılabilir.

rDNA oluşturulması, rekombinant proteinlerin üretimi için temel basamaktır. Asıl hedef konak olarak seçilen hücrede rekombinant genleri ekprese ederek istenilen proteini üretmektir. Bu teknolojinin ortaya çıkışı devrim niteliğindeki değişikliği de beraberinde getirmiştir. Mikroorganizmaları, hayvanları ve bitkileri değiştirerek etkinliği yüksek çok çeşitli terapötik ürünler üretmek için yeni fırsatlar sunmuştur (Shinde vd., 2018).

Günümüzde diyabet, büyüme, kistik fibroz ve pıhtılaşma bozuklukları gibi pek çok hastalık protein eksikliği ya da protein işlev bozukluğundan kaynaklanmaktadır. Bu patolojiler henüz gen tedavisi ile düzenli olarak tedavi edilemediğinden, *ex vivo* olarak üretilen fonksiyonel proteinlerin uygulanması gereklidir. Dünyada ve ülkemizde gün geçtikçe tedavi amaçlı kullanılmak üzere proteinlere talep artmaktadır. Doğal kaynaklardan üretimler sınırlı, maliyetleri yüksek ve hayvansal kaynaklardan üretimlerde enfeksiyon riskleri ortaya çıkmaktadır (Hoang, 2017). Bundan dolayı rDNA teknolojileri, terapötik protein üretimi için hızlı bir tercih haline gelmiştir. rDNA teknolojisi kaynak problemine çözüm getirmiş, maliyeti düşürmüş ve biyogüvenlik sorununa çözüm olmuştur.

rDNA teknolojisine dair orijinal prosedürlerin çoğu *E. coli*'ye dayalı olarak geliştirilmiştir, bu yüzden *E. coli* rekombinant protein üretiminde öncü konakçı olarak kabul edilir. *E. coli* genetiği ve fizyolojisi bilgi birikimi ve bu bakteriye uyarlanmış genetik mühendisliği araçlarının sayısının çok olmasından dolayı yeni rekombinant protein üretimi yapılırken ilk olarak tercih edilecek konakçıdır. *E. coli*, prokaryotlardan ve ökaryotlardan; stabil şekilde katlanmış, globüler proteinleri eksprese etmek için uygun bir konaktır. Büyük ölçekli protein ekspresyonu denemeleri, bakteriyel proteinlerin <%50'sinin ve bakteriyel olmayan proteinlerin <%15'inin, çözünebilir bir formda *E.*

coli'de eksprese edilebileceğini göstermiştir (Braun vd., 2008). Ayrıca *E. coli* hızlı büyüme kinetiğine sahiptir. Glikoz-tuz ortamlarında ve optimum çevre koşullarında, iki katına çıkma süresi yaklaşık 20 dakikadır. Bu, doymuş başlangıç kültürünün 1/100 oranında seyreltilmesiyle aşılanan bir kültürün birkaç saat içinde sabit faza ulaşabileceği anlamına gelir. Yüksek hücre yoğunluğu kültürlerine kolayca ulaşılır. Bir *E. coli* sıvı kültürünün teorik yoğunluk sınırının yaklaşık 200 g kuru hücre ağırlığı/L veya kabaca 1x 10^{13} yaşayabilir bakteri /mL olduğu tahmin edilir. Zengin besiyerleri hazır ve ucuz bileşenlerden hazırlanabilir. Eksojen DNA ile transformasyon hızlı ve kolaydır. *E. coli*'ye plazmid transformasyonu 5 dakika kadar kısa bir sürede gerçekleştirilebilir (Rosano&Ceccarelli, 2014). Bu sebepler *E. coli*'nin rekombinant protein üretiminde sıklıkla tercih edilmesini sağlamaktadır.

2.2. Rekombinant Biofarmasötikler

Biyofarmasötikler; bir organizmaya ait genin başka bir canlıya transferine olanak veren rDNA teknolojisi, kontrollü gen ekspresyonu ya da antikor üretim metodları gibi biyoteknolojik yöntemler ile üretilen ürünlerdir. Bu teknoloji ile vücudun kendi ürettiği doğal protein ve hormonların endüstriyel boyutta üretimlerinin, laboratuvar ortamında hücre kültürleri aracılığıyla yapılması sağlanmıştır. Biyoteknolojik ilaçlar olarak da ifade edilen biyofarmasötikler, peptid ve proteinler temelli olduklarından konvansiyonel ilaçlara göre yüksek molekül ağırlığına ve kompleks yapılara sahiptirler (On soruda biyoteknolojik ilaçlar, 2016). Biyoteknolojik ilaçlar vücutta doğal olarak üretilen proteinin etkinliğini göstermesi nedeniyle önemli avantajlar sağlamaktadırlar. Bu sayede geçmişte tedavi edilemez denen birçok hastalık için tedavi şansı doğmuştur. Epoetin gibi bir biyolojik rekombinant ilaç 100'e yakın genle etkileşime girerek etki gösterirken konvensiyonel bir ilaç sadece birkaç etki alanına sahiptir. Boyut olarak konvansiyonel ilaçlardan 100-1000 kat daha büyüktürler. Örneğin bir kovansiyonel ilaç olan Asprin 190 Da gelirken biyofarmasötik ilaçlar 19 kDa'dan (interferon-B gibi) 20,000 kDa boyutuna kadar ulaşabilmektedir (Şardaş&Akgül, 2014). Bu da biyofarmasötik ilaçlara tedavi üstünlüğü sağlamaktadır. Biyofarmasötik sektörü ortaya çıktığında ilk kullanılan platform bakteriler olmuş, bunu mayalar takip etmiştir. Günümüzde böcek hücreleri, bitkiler ve memeli hücreleri talepleri karşılamada kullanılsa da pazarlanan

biyofarmasötiklerin yaklaşık %30'u hala bakterilerden üretilmektedir (Sanchez-Garcia vd., 2016).

Rekombinant olarak düzenlenen ilk terapötik ajan, *E. coli* bakterisinde sentezlenen insülindi. Öncelerde domuz ve sığır pankreas dokusu, uzun yıllar boyunca insülin hormonun kaynağıydı, bunu hayvan insülininin modifikasyonu ile elde edilen yarı sentetik insan insülini izledi. Rekombinant teknolojinin gelişimiyle üretilen rekombinant insan insülini önceki üretim metotlarının yerini almış ve maliyeti düşürmüştür. Rekombinant insan insülininin saflığının ve farmasötik kalitesinin, hayvan ve yarı-sentetik insülinden üstün olduğu kanıtlanmıştır (Landgraf& Sandow, 2012).

Hemofili hastalarında Faktör VIII adı verilen bir kan pıhtılaşma faktörü eksiktir. Yirminci yüzyılın ilk yarısında, hastalığın tek tedavisi tam kan nakliydi. 1950'lerde Faktör VIII içeren kan plazması ürünleri mevcuttu. 1981 yılında AIDS salgını başlayınca kan nakli yapılan binlerce hemofili hastası AIDS'e yakalandı. Hemofilik Ryan White, kan transfüzyonu ile AIDS bulaşan bir çocuktu. Durumu 1985 yılında Indianada Kokomo kasabasında okuduğu okulda duyulunca veliler ve okul yetkililerince okulda varlığına itiraz edildi. Sağlık yetkilileri bulaşma riskinin neredeyse imkânsız olduğu yönünde ısrar etse de, yerel okul yönetimi White'ın derslere girmesini engelledi. Yasal bir savaş başladı. Kamuoyunda konu çok ses getirdi ve ünlüler dahil bir çok kişi White'ı desteklemek, AIDS e karşı bilinç oluşturmak için Indiana'ya akın etti. Indiana Eğitim Bakanlığı araya girdi ve White'ın okula dönmesine izin verdi. Dava, hemofili hastalarını ulusal spot ışığı altına taşıdı. Ryan White, Nisan 1990'da on sekiz yaşında vefat ederken, Ağustos ayında, Kongre, AIDS'le yaşayan insanların bakımı ve tedavisi için federal fonlar sağlayan Ryan White Kapsamlı AIDS Kaynakları Acil Durum (CARE) Yasasını kabul etti. Böylece AIDS salgını, ticari biyoteknoloji endüstrisinin ortaya çıkması için önemli bir zemin oluşturmuştu. İki eski biyoteknoloji şirketi olan Genentech ve Genetics Institute, Inc. hayati pıhtılaşma faktörünün güvenli bir rekombinant versiyonunu üretmek için çalışmalara başladı. İki şirkette araştırmalar başladığında, AIDS krizi patlamıştı Halk sağlığı yetkilileri kirlenmiş kan ürünlerinin hemofilikler için ciddi bir tehdit oluşturduğunu ve Faktör VIII genini klonlama çabalarının aciliyetinin daha belirgin hale geldiği önemi üzerinde duruyordu. Genentech ve GI'deki araştırmacılar, Faktör VIII genini klonlamanın, büyük boyutundan ötürü (186 kb, 26 ekson) olağanüstü derecede zor olacağını tahmin ediyordu, uzun çalışmalar sonucu GI'nin Recombinate® ürünü Aralık

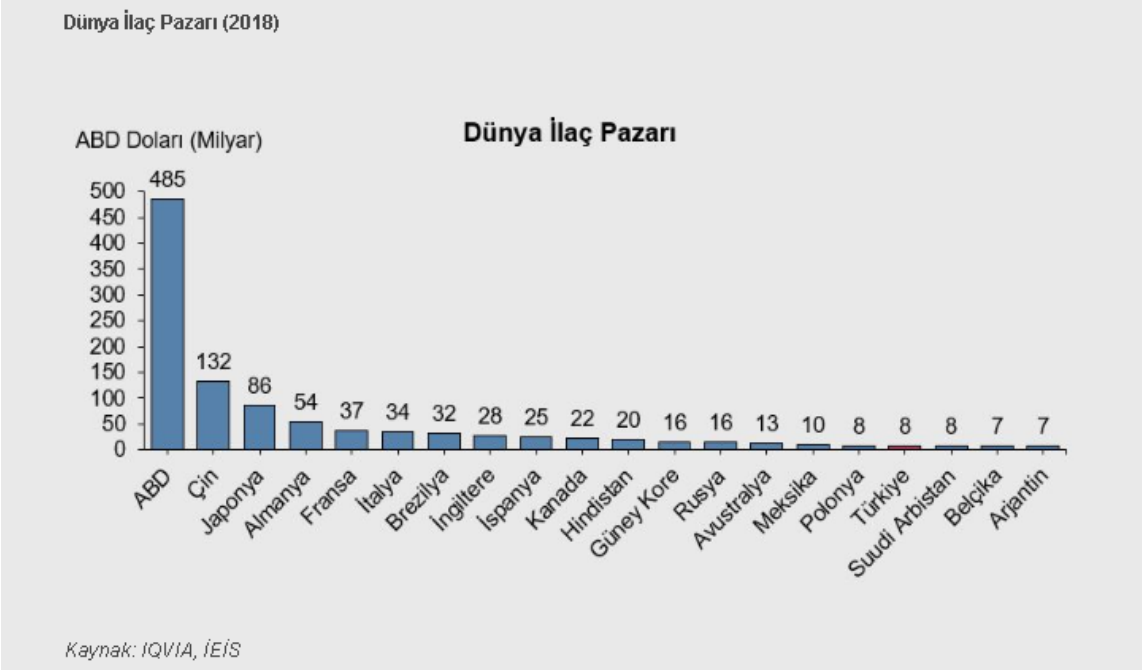
1992'de satışa sunuldu (The Race to Clone Factor VIII, 2016). Rekombinant faktör VIII, kan nakliyle HIV kapan hemofilik hastalar için güvenli bir tedavi olanağı sunmuş oldu. Bugüne kadar, yaklaşık 650 protein ilacı dünya çapında onaylanmıştır, bunların 400 kadarı rekombinant teknolojilerle elde edilmiş ve canlı organizmaları içeren teknolojiler tarafından üretilen terapötik ürünlere atıfta bulunan bir terim olan biyofarmasötikler olarak onaylanmıştır. Diğer 1300 protein adayı geliştirilmekte olup, bunların yaklaşık %50'si klinik öncesi çalışmalarda ve diğer %33'ü klinik çalışmalarda bulunmaktadır (Sanchez-Garcia vd., 2016).

2.3. İlaç Sektörü ve Biyoteknolojik İlaçlar

Dünyada geniş kitlelerin ilaca erişimi arttıkça ortalama yaşam süresi de artış göstermiştir. Bazı hastalıkların tedavilerinde kesin çözümlere ulaşılamasa bile hastaların daha kaliteli bir hayat sürmesi temin edilebilmektedir. Bundan dolayı her geçen gün ilaç sektörüne olan talep artarak büyümektedir.

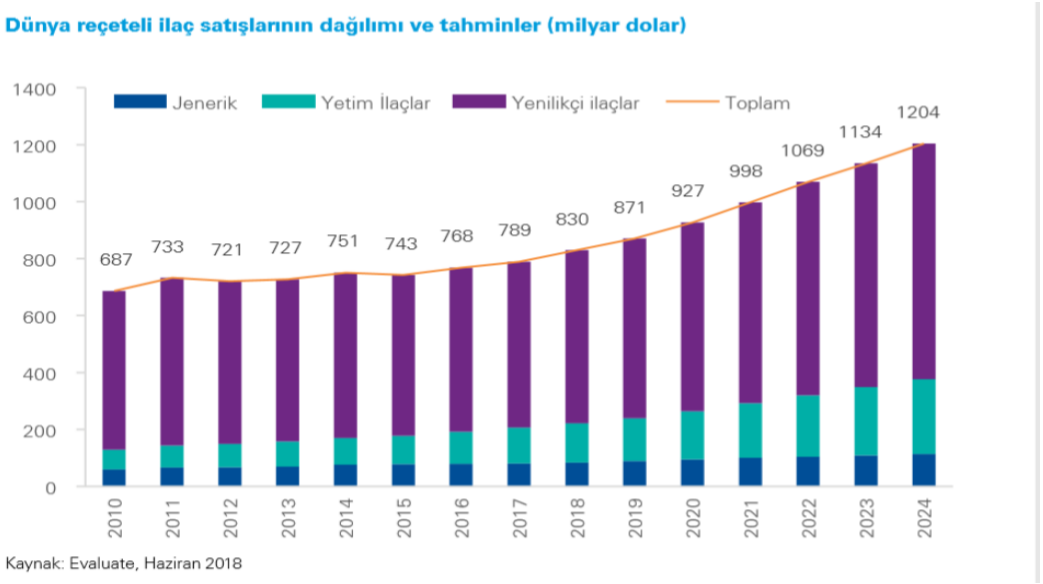
Dünyada ilaç sektörüne bakacak olduğumuzda yeni ilaçların satışında ABD %64.1'lik payla ilk sırada yer almakta, onu %18.1 ile Avrupa birliği ve %7.1 ile Japonya takip etmektedir. Ülke bazında harcamalar sıralamasında ABD, Çin ve Japonya ilk üçü oluşturmaktadır (Orhan, 2019).

2018 yılında dünyada 1 trilyon 200 milyar dolar ilaca yönelik harcama yapılmıştır, bu rakamın 2019'da 1.3 trilyon dolara çıkması ve önümüzdeki 5 yıllık süreçte de pazarın 1.5 trilyon dolar büyüklüğünde olması beklenmektedir. Önümüzdeki 5 yıllık süreç için büyümenin gelişmiş ekonomilerin öncülüğünde yeni ürünler üzerinden olması beklenmekte gelişmekte olan ekonomilerde ise pazarın Çin, Brezilya ve Hindistan kaynaklı olarak yavaş büyüyeceği düşünülmektedir. İlaçta gelişen pazarlar (pharmerging markets) olarak tanımlanan Türkiye, Mısır ve Pakistan gibi ülkelerde bu beş yıllık süreçte büyümenin güçlü olacağı tahmin edilmektedir (Orhan, 2019). Dünya ilaç pazarında ülkelerin 2018 yılı payları şekil 2.1'de gösterilmiştir. Türkiye 2018 yılında dünyada 17. sıradadır (Dünya İlaç Pazarı, 2018).



Şekil 2.1. 2018 Dünya ilaç pazar payları

Dünya genelinde reçeteli ilaçların 5 yıllık süreçte her yıl ortalama %6.4 oranında büyüyeceği beklenmektedir. Burda en hızlı artışın 2018 yılında %16.6'lık bir paya sahip yetim ilaçlarında olacağı ve yetim ilaçların 2024 yılında %21.8'lik bir paya ulaşması tahmin edilmektedir. Eşdeğer ilaçların paylarının %10.1'den %9.5'e gerileyeceği öngörülmektedir. Şekil 2.2.'de Dünya genelinde reçeteli ilaç satış dağılımları ve tahminler verilmiştir (Orhan, 2019).



Şekil 2.2. Dünya genelinde reçeteli ilaç satışlarını dağılımı ve tahminleri

İlaç sektöründe AR-GE harcamaları, 2018 yılında 172 milyar dolar seviyesinde hesaplanırken bu rakamın 2024 yılında 204 milyar dolar seviyesine çıkması beklenmektedir (Orhan, 2019). Pazar büyümesi, daha önce tedavi edilemeyen hastalıkların biyofarmasötiklerle tedavi edilme şanslarının artmasından dolayı olduğu kabul edilmektedir ve bu da biyofarmasötikler için büyük pazar talebine neden olmaktadır.

Yüksek spesifik aktivite göstermeleri, az dozda dahi etki etmeleri ve yan etkilerinin konvensiyonellere oranla az olması biyofarmasötiklerin avantajları arasındadır ancak bu moleküllerin en önemli yanı semptomları tedavi etmek yerine hastalıkları iyileştirme potansiyeline sahip olmalardır (İlbasmış Tamer vd., 2016).

Biyofarmasötikler, son on yılda kanser ve AIDS kaynaklı ölümlerin sayısını azaltmış ve bu da küresel pazarda biyofarmasötiklerin kabul edilmesinde bir artışa yol açmıştır (Biopharmaceuticals Market - Growth, Trends, And Forecast (2019 - 2024), 2019).

Avantajları göz önüne alındığında bu alanda Ar-Ge çalışmaları hız kazanmıştır. Dünya'da biyofarmasötik Ar-Ge harcamaları 2017 yılında 45.7 milyar dolar ile rekor seviyeye ulaşmıştır. 2018 yılında biyofarmasötik global pazarı 237 milyon dolara ulaşmıştır. %8.59 luk büyümeyle 2024 yılına kadar 389 milyon dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Biopharmaceuticals Market - Growth, Trends, And Forecast (2019 - 2024), 2019).

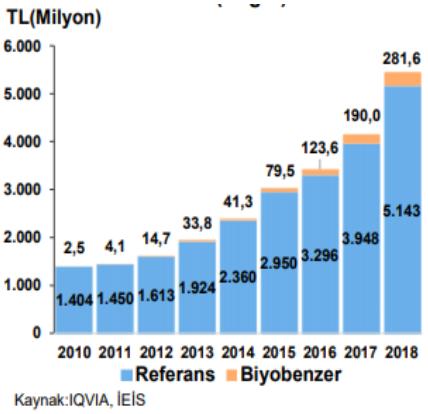
2.4. Türkiye'de Biyoteknolojik İlaçlar

Dünyadaki gelişim hızı ve konvansiyonel ilaçlara göre avantajları, biyofarmasötik ilaçları ülkemizde de ilgi odağı ve önemli bir yatırım alanı haline getirmiştir. Dünyada biyoteknolojik ilaç kullanımı oranı %20'leri aşmış durumda ve artmaya devam etmektedir. Türkiye için de durum aynıdır. Türkiye İlaç Endüstrisi İş Verenler Sendikası (İEİS) ilaç sektörü raporuna göre Türkiye'de biyofarmasötik ilaçlar, 2018 yılında, 5.4 milyar TL ile reçeteli ilaç pazarının %17.6'sını oluşturmuştur (Türkiye İlaç Sektörü Raporu, 2019).

Türkiye'de ruhsatlı 107 markanın 252 formda referans biyoteknolojik ilacı ve 23 markanın 83 formda biyobenzer ilacı bulunmaktadır. Biyobenzer 7 ürünün tüm formları

dahil toplam 29 adet ilacı ülkemizde üretilmektedir. 2 adet referans biyoteknolojik, 39 adet biyobenzer, 1 adet biyoüstün ilacın 2024 yılına kadar ülkemizde üretilmesi için çalışmalar sürmektedir (Türkiye İlaç Sektörü Raporu, 2019).

Referans biyoteknolojik ürünleri 2018 yılında %30.3 büyüyerek 5.1 milyar TL büyüklüğe, biyobenzer ilaç pazarı ise %48.2 artış göstererek 282 milyon TL'ye ulaşmıştır. Veriler Şekil 2.3.'te görülmektedir (Türkiye İlaç Sektörü Raporu, 2019).



Şekil 2.3. Değer bazında biyoteknolojik İlaçlar

Rekombinant proteinler için pazar ve potansiyel, sürekli olarak genişlemektedir. Ülkemizde kan ürünleri ve onkoloji ilaçlarının rekombinant formları için dışa bağımlılık söz konusudur. Bu rekombinant proteinlerin ülkemizde üretimi sağlandığında; hastaların ilaçlara erişimi artacak, kamu sağlık bütçelerinin daha verimli kullanılmış olacak ve ithal ilaçlarda dışa bağımlılık azalacaktır. Bu amaçla biyoteknolojik yatırımlara getirilmiş çeşitli teşvik ve düzenlemeler mevcuttur. Yürürlükte olan teşvik sisteminde; OECD yüksek teknolojili ürün sınıfında yer alan ürünler (yani ilaç yatırımları) öncelikli yatırım konuları arasına dahil edilmiştir. Teşvik sisteminde; yatırım yerinden bağımsız olarak KDV ve Gümrük Vergisi istisnası, indirimli Kurumlar Vergisi, sigorta primi desteği ile faiz desteği gibi destekler mevcuttur (Orhan, 2018).

2.5. Sitokinler ve Rekombinant Formları

Sitokinler, immün sistemin regülasyonunda ve enflamatuar olaylarda önemli rolü olan moleküllerdir. Sitokinler yabancı antijenlere ve ajanlara karşı organizmanın reaksiyonlarının kontrol edip, düzenlerken aynı zamanda hücreler arası ilişkileri

düzenlerler. Lenfositlerin meydana getirdiklerine lenfokin, monositlerin meydana getirdiklerine monokin denir. Sitokinlerin salgılanması; çoğu hücrenin aktivasyonundan sonra gerçekleşmektedir. Ve hücrelerden istirahat halindeki sitokin salgılanmamaktadır. Sitokinler, lenfositler ve makrofajlar gibi immün sistem hücrelerini aktive etme yeteneğine sahip hormonlara benzer ancak özelleşmiş bir dokudan değil de çeşitli hücreler tarafından yapıldıkları için horman kabul edilmezler (Baykal, Karaayvaz & Kutlu, 1998).

Sitokinler, kendilerini salgılayan hücrelere (otokrin etki), yakındaki hücrelere (parakrin etki) veya bazı durumlarda uzak hücrelere (endokrin etki) etki edebilir (Zhang&An, 2007). 20–30 kDa ağırlığına sahip peptid veya glikoprotein yapısındadırlar. Molekül ağırlıkları oldukça küçüktür. 10^{-10}–10^{-15} molar konsantrasyonlar da dahi aktiftirler ve çözünür formda etkili olurlar (Akdoğan&Yöntem, 2018). Birçok farklı sitokin proteini ailesi vardır. Sitokinler ailesi; interferonlar (IFN), interlökinler (IL), kemokinler, mezenkimal büyüme faktörleri, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi ve adipokinleri içerir (Zdravkovic, Rosic, Lutovac&Zdravkovic, 2017).

Sitokinlerin üretimi geçicidir. Sağlıklı bireylerde sitokinler ya saptanamaz ya da vücut sıvısında/dokularda pg/mL konsantrasyonlarda bulunurlar. Sitokinlerin konsantrasyonlarının yükselmesi, inflamasyon veya hastalığın ilerlemesi ile ilişkili sitokin yolaklarının aktivasyonunu gösterir (Stenken&Poschenrieder, 2015). 1893'lü yıllarda William Coley'in belirli bakteriyel enfeksiyonlardan sonra bazı maling tümörlerin gerilediğini göstermesiyle sitokinlerin kanser patogenezi ve tedavisinde etkili olduğu ortaya çıkmıştır. 1970'lerde IFN'ler ve TNF'ler gibi tümör inhibe edici faktörlerin bulunması da bu görüşü desteklemiştir. Kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etme ve vücutta antitümör etkileri arttırmada önemli rol oynamaktadırlar (Akdoğan vd., 2018). Yüzlerce sitokin tespit edilmiştir ve bu proteinlerin bazıları şu anda terapötik ürünlerde, çoğunlukla kanser, otoimmün ve viral hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Lipiainen vd., 2014).

Çoğu sitokinin moleküler klonlaması yapılmış biyoteknolojik yöntemlerde daha fazla miktarda yapımı sağlanmıştır. FDA tarafından onaylanan bazı rekombinant sitokinler Çizelge 2.1'de görülmektedir (Lipiainen vd., 2014).

Sitokinlerin terapötik ajan olarak kullanılmalarının avantajları şunlardır; kimyasal ilaçların aksine enflamatuar sürece aracılık eden spesifik protein inhibe eder. Sitokinler, nötrleştirici antikorlar kullanılarak hayvan modellerinde ya da nakavt fareler gibi genetik modellerde iyi çalışılmıştır dolayısıyla sitokinlerle ilgili süreçler iyi bilinmektedir. Biyoteknolojik tekniklerdeki ilerlemelerle rekombinant proteinlerin ekspresyonu yüksek oranlarda saflaştırılması eskiye göre daha kolay ve ucuz hale gelmiştir (Rider, Carmi&Cohen, 2016). Günümüze kadar birçok recombinant sitokinin onayı verilmiş ve üretimi yapılmıştır, bunlardan bazıları Çizelge 2.1.'de görülmektedir.

Çizelge 2.1. Rekombinant Sitokinler (Lipiainen vd., 2014)

Sitokin	**Ticari adı (Firma)**	**Aktif bileşen**	**Üretim ortamı**	**Belirti**	**Yetkilendime tarihi**
IFN-β	Betaseron (US)/Betaferon (EU) (Bayer)	IFN-β-1b	*E. coli*	Çoklu skleroz	1993 (FDA) 1995 (EMA)
	Extavia (Novartis)	IFN-β-1a	CHO Hücreleri	Çoklu skleroz	2008 (EMA)
	Avonex (Biogen Idec)		CHO Hücreleri		2009 (FDA)
	Rebif (US: Serono, EU: Merck Serono	IFN-β-1a	CHO Hücreleri	Çoklu skleroz	1996 (FDA) 1997 (EMA)
	Europe)	IFN-β-1a		Çoklu skleroz	1998 (EMA) 2002 (FDA)
INF-γ	Actimmune (US) (Intermune/Vidara Ther.) /Imukin (EU) (Boehringer Ingelheim)	IFN-γ-1b	*E. coli*	Kronik granülomatöz hastalığı Osteopetrozis	1994 (Fimea) 1999 (FDA)
IL-2	Proleukin (EU: Novartis, US: Chiron) Ontak (Eisai)	Aldesleukin (rhIL-2)	*E. coli*	Renal hücreli karsinom Melanom	1992 (FDA) 1992 (Fimea)
		Denileukin diftitox	*E. coli*	T hücreli lenfoma	1999 (FDA)
IL-11	Neumega (Wyeth Pharms Inc.)	Oprelvekin (rhIL-11)	*E. coli*	Kemoterapinin neden olduğu trombositopeni	1997 (FDA)
GM-CSF	Leukine (Berlex/Sanofi)	Sargramostim (rhGM-CSF)	*S. cerevisiae*	Kemik iliği nakli Kanser	1991 (FDA)

İnterlökinler (IL) sitokin ailesinin bir grubudur. IL terimi, hücre çoğalması, olgunlaşma, göç ve yapışma dahil, kompleks immünomodülatör fonksiyonlara sahip bir grup sitokin tanımlamak için kullanılmıştır (Brocker, Thompson, Matsumoto, Nebert&Vasiliou, 2010). IL, ilk olarak tek başına lökositler tarafından eksprese edildiği, ancak daha sonra birçok başka vücut hücresi tarafından üretildiği bulunmuştur. İmmün

hücrelerin aktivasyonunda ve farklılaşmasında, ayrıca proliferasyon, olgunlaşma, göç ve yapışmada önemli rol oynarlar. Aynı zamanda proenflamatuar ve antienflamatuar özelliklere sahiptir. Bu nedenle, IL'lerin birincil işlevi, enflamatuar ve immün yanıtlar sırasında büyümeyi, farklılaşmayı ve aktivasyonu modüle etmektir. IL'ler, hücre yüzeylerinde yüksek afiniteli reseptörlere bağlanarak hücreler ve dokularda birçok reaksiyon ortaya çıkaran büyük bir protein grubundan oluşur. Hem parakrin hem de otokrin fonksiyonlara sahiptirler (Vaillant&Qurie, 2019). Klinik araştırmalarla ilgili yönü araştırmak için hayvan çalışmalarında da IL'ler, kullanılmaktadırlar (Akdis vd, 2011).

IL'ler, geçici olarak sentezlenirler ve çoğunu kodlayan haberci RNA sentez için stabil değildir. Sentezlendikten sonra hızla salınırlar. Hücrelerin IL'lere tepkileri, sitokin reseptörlerinin inhibitörlerini kodlayan genlerin katılımı ve indüklenmesi ile yukarı ve aşağı düzenleyici mekanizmaları içerir. IL'ler çoğu zaman diğer IL sentezini ve eylemlerini etkiler, örneğin, IL-1, IL-2'nin salınmasına yol açan lenfosit aktivasyonunu çalıştırır. (Vaillant vd., 2019).

Günümüzde farklı özelliklere sahip 40'tan fazla IL bilinmektedir. IL'ler; dizi homolojisi, reseptör bağlama özellikleri, biyolojik fonksiyon ve hücresel kaynaklara dayalı olarak sınıflandırılır. Çeşitli vücut hücrelerden sentezlenirler ve tek bir spesifik IL-20 farklı hücre tipine kadar sentezlenebilir. Ayrıca bir hücre birden fazla farklı IL sentezleyebilmektedir. Günüzde zorunlu ihtiyaçları karşılamak için rekombinant formları üretilmektedir (Zdravkovic vd., 2017).

Bazı rekombinant interlökinler ve endikasyonları şu şekilde sıralanabilir;

IL-1: Makrofajlar, büyük granül lenfositler, B hücreleri, endotel, fibroblastlar ve astrositler IL-1'i salgılar. T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar, endotel ve doku hücreleri başlıca hedeflerdir. IL-1, lenfosit aktivasyonu, makrofaj stimülasyonu, lökosit/endotel adezyonunun artması, hipotalamus stimülasyonuna bağlı ateş ve akut faz proteinlerinin karaciğer tarafından salınmasına neden olur (Almeida, Amaral&Lobão, 2011).

IL-2: Temel hedefler T hücreleridir. Başlıca etkileri T-hücresi çoğalması ve farklılaşması, sitokin sentezinin artması, Fas aracılı apoptozun güçlendirilmesi ve düzenleyici T hücresi gelişiminin desteklenmesidir. NK hücrelerinin proliferasyonuna ve aktivasyonuna ve B hücresi proliferasyonuna ve antikor sentezine neden olur. Ayrıca sitotoksik lenfositlerin ve makrofajların aktivasyonunu uyarır (Bachmann&Oxenius,

2007). FDA aldesleukin (Proleukin) adlı rekombinant IL2'yi onaylamıştır. Bu ilaç, renal hücre kanseri tedavisinde kullanılır ve etkisi, uygulanan rekombinant ilaç miktarı ile orantılıdır (Almeida vd., 2011).

IL-3: Bağışıklık sisteminin hastalığa doğal tepkisini artıran biyolojik sinyal olarak kabul edilen sitokindir. IL-3 reseptörüne bağlanarak etki eder. IL-3 kemik iliği kök hücrelerini uyarır (Sekhon, 2019).

IL-11: Oprelvekin, 177 amino asitten oluşan bir rekombinant insan IL-11 sitokindir. Kemik iliğinde megakaryositleri ve öncüllerini uyarır, böylece şiddetli trombositopeniyi önler ve yüksek miyelosupresif kemoterapi alan kanser hastalarında trombosit transfüzyonu ihtiyacını azaltır (Kishore& Krishan, 2009).

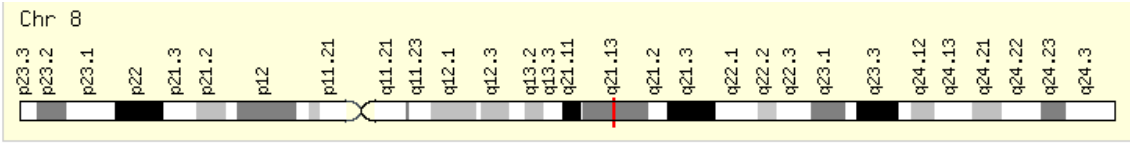
Rekombinant IL'lerin üretimi konusunda birçok çalışma bulunmaktadır; IL'lerle ilgili 2018 yılında yayınlanan bir makalede kanser araştırmalarında ve tümörlerin erken teşhisinde pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere IL-2'nin *E. coli* BL21 suşunda ekspresyonunu yapılmıştır. İnsana ait IL-2 proteinin cDNA'sının bir sentetik DNA dizisi, pRSET-B ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. *E. coli*'de [BL21] eksprese edilen IL-2 proteini, çözünmeyen inklüzyon cisimlerinin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, farklı ifade koşullarının, *E. coli*'de eksprese edilmiş bir ökaryotik proteinin çözünürlük davranışı üzerindeki etkisi, bir model protein olarak insan IL-2'si kullanılarak araştırılmıştır. Saflaştırılmış bir His-IL2 proteini, 1 L kültüründe 5.1 mg/pellet verimi ile elde edilmiştir (Hassan, El-Mowafy &Zaher, 2018).

Nausch vd., 2013 yılında yayımladıkları çalışmalarında insana ait IL-6'nın *E. Coli*'de rekombinant üretimini çalışmışlardır. Bu çalışmada, eksprese edilmesi zor bir proteine örnek olarak biyoaktif rekombinant insan IL-6'nın etkin ifadesi için temel ekspresyon yaklaşımlarını karşılaştırmışlardır. Toplama eğilimli IL-6, sitoplazmik şaperonları birlikte eksprese ederek en etkili şekilde çözünmüştür. Eksprese edilmiş proteini oksitleyici bir ortama hedeflemek, çözülebilir IL-6 oluşumunda etkili değildi. Birlikte ele alındığında, şaperonların varlığı ve azaltılmış bir yetiştirme sıcaklığı, büyük miktarlarda çözünür IL-6'yı izole etmek için etkili görünmektedir. Çözünebilir rekombinant proteinin nihai verimi, ortalama olarak 2.6 mg/L IL-6 elde edilmiştir (Nausch vd., 2013).

Bir başka çalışmada, IL-1β'nın *E. Coli*'de ekspresyonunu gerçekleştirmişler. Bu çalışma ile biyolojik olarak aktif olan büyük miktarlarda üretilebilen ve saf homojen insan IL-1β eldesi amaçlanmıştır.Bu çalışmada, sonuç olarak proteinin biyolojik olarak aktif olduğunu, mononükleer hücre faktörü (IL-1/MCF) tahlili ile $2x10^7$ U/mg ve lenfosit aktive edici faktör (IL-1/LAF) tahlili ile de $4x\ 10^7$ U/mg bulunarak göstermişlerdir (Wingfield vd., 1986).

2.6. *IL7* ve Klonlama Çalışmaları

IL-7, molekül ağırlığı 25 kDa olan kemik iliğinde, kemik iliği stromal hücreleri, dalak, timüs ve böbrek hücrelerinde sentezlenen sitokin grubuna ait bir peptiddir (Akyol, 1994). IL7, IL-7/IL-9 ailesine ait bir hematopoetik büyüme faktörüdür. İnterlökin 7, "IL7" veya "IL-7" şeklinde gösterilmektedir. *IL7*, 8. kromozom üzerinde q21.13 lokasyonunda yer almaktadır. Genin genomdaki konumu Şekil 2.4.'te görülmektedir (IL 7 Gene, 2019).



Şekil 2.4. *IL7*'nin genomdaki konumu

IL7 6 eksondan oluşan 2116 bç boyutunda bir gendir. Genin kodlayıcı exonları boyutu (ORF) 534 bç'dir (NM_000880, NCBI). *IL7* 177 aa'lık aktif proteini kodlar (AAC63047.1, NCBI) ve proteinin moleküler ağırlığı 20.187 Da'dur (Goodwin vd., 1989; Homo sapiens chromosome 8 interleukin 7 (IL7) gene, complete cds, 2019).

İlk 75 nükleotit (25 amino asit), bir 152 amino asitlik proteini oluşturmak için bir sinyal peptidi oluşturur. cDNA dizilimine dayanan *IL7*, benzer bir 6 ekzon yapısı ortaya koyan primatlarda korunur. Fare *Il7*'si, insan *IL7*'de ekson 5'e karşılık gelen nükleotitlerden yoksundur (Rane, 2014).

İlk olarak 1988'de kemik iliği kültür sisteminde fare B hücresi öncüllerinin büyümesini destekleyen bir faktör olarak keşfedildi (Goodwin vd., 1989). IL-7, lenfosit prekürsörlerinin kültür ortamında üretilmesini sağlar. Bundan dolayı pre B hücre büyüme faktörü ve lenfopoetin olarak da bilinir (Sutherland vd., 1989). Olgun T lenfositlerini de

uyarabilme özelliğine sahiptir. Myeloid-megakaryosit koloni forming unit ve trombositler üzerinde uyarıcı etkisinden dolayı siklofosfamid toksisitesinin tedavisinde kullanılmıştır (Baykal vd., 1998).

IL-7 ve IL-7Ra (IL-7 receptor subunit alpha) nakavt farelerin çalışmaları, IL-7'nin homeostatik T-hücresi ve B-hücresi gelişimi için önemli olduğunu göstermiştir. IL-7 veya IL-7 sinyalini bloke eden reaktifler, HIV ile ilişkili immün yetmezliği ve kemoterapi, otoimmün hastalıklar ve lenfoid malignitelere ikincil immün yetmezliği olan hastaları tedavi etmek için kullanılabilir. Yapılan çalışmalar IL-7'nin T hücre homeostazı ve lenfopiamiye bağlı proliferasyon için oldukça önemli olduğunu göstermiştir (Von Freeden vd.,1995). Buna bağlı olarak viral enfeksiyonların tedavisi, kemik iliğinin iyileştirilmesi ve organ nakli çalışmaları ve kanser immünoterapisi için umut verici bir aday olarak kabul edilmekte ve IL-7'ye talep artmaktadır.

IL-7 ile ilgili 2003 yılında yayınlanan bir çalışmada (Oualette vd., 2003) insana ait IL-7 (hIL-7)'nin bir rekombinant formu (rhIL-7), bT7 promotörünün kontrolü altında *E. coli* HMS174 (DE3) pLysS'de eksprese edilmiştir.

IL-7 ile ilgili 2009 yılında yayınlanan bir çalışmada (Luo vd., 2009) *IL7*, cDNA kütüphanesinden ilgili klon kullanılarak çoğaltılıp *Pichia pastoris*'e klonlanmış ve mayada aktif rekombinant rhIL-7 protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.

Bir başka çalışmada (Hoang, 2017), araştırmacı hIL-7 rekombinant proteinlerinin ekspresyonunu optimize edebilen bitki kültür sistemini tanımlamak ve bitki kültürü sistemlerinden hIL-7 rekombinant üretimi ve saflaştırmayı araştırmıştır.

Toghraie vd., (2017) yaptıkları çalışmalarında; Çin hamsteri yumurtalık (CHO) - K1 hücrelerinde rhIL-7 eksprese edildiğini göstermişlerdir. CHO-K1 hücreleri, elektroporasyon ile pBud-hIL-7 rekombinantının hem dairesel hem de lineer formları ile stabil bir şekilde transfekte edildiğini ve ekspresyonunun, enzim bağlı immünosorbent tahlili (ELISA) testi, dot ve western blot ile doğrulandığını bildirmişlerdir.

Türkiye de ise henüz *IL7* geninin klonlanması ve rekombinant üretimine dair akademik bir çalışmaya raslanmamıştır. Bu çalışma ile *IL7*'nin *E. coli* bakterisine klonlanması ve ekspresyonu hedeflenmiştir ve insan IL proteinlerinin mikrobiyal üretimi için bir ön çalışma niteliğinde olması planlanmıştır. Ülkemizde IL-7'nin rekombinant olarak üretimi konusunda çalışmaların azlığı göz önüne alındığında *IL7* klonlama

çalışmaları önem arz etmektedir. Dolayısıyla tez çalışması, rekombinant IL üretimi alanında bir temel oluşturulmasına katkı sağlamaktadır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1. *IL7* İzolasyonu

3.1.1. Materyal

IL7'nin, kemik iliğinde kemik iliği stromal hücreleri, dalak, timüs ve böbrek hücrelerinde anlatımı yapılmaktadır. Periferik kanda yer alan ve mononükleer beyaz kan hücreleri olarak tanımlanan hücre grubu arasında lenfosit ve monosit hücreler bulunmaktadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında *IL7* 'nin izolasyonuda kaynak olarak periferik kandan izole dilen mononükleer beyaz kan hücreleri (lenfosit) kullanılmıştır. Bunun için T.C. Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır. Onay belgesi EK1'de sunulmuştur.

3.1.2. Mononükleer Beyaz Kan Hücrelerinin Ayrıştırılması

Gen kaynağı olarak, sağlıklı bir bireyden 4 mL periferik kan, heparinli tüpe alınmıştır. Mononükleer beyaz kan hücrelerini ayrıştırmak için histopaque metodu kullanılmıştır. Aşağıdaki adımlar takip edilerek mononükleer beyaz kan hücrelerinin ayrımı gerçekleştirilmiştir.

- Oda sıcaklığına getirilen Histopaque®-1077 (Sigma, Cat no:10771)'dan 2 mL olacak şekilde 2 ayrı falkon tüpe alınmıştır. Üzerlerine 1:1 (histopaque: kan) oranında alınan heparinli kan yavaş yavaş eklenmiştir.
- Önceden +4°C ye getirilen santrifüjde 400*xg*'de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrası orta katmanda toplanan lenfositler, bir pipet yardımıyla temiz bir tüpe aktarılmıştır.
- Üzerlerine 2 mL Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS (1X)) (pH: 7.4, Gibco, Cat No: 14190250) eklenip karıştırılan hücreler +4°C' de 250 *xg*'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası üst sıvı atılıp üzerine 1 mL DPBS eklenip karıştırılmış ve yine +4°C' de 250 *xg*'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Tekrar santrifüj sonrası üst sıvı atılıp üzerine 1 mL DPBS eklenmiştir. Resüspanse edilen hücreler 1.5 mL'lik eppendorf tüplere paylaştırılmıştır.
- Aynı şartlarda (+4°C' de 250 *xg*'de 10 dakika) son santrifüj yapılmış ve üst sıvı uzaklaştırıldığında tüplerin dibinde lenfosit pelletleri toplanmıştır. 2 tüp pellet biri DNA izolasyonunda, diğeri ise Total RNA izolasyonunda doğrudan kullanılmıştır.

3.1.3. DNA İzolasyonu

IL7'nin izolasyonunda yapılacak PCR ve benzeri deneysel çalışmaların optimizasyonunda kullanılmak için periferik kandan ayrılan lenfositlerden izole edilen RNA miktarı kısıtlı kalmış bu yüzden periferik kandan ayrılan lenfositlerden genomik DNA (gDNA) izolasyonu yapılmıştır. RNA Bunun için DNeasy Blood &Tissue Kit (QIAGEN, Cat no:69506) kullanılmıştır. İzolasyon için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir;

- Lenfosit pelletinin üzerine 100 µL PBS eklenip ve üzerine 20 µL proteinaz K (20 mg/mL) ve 20 µL RNAse A (100 mg/mL) eklenmiştir. Bunların üzerine 200 µL AL lysis buffer eklenip karıştırılmış ve +56°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra süspansiyonun üzerine 200 µL %100'lik etanol eklenmiş ve hemen vortex yapılmıştır.
- Süspansiyon spin kolona alınmıştır. +25°C'de 6000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve alt tüp atılıp yenisi konulmuştur.
- Kolona 500 µL AWI eklenmiştir. Kolon +25°C'de 6000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve alt tüp atılıp yenisi konulmuştur.

- Üzerine 500 µL AWII eklenip +25°C 20000 *xg*'de 3 dakika tekrar santrifüj edilmiş, kolon, 1.5 mL'lik eppendorf tüpüne alınmıştır.
- 50 µL AE buffer membranın orta kısmına hızlıca bırakılmıştır. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 25°C 6000 *xg*'de 1 dakika tekrar santrifüj edilmiş toplama tüpünde gDNA izole edilmiştir.

Spektrofotometrede (Optizen, NanoQ) ölçüm yapılarak gDNA konsantrasyonu belirlenmiştir. Bunun için cihazın yazılımı, ölçülen absorbans (A_{260}) değerini, [DNA(µgr/mL)=A_{260}Xsulandırma oranıX50] formülü kullanılarak hesaplamış ve konsantrasyonu µL'deki ng cinsinden DNA miktarı olarak vermiştir. İzole edilen gDNA %0.8'lik agaroz jelde analiz edilmiştir.

Agaroz Jel Elektroforezi: İstenen konsantrasyonda agaroz jel hazırlamak için uygun miktarda agaroz tartılmış ve üzerine uygun hacimdeki 0,5X Tris-Borat-EDTA (TBE) buffer eklenerek mikrodalga fırında ısıtılarak çözdürülmüştür. Jel karışımı yaklaşık 60^{o}C'ye kadar soğutulup 0,5-1 µg/mL olacak şekilde Etidyum bromid (EtBr) eklenmiştir. Daha sonra uygun jel kalıplarına dökülerek polimerizasyona bırakılmıştır. Çalışma boyunca tüm agaroz jeller bu adımlar esas alınarak istenen konsantrasyon değerlerine uygun olarak hazırlanmıştır.

Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra tarak dikkatlice uzaklaştırılıp jel elektroforez tankına alınmıştır. Yaklaşık olarak 1000 ng gDNA içerecek hacimde örnek 3µl yükleme tamponu ile karıştırılıp jelin kuyulara yüklenmiştir. Konsantrasyonu ve DNA fragmentleri boyutu bilinen DNA ladder da jelin diğer kuyucuğuna yüklenmiştir. Elektroforez işlemi sabit akım altında 70-100 V'da 15 dakika da gerçekleştirilmiştir. UV ışık altında gDNA görüntülemesi yapılmış ve jelin fotoğrafı özel görüntüleme sisteminde çekilmiştir.

3.1.4. Primer Dizaynı

IL7'nin PCR ile çoğaltımı için geninin kodlama yapan dizileri (AH006906.2, NCBI) kullanılarak primer tasarımı yapılmış ve ayrıca Luo vd. (2009) makalesinde yayınlanan primerler de kullanılmıştır. Primer tasarımında Primer3Plus yazılımı (Primer3Plus, 2019) kullanılmıştır. Ayrıca Luo vd. (2009) tarafından verilen primer çiftinin uçlarına, kullanılacak ekspresyon vektörüne doğrudan klonlama için restriksiyon

enzimleri (RE) tanıma dizilerinin de eklendiği primer çiftleri de tasarlanmıştır (Çizelge 3.1.).

Sipariş edilen primerler öncelikle nukleazdan ari su (NF su) ile 100 µM konsantrasyonda olacak biçimde sulandırılmış ve ana stoklar elde edilmiştir. Bu ana stoktan PCR çalışmalarında kullanılacak olan 10 µM konsantrasyonlarda primer ara stokları hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1.Tez çalışmasında kullanılan primerler

Primerler	**Dizilimi**	**Kaynak**
IL7-Frw.31	5'- GGACTTCCTCCCCTGATCCT-3'	Tasarlandı
IL7.Rvs.534	5'- TCAGTGTTCTTTAGTGCCCATCA-3'	Tasarlandı
IL7 Forward	5'-GGCTC GAG AAA AGA GAT TGT GAT ATT GAA GGT AAA-3'	Luo vd. (2009)
IL7 Reverse	5'-AGTCT AGA TCA GTG TTC TTT AGT GCC CAT CAA AT-3'	Luo vd. (2009)
IL7 Fr-SphII	5'-ACA TGC ATG CAT GTG ATT GTG ATA TTG AAG GTA AA -3'	Tasarlandı
IL7 Rv-BamHI	5'-CGC GGA TCC GCG AGT GTT CTT TAG TGC CCA TCA AAT -3'	Tasarlandı
IL7 Rv-HindIII	5'-CCC AAG CTT GGC AGT GTT CTT TAG TGC CCA TCA AAT -3'	Tasarlandı

3.1.5. gDNA'dan *IL7*'nin PCR ile Çoğaltımı

IL7 çoğaltımı için gerçekleştirilecek PCR'larda kalıp olarak cDNA kullanılacaktır. Ancak elde edilecek total RNA ve dolayısıyla cDNA miktarının kısıtlı oluşu nedeniyle PCR optimizasyonları gDNA kullanılarak yapılmıştır.

Optimizasyon çalışmalarında, aşağıda detayları sunulan 4 optimizasyon çalışmasında farklı PCR içerikleri ve farklı marka Taq Polimeraz enzimleri denenmiştir ve bu denemeler her bir primer çifti için gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan PCR içeriklerine ilişkin bilgiler aşağıda sunulmuştur:

Birinci optimizasyon çalışmaları: Rutin PCR işlemlerinde kullanılan klasik taq DNA polimeraz (Invitrogen, cat no: 10342020) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda tüm primer çiftleri için hazırlanan PCR içeriği Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. gDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan PCR İçeriği (Taq Polimeraz)

Bileşenler	**1 Örnek İçin Miktar**	**Son Konsantrasyon**
10X PCR buffer	1.5 µL	1X
dNTP (10 mM)	0.3 µL	0.2 mM
$MgCl_2$ (50 mM)	0.45 µL	1.5 mM
Primer Mix (10 µM)	0.3 µL	0,5 µM (her biri)
Taq Polimeraz	0.2 µL	1.0 U
gDNA (30ng/ µL)	2 µL	4 ng/ µL
Nukleazdan ari (NF) Su	10.25 µL	-
Toplam	**15 µL**	-

<u>İkinci optimizasyon çalışmaları:</u> İki farklı markaya ait hazır master miksler [ExPrime TaqTM Premix (2X) (Genet Bio, cat no: G-5000) ve Deram Taq (ThermoFisher, cat no: K1081)] kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu denemelerde farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları kullanılarak etkinlik artırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla tüm primer çiftleri için hazırlanan PCR içeriği Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. gDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı amacıyla her primer çifti için hazırlanan PCR İçeriği (Farklı Master Miksler + Farklı Konsantrasyonda $MgCl_2$)

Bileşenler	**Değişken**	**1 Örnek İçin Miktar**	**Son Konsantrasyon**
gDNA (30ng/ µL)	-	2 µL	3 ng/ µL
Taq MasterMix (2X)	1. ExPrime TaqTM Premix 2. Deram Taq PCR M Mix	10 µL	1X
Primer Mix (10 µM)	-	0.4 µL	0,5 µM (her biri)
$MgCl_2$ (50 mM)	0.5-1 mM	0.2-0.4 µL	0.5-1 mM
NF Su	-	2.2-2.4 µL	-
Toplam	-	**20 µL**	-

<u>Üçüncü optimizasyon çalışmaları:</u> AQ90 High Fidelity DNA polimeraz (AMPLIQON, cat no:A457401) kullanılarak hazırlanan PCR içeriği ile denemeler yapılmıştır. Bu kapsamda tüm primer çiftleri için hazırlanan PCR içeriği Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. gDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan PCR İçeriği (AQ90 DNA polimeraz + Farklı Konsantrasyonda $MgCl_2$)

Bileşenler	**1 Örnek İçin Miktar**	**Son Konsantrasyon**
10X AQ90 buffer	2.5 µL	1X
dNTP (10 mM)	0.5 µL	0.2 mM
Primer A (10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
Primer B (10 µM)	0.5 µL	0.2 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	1,0 µL	1 mM
AQ90 DNA polimeraz(2U/µL)	0.125-0.5 µL	0.25-1 U
Betain (5M)	5-10 µL	1-2 M
gDNA (30ng/ µL)	2 µL	2.4 ng/ µL
NF Su	12.5-13 µL	-
Toplam	**25 µL**	-

Dördüncü optimizasyon çalışmaları: Bu kapsamda yüksek doğrulukta polimerizasyon yapan Platinum taq DNA polymerase (Invitrogen, cat no:DBgB1d) kullanılmıştır. Her primer çifti için hazırlanan PCR içeriği Çizelge 3.5.'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. gDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan PCR İçeriği (Platinum Taq DNA polimeraz + Farklı Konsantrasyon $MgCl_2$)

Bileşenler	**1 Örnek İçin Miktar**	**Son Konsantrasyon**
10X PCR buffer	1.5 µL	1X
dNTP (10 mM)	0.3 µL	0.2 mM
$MgCl_2$ (50 mM)	0.45 µL	1.5 mM
Primer Mix (10 µM)	0.3 µL	0,5 µM (her biri)
Platinum Taq Polimeraz	0.2 µL	1.0 U
gDNA (30ng/ µL)	2 µL	4 ng/ µL
NF Su	10.25-10.4 µL	-
Toplam	**15 µL**	-

Tüm optimizasyon denemelerinde hazırlanan tüm PCR karışımkarı Çizelge 3.6. de sunulan gradient PCR koşullarında MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad, cat no:1709703) cihazında inkübe edilmiştir. Böylece primerlerin kalıp DNA'ya bağlanabileceği optimum çalışma sıcaklığı belirlenmiştir. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde analiz edilmiştir.

Çizelge 3.6. gDNA'da uygulanan gradient PCR Metodu

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman**	**Döngü**
Denatürasyon	94°C	3 dk	X1
Denatürasyon	94°C	45 sn	X35
Annealing	50-60°C (gradient)	1 dk	
Sentez	72°C	1 dk	
Sentez tamamlama	72°C	5 dk	-

3.1.6. Total RNA İzolasyonu

Klonlamak üzere cDNA'dan *IL7*'nin çoğaltımı için periferik kandan ayrılan lenfositlerin yarısından total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için Purelink RNA mini kit (Invitrogen, Cat no:12183018A) kullanılmıştır. RNA izolasyonu için aşağıda sunulan adımlar takip edilmiştir;

- Lenfosit pelletin üzerine 600 µL %2 lik beta-mercaptoetanol eklenmiş, liziz buffer eklenip 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra süspansiyonun üzerine 1:1 oranında olacak şekilde %70'lik etanol eklenip vortex yapılmıştır.
- Süspansiyon spin kolona alınmıştır. +25°C'de 12000 *xg*'de 15 saniye santrifüj edilmiş ve santrifüj sonra alt sıvı atılmıştır.
- Kolona 700 µL Wash Buffer I (WBI) eklenmiştir. Kolon +25°C' 12000 *xg*'de 15 saniye tekrar santrifüj edilmiştir. Alt tüp atılıp kolon yeni tüpe alınmıştır.
- Üzerine 500 µL Wash Buffer II (WBII) eklenip +25°C' 12000 *xg*'de 15 saniye tekrar santrifüj edilmiş alt sıvı atılmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır.
- Kolon +25°C' 12000 *xg*'de 1 dakika daha santrifüj edilip, 1.5 mL'lik eppendorf toplama tüpüne alınmıştır.
- 50 µL RNAse free su membranın orta kısmına dikkatlice bırakılmıştır. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 25°C, 12000 *xg*'de 2 dakika tekrar santrifüj edilmiş toplama tüpünde total RNA birikmiştir.

Spektrofotometrede (Optizen, NanoQ) ölçüm yapılarak izole edilen total RNA'nın konsantrasyonu tespit edilmiştir. Bunun için A_{260} değeri cihazın yazılımı tarafından RNA(µL/mL)=A_{260}*sulandırma oranı*40 formülü kullanılarak hesaplanmış ve µL'deki ng cinsinden RNA miktarı verilmiştir.

3.1.7. cDNA Sentezi

IL7'nin çoğaltımı için kalıp olarak kullanılacak cDNA, izole edilen total RNA'lardan sentezlenmiştir. Sentez için Thermo Fisher Scientific High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (LOT:00487144) kullanılmıştır.

cDNA sentezi için Çizelge 3.7.'te verilen bileşenler, belirtilen miktarlarda bir araya getirilip iyice karıştırılmıştır. 0,2 mL tüplerinde hazırlanan cDNA karışımına eşit hacimde ve yaklaşık 350-500 ng olacak şekilde total RNA eklenmiştir. Hafifçe vortexlenen tüpler PCR cihazına yerleştirilmiştir. cDNA sentezi için tüpler önce 25°C'de 10 dakika, ardından 37°C'de 120 dakika sentez için inkübe edilmiştir. Ardından 85°C'de 5 dakika inkübe edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

Çizelge 3.7. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyonun içeriği

Bileşenler	**1 Örnek İçin Miktar**	**Son Konsantrasyon**
RT buffer (1X)	2 µL	1X
dNTP mix (10 mM)	0.8 µL	0,2 mM
RT Random primer mix (10X)	2 µL	1X
Reverse Transcriptase (20 U/µL)	1 µL	20U
dH_2O	4.2 µL	-
Total RNA	10 µL	350-500 ng
Toplam	**20 µL**	-

3.1.8. Geninin Çoğaltılması

Hazırlanan cDNA kalıp olarak kullanılarak *IL7* PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonunda hata oranı düşük Platinum taq DNA polymerase (Invitrogen, cat no:DBgB1d) kullanılmıştır. Platinum taq DNA polymerase, PCR için kullanılan sıradan Taq DNA polimerazlardan altı kat daha yüksek doğrulukla DNA sentezi yapmaktadır (Invitrogen™ Platinum™ *Taq* DNA Polymerase High Fidelity Manuel, 2019) .

IL7'nin çoğaltılması için hazırlanan PCR içeriği Çizelge 3.8.'te, metodu da Çizelge 3.9.'da verilmiştir.

Çizelge 3.8. *IL7*'nin çoğaltılması için hazırlanan PCR içeriği

Malzeme	**1 Örnek İçin Miktar**	**Son Konsantrasyon**
cDNA	2 µL	-
ExPrime Taq Premix (2X)	7.5 µL	1X
IL-7 Primer Mix (10 µM)	1.5 µL	0,5 µM (her biri)
NF Su	4 µL	-
Toplam	**15 µL**	-

Çizelge 3.9. *IL7*'nin çoğaltılması için hazırlanan PCR Metodu

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman**	**Döngü**
Denatürasyon	94°C	3 dk	X1
Denatürasyon	94°C	45 sn	X35
Annealing	58°C	1 dk	
Sentez	72°C	1 dk	

PCR ürünleri %1.5'luk agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.1.9. *IL7*'nin Jelden Geri Kazanımı

Jelde görüntülenen ve *IL7*'yi temsil eden, beklenen boyuttaki DNA (534 bç) fragmenti, bistüri ile jelden kesilip steril tüplere alınmış ve saflaştırılmıştır. Bunun için PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, cat no: 00731537) kullanılmıştır. Kesilen jel parçaları tartılıp aşağıdaki adımlar takip edilerek saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir;

- Tüplere 400 mg jel için 1.2 mL jel çözündürme bufferı (buffer L3) eklenmiştir. Ve ısıtıcı blokta 50°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Her 3 dk da bir tüpler ters yüz edilip jelin çözünmesi sağlanmıştır. Jel tamamen çözündükten sonra tüpler 5 dakika daha inkübe edilmişlerdir.
- Çözünmüş jeller DNA tutuklayıcı kolonlara aktarılarak 15000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra altsıvı atılmıştır.
- Etanol içeren yıkama bufferı (W1)'dan 500 µL kolonlara eklenip 15000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilip alt sıvı atılmıştır.
- Kolonlar maximum hızda 2 dakika daha santrifüj edilmişlerdir. Santrifüjden sonra kolonlar temiz tüplere (1.5 mL'lik eppendorf) alınmıştır.
- DNA kolondan çözüp geri kazanmak üzere 50 µL elüsyon bufferı (E5) membranın orta kısmına bırakılmıştır. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından oda sıcaklığında 15000 *xg*'de 1 dakika tekrar santrifüj edilmiş ve *IL7* tüplerde birikmiştir.

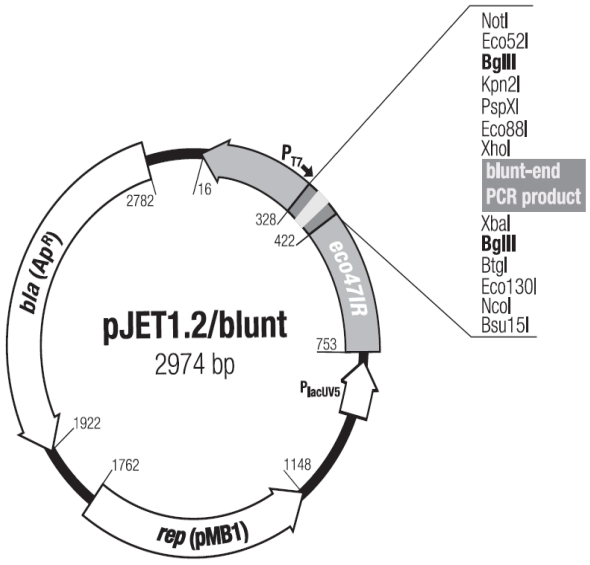
Örneklerin konsantrasyonu spektrofotometrede (Optize, NanoQ) ölçülerek belirlenmiştir. Konsantrasyonu 10 ng/µL'nin altında kalan örnekler DNA konsantratör cihazı (Gyrozen, HyperVAC) kullanılarak konsantre edilmiştir.

3.2. *IL7*'nin Klonlanması

3.2.1. Klonlama Vektörleri

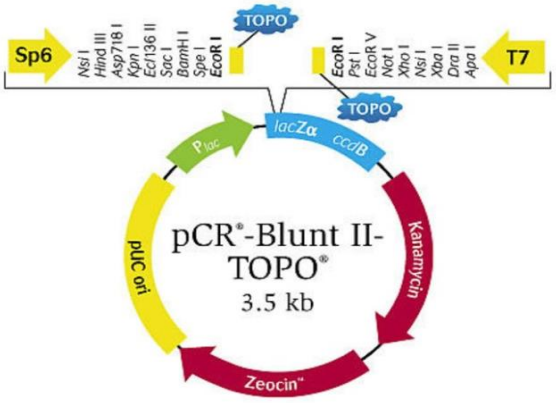
Bu çalışmada, genin expresyon vektörüne klonlanmasından önce uygun RE uçlarının kazandırılması için alt klonlama (subcloning) yapılmıştır. Subcloning için CloneJET PCR Cloning (ThermoScientific, Cat no:00564105) ve Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning vektörleri (Invitrogen, Cat no:2046689) kullanılmıştır. Böylece her iki vektörün klonlama bölgesinde yer alan çok sayıda farklı restriksiyon enzimi tanıma dizilerinin varlığı daha sonraki expresyon için klonlama çalışmalarıdaki vektör seçiminde esneklik sağlayacaktır.

CloneJET PCR Klonlama vektörü (pJET1.2/Blunt), termostabil DNA polimerazlar ile üretilen, küt uçlara sahip PCR ürünlerinin en yüksek verimde klonlanması için geliştirilmiş bir vektördür. pJET1.2/Blunt vektörü, 6 bç ila 10 kb'lik insertlerin klonlanamasına olanak tanır. Vektörün 5'-uçları fosforil grupları içerir, böylece PCR primerlerinin fosforilasyonu gerekli değildir. pJET1.2/Blunt vektörü seleksiyon için ampisilin direnç genine ve lethal *eco47IR* genine sahiptir. Bu nedenle gen içine yerleştirilen çoklu klonlama bölgesi (MCS) sayesinde transgeniklerin insersiyonal inaktivasyonla seleksiyonuna olanak sağlar (CloneJet PCR cloning kit user manual, 2019).



Şekil 3.1. pJET1.2 / Blunt vektörü haritası

Zero Blunt® TOPO® PCR Klonlama vektörü (pCR-BluntII-TOPO) ise özellikle yüksek doğrulukta çalışan özel DNA polimeraz enzimleri (High fidelity DNA polymerase) tarafından üretilen küt uçlu PCR ürünlerinin yüksek verimde klonlanmasına olanak tanıyan bir plazmid vektördür. pCR-BluntII-TOPO vektörü, her DNA zincirinin 3' ucuna ("TOPO®-aktive" vektörü olarak adlandırılır) kovalent olarak bağlanan *Vaccinia virüsü'*den elde edilen DNA topoizomeraz I ile doğrusallaştırılmıştır. Vektör, insersiyonal inaktivasonla (insertional inactivation) seleksiyon sağlayan *ccdB* genini içerir. Bu sayede insert taşıyan plazmidtlere sahip transgenik hücrelerin doğrudan seçilmesine izin verir. Ayrıca selektif Kanamisin direnç genine de sahiptir (Şekil3.2) (Zero Blunt TOPO PCR CloningKit-User Guide, 2014).



Şekil 3.2. pCR ™ -Blunt II-TOPO vektör haritası

3.2.2. *IL7* 'nin pJET 1.2/ Blunt Vektörüne Yerleştirilmesi

Bu aşamada *IL7* PCR ürünülerinin, pJET1.2/Blunt vektörü ile ligasyonundan önce uçlarının küt olduğundan emin olmak için aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

Küt uç reaksiyonu buz içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım (Çizelge 3.10.) 3-5 saniye vortekslenmiş ve karışım oda sıcaklığında 70° C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Ve karışım buza alınmıştır.

Çizelge 3.10. Küt uç oluşturma reaksiyonu içeriği

Bileşen	**Hacim**	**Son Konsantrasyon**
Reaksiyon buffer (2X)	10 µL	1X
DNA Blunting Enzim	1 µL	-
IL-7 insert DNA (50-150 ng)	1 µL	150 ng
NF Su	6 µL	-
Toplam	**18 µL**	-

Daha sonra, karışıma 1 µL pJET1.2/Blunt vektör (50 ng/µL) ve 1 µL T4 DNA ligaz enzimi eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı oda sıcaklığında (22-25° C) 5 dakika inkübe edilmiştir.

Aynı işlemler pozitif kontrol amacıyla kit içeriğinde sunulan kontrol PCR ürünü ile de yapılmıştır.

3.2.3. *IL7*'nin pCR-BluntII-TOPO Vektörüne Yerleştirilmesi

Jelden kesilerek temizlenen *IL7* insert DNA'sının pCR-BluntII-TOPO vektörüne klonlanması için Zero Blunt® TOPO® PCR Klonlama kitindeki protokol uygulanmıştır. *IL7* insert DNA'sının vektöre bağlanması için Çizelge 3.11.'de verilen reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım vortexlenmiş ve oda sıcaklığında (22-25° C) 5 dakika inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.11. pCR-BluntII-TOPO vektörüne bağlanma karışımı

Bileşen	**Hacim**	**Son konsantrasyon**
Tuz çözeltisi	1 µL	-
pCR II-Blunt-TOPO vektör	1 µL	10 ng
IL-7 insert DNA	2 µL	30-50 ng
NF Su	2 µL	-
Toplam	**6 µL**	-

Aynı işlemler pozitif kontrol amacıyla kit içeriğinde sunulan kontrol PCR ürünü ile de yapılmıştır.

3.2.4. Bakteriye Transformasyon

3.2.4.1. Bakteri Kaynağı

Bu tez çalışmasında *IL7* klonlanması için konakçı hücre olarak *E. coli* bakterisinin *DH5α* suşu kullanılmıştır. Bu suş İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden temin edilmiştir. *DH5α* suşu 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1 genotipine sahiptir.

3.2.4.2. Besiyeri

Tez çalışmasında kullanılan *E. coli* DH5α suşunu üretmek için Luria-Bertani (LB) sıvı besiyeri (Çizelge 3.12.) kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerleri 121°C'de, 1 Atm basınç altında 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir.

Ayrıca transformasyon sonrasında transgenik bakterilerin seleksiyonunda kullanılmak üzere katı LB besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri 121°C'de, 1 Atm basınç altında 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Besiyeri uygun sıcaklığa kadar soğuduktan sonra, kullanılan vektöre özgü antibiyotik eklenmiştir. pJET1.2/Blunt vektörü için 50 mg/L konsantrasyonda ampisilin (Sigma, A1593) antibiyotiği, pCR-BluntII-TOPO vektörü için ise 50 mg/L konsantrasyonda kanamisin (Sigma, BP861) antibiyotiği kullanılmıştır. Antibiyotikler besiyerlerine eklendikten sonra biyogüvenlik kabininde steril petrilere 15-25 mL olacak şekilde dökülmüş ve katılaşması için 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Çizelge 3.12. LB Besiyeri İçeriği (Bertani, 1951)

Malzeme	**Konsantrasyon**
Pepton	10 g/L
Yeast Extract	5 g/L
NaCl	10 g/L
Distile Su	1L
Agar (katı besiyeri için)	8 g/L

3.2.4.3. Transformasyon

Transformasyon işlemi gerçekleştirilmeden bir gün önce steril koşullar altında 15 mL'lik falkon tüplere 5 mL LB sıvı besiyeri eklenmiş ve üzerlerine 100 µL stok *E.coli DH5α* bakteri kültüründen ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tüpler 37°C, 180 rpm'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

Ertesi gün, gece boyu çoğalan bakteri kültürlerinden 500 µL bakteri alınıp, 6 mL taze LB sıvı besiyeri içeren iki adet yeni tüpe ekim yapılmış ve 37°C 180 rpm'de 5 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda bakteriler örnek, pozitif kontrol ve negatif kontrol için birer tüp olacak biçimde ve her tüpte 2 mL bakteri olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Transformasyon işlemi için $CaCl_2$ Heat shock metodu (Chang vd., 2017) kullanılmıştır. Metod aşağıdaki adımlar takip edilerek uygulanmştır:

- Önceden inkübasyona bırakılan bakteriler santrifüj tüplerime transfer edilmiştir. 4°C 6000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvı atılmıştır. Hücreler buza konmuştur.
- Tüplerin içine buzda bekletilmiş 50 mM $CaCl_2$ den 1'er mL eklenmiş ve hücreler resüspanse edilip, 20 dakika buzda inkübasyona bırakılmıştır.
- Buzdan alınan tüpler 4°C 6000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvı atılmıştır.
- Tüplerdeki hücrelerin üzerine buzda bekletilmiş 100 mM $CaCl_2$ den 125 µL eklenmiş ve hücreler resüspanse edilip, transformasyona hazır hale getirilmiştir.
- Transformasyona hazır hale gelmiş hücrelerden örnek tüpüne 6 µL'lik ligasyon karışımı (*IL7*+vektör) eklenmiştir.
- Hücrelerden (+) kontrol tüpüne 6 µL'lik ligasyon karışımı (kontrol PCR ürünü+vektör) eklenmiştir.
- Hücrelerden (-) kontrol tüpüne hiçbir ligasyon ürünü eklenmemiştir
- Hücreler 30 dakika buzda bekletilmiştir. Ve ardından ısıtıcı blokta 42°C'de 1 dakika ısı şokuna maruz bırakılmıştır.
- Isı şokundan sonra hücreler tekrar buz içine alınmıştır.
- Bakteriler üzerine 1 ml 2X LB besiyeri eklenmiştir ve 37°C 180 rpm'de 30-45 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında bakteriler 6000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve yaklaşık 100 µL besiyeri kalacak şekilde üst sıvı atılmıştır.
- Toplanan bakteriler kalan 100 µL besiyeri ile resüspanse edilmiştir.

pJET1.2/Blunt vektörünün transforme edildiği bakteriler ile bu vektör için hazırlanan pozitif ve negatif kontrol amaçlı bakteriler LB+50 mg/mL ampisilin içeren besiyerlerine ekilmiştir.

pCR-BluntII-TOPO vektörünün transforme edildiği bakteriler ile bu vektör için hazırlanan pozitif ve negatif kontrol amaçlı bakteriler ise LB+50 mg/mL kanamisin içeren besiyerlerine ekilmiştir. Ekim yapılan tüm bakteriler 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

3.3. Transformantların Analizi

3.3.1. Besiyerinde Seleksiyon

Transformasyon sonrası insert DNA fragmentini içeren transforme olmuş bakterilerin besiyerlerindeki seleksiyonu vektörlerin taşıdığı lethal gen ve antibiyotik direnç genlerinden yararlanılarak yapılmıştır.

pJET1.2/Blunt vektörü ampisilin direnç geninin yanısıra *Eco47RI* lethalite genini de taşımaktadır. *eco47IR* geninin kodladığı nukleaz enzimi bakteri genomunu keserek parçalama özelliğine sahiptir. Bu vektör, bir insert DNA molekülünün klonlama bölgesine bağlanmasıyla bütünlüğü bozulmakta ve bu sayede, sadece insert DNA bağlanan plasmidi almış hücreler çoğalabilmektedir. Bu nedenle transformasyon sonrası LB+50 mg/mL ampisilin içeren besiyerine yayılan hücrelerden çoğalan her bakteri kolonisi transgenik olma potansiyeline sahip olarak değerlendirilmiştir.

pCR-BluntII-TOPO vektörü ise kanamisin direnç geni ile birlikte *ccdB* lethavektörl genini de taşımaktadır. Vektör, LacZ-a fragmentinin C-terminaline birleşik *ccdB* genini içerir. Bir PCR ürününün vektöre ligasyonu, *lacZa-ccdB* gen füzyonunun bütünlüğünü bozar ve böylece transformasyonda sadece pozitif rekombinantların büyümesine izin verir. *ccdB* geni, bir toksin-antitoksin sisteminin parçasıdır. ccdB, DNA giraz zehiri olarak işlev gören toksik proteinini (CcdB) kodlar, kırık çift sarmallı DNA ile DNA girazı kilitler ve sonuçta hücre ölümüne neden olur. Eğer vektörde *ccdB* geni içinde yer alan klonlama bölgesine bir insert DNA yerleştirilirse, ccdB okuma çerçevesi bozulur ve rekombinant plazmidi eksprese eden hücrelerin çoğalmasına izin verir. Rekombinant olmayan vektörler (örneğin yeniden bağlanmış boş vektörler) içeren herhangi bir hücre hala *ccdB*'yi eksprese eder ve bu nedenle ölür. Dolayısıyla transformasyon sonrası LB+50 mg/mL kanamisin içeren besiyerine yayılan hücrelerden çoğalan her bakteri kolonisi transgenik olma potansiyeline sahip olarak değerlendirilmiştir.

3.3.2. PCR ile Doğrulama

Transformasyon işlemi 5 defa tekrar yapılmıştır. İlk iki deneme de herhangi bir koloni elde edilememiştir. Daha sonraki denemelrde transformasyonun ardından rekombinant vektörün transforme edildiği bakterileri taşıyan petrilerde yaklaşık olarak 3-

10 arasında koloni gözlenmiştir. Gözlenen olası transforme bakteri kolonileri tek tek işaretlenip etikelenerek, *IL7*'ye özgü primerler veya vektörlerin klonlama bölgesine özgü primerler kullanılarak koloni PCR yapılarak doğrulanmaya çalışılmıştır.

Öncelikle her bir koloni için PCR içeriği hazırlanmış (Çizelge 3.13.) ve etiketlenen PCR tüplerine dağıtılmıştır. Ayrıca transforme olmuş bakterileri hem daha sonraki adımlarda kullanmak hem de stok oluşturup devamlılığını sağlamak üzere her koloni için 1 mL sıvı LB besiyeri+uygun antibiyotik içeren tüpler hazırlanmış ve etiketlenmiştir. Bir adet antibiyotikli katı besiyerinin tabanı cam kalemi ile kutucuklara ayrılıp etiketlenmiştir.

Biyogüvenlik kabininde; steril kürdan ile transforme bakteri kolonisine dokundurulup sırasıyla kendisi için etiketlenmiş PCR içeriğine, petride kendi alanına ve sıvı besiyerine değdirilmiştir. Sıvı besiyerine ekilen bakteriler 37°C 180 rpm'de gece boyu, katı besiyerine ekilen bakteriler ise 37°C 'lik etüvde gece boyu inkübasyona bırakılmışlardır. Hazırlanan PCR tüpleri ise aşağıda sunulan koşulları (Çizelge 3.14.) sağlamak üzere PCR cihazına yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.13. Koloni PCR İçeriği

Malzeme	**1 Örnek İçin Miktar**	**Son Konsantrasyon**
PCR Premix (2X)	7.5 µL	1X
IL-7 Primer Mix (10 µM) veya Vektöre özgü primer mix (10 µ)	1.5 µL	1 µM
Kalıp DNA	Bakteri	-
NF Su	6 µL	-
Toplam	**15 µL**	-

Çizelge 3.14. PCR Koşulları

Basamak	**Sıcaklık**	**Zaman**	**Döngü**
Denatürasyon	94°C	3 dk	X1
Denatürasyon	94°C	45 sn	X35
Annealing	55-60°C	1 dk	
Sentez	72°C	1 dk	

3.3.3. Dizi Analizi ile Doğrulama

3.3.3.1. Plasmid İzolasyonu

Koloni PCR ile uygun boyutta PCR ürünü elde edilen olası transgenik bakterilerden plazmid izole edilmiştir. PCR sonucu pozitif olarak değerlendirilen bakterilerden, uygun antibiyotik içeren 5 mL sıvı LB besiyerine steril kürdan kullanılarak ekim yapılmış ve bakteriler 37°C 180 rpm'de gece boyu üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün plazmid izolasyonu için GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoScientific, Cat no:00561747) kullanılmıştır. Uygulanan protokol şu şekildedir:

- Bakteriler 4000 *xg*'de 5 dakika santrifüj edilip toplanmış ve üst sıvı atılmıştır.
- Bakterilerin üzerlerine 250 µL resüspansiyon buffer eklenerek resüspanse edilip, vortekslenmiştir.
- Süspansiyonun üzerine 250 µL liziz buffer eklenip karıştırılmış ve ardından 350 µL nötralizasyon bufferı eklenip karıştırılmıştır.
- Süspansiyon 18000 *xg*'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- DNA plasmidi içeren üst sıvı bir pipet yardımıyla purifikasyon kolonunun içene alınıp, 15000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- Santrifüj sonrası saflaştırma kolonu steril bir tüpe transfer edilmiştir.
- Kolonun içene 600 µL yıkama buffer eklenmiş ve 15000 *xg*'de 30 saniye santrifüj edilip, üst sıvı atılmıştır. Bu adım (yıkama adımı) aynı koşullarda 2 kez tekrarlanmıştır.
- Yıkama adımından sonra kolon 1.5 mL eppendorf tüpe alınmıştır.
- Önceden 70°C'ye ısıtılmış elüsyon buffer dan tüplere 50 µL eklenip oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında tüpler ve 15000 *xg*'de 1 dakika santrifüj edilip, kolon atılmıştır. Eppendorf tüplerde toplanan plazmid DNA'sının konsantrasyonu spektrofotometrede ölçülerek belirlenmiştir. Ayrıca %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.3.3.2. Plasmid DNA'sından PCR ile *IL7* Eldesi ve Dizi Analizi

Dizi analizi özel bir firmadan hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Transforme bakterilerden izole edilen plazmidlere pJET1.2/Blunt vektörne ait dizileme primerleri ve

pCR-BluntII-TOPO vektörü için M13 primerleriyle yapılan PCR sonucu elde edilen ve *IL7*'yi temsil ettiği öngörülen DNA fragmenti jelden kesilerek alınmıştır. Jelden temizlenerek saflaştırılan DNA molekülleri dizi analizi için soğuk zincir koşullarında firmaya gönderilmiştir.

Jelden geri kazanım için PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, cat no: 00731537) kullanılmıştır ve protokol bölüm 3.1.9.'da anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Örneklerin konsantrasyonu spektrofotometre (Optize, NanoQ)'de ölçülerek belirlenmiştir.

3.4. Transformant Bakterilerin Stoklanması

Transformant bakterilerin stoklanması amacıyla %75'lik gliserol çözeltisi hazırlanıp 121°C'de 15 dakika 1 atm basınç altında otoklavda steril hale getirilmiştir.

Sıvı besiyerinde üretilen ve PCR sonucu pozitif olan transforme bakteri kültürlerinin üzerine 1:1 (%75 gliserol:bakteri) olacak şekilde %75'lik gliserol çözeltisi eklenmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

BÖLÜM 4

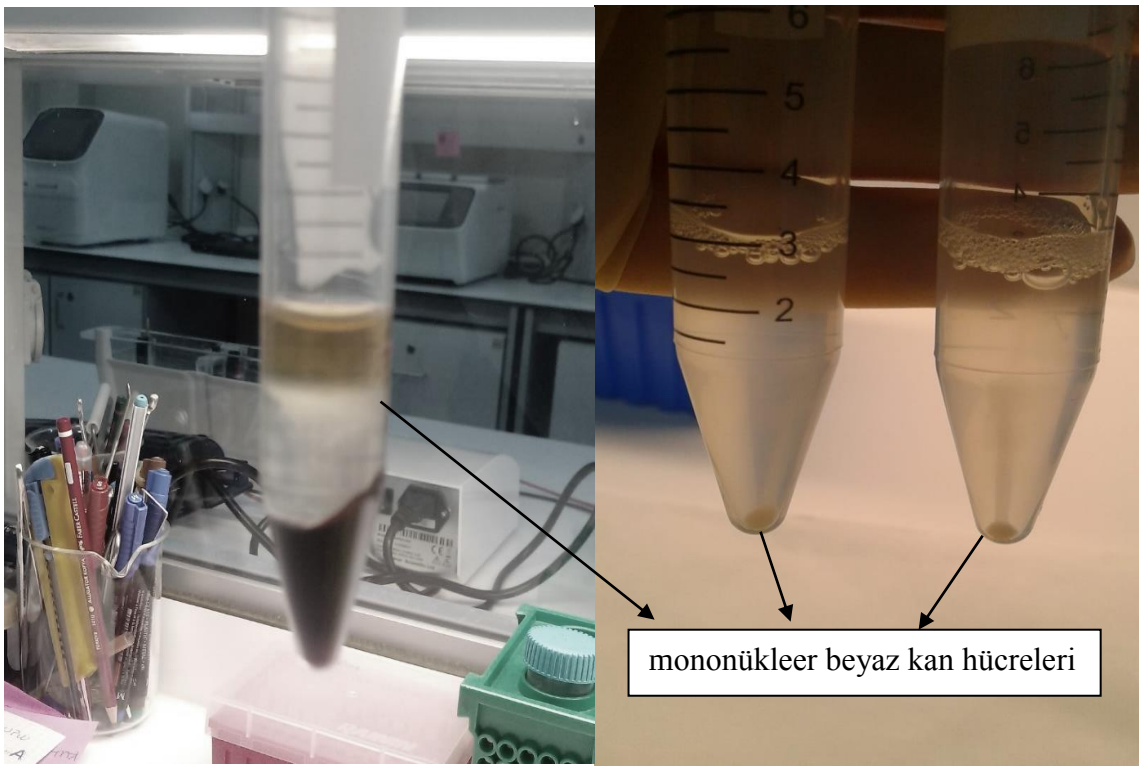
BULGULAR

4.1. *IL7*'nin İzolasyonu

4.1.1. Mononükleer Beyaz Kan Hücrelerinin Ayrıştırılması

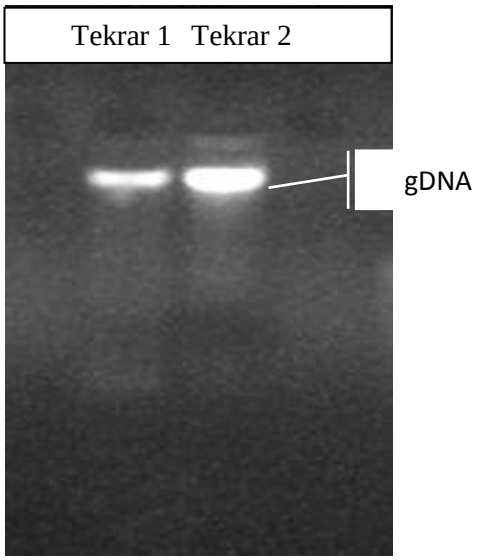
Yöntem bölümünde açıklandığı biçimde sağlıklı bir bireyden alınan 4 mL heparinli periferik kandan, histopaque metodu kullanılarak mononükleer beyaz kan hücreleri ayrıştırılmış ve *IL7*'nin izolasyonu için kullanılmıştır. Şekil 4.1.'te beyaz kan hücrelerinin yer aldığı ara faz ve santrifüjle çöktürüldükten sonra tüpün dip kısmında yer alan hücre yığını gösterilmektedir.

Şekil 4.1. Santrifüj sonrası kan-histopaque karışımında mononükleer beyaz kan hücreleri



4.1.2. DNA İzolasyonu

Ayrılan mononükleer beyaz kan hücrelerinin yarısı gDNA izolasyonunda kullanılmıştır. İzolasyon sonrası elde edilen gDNA konsantrasyonu spektrofotometrede (Optizen, NanoQ) ölçüm yapılarak 62.9 ng/ µL olarak tespit edilmiştir. Saflık değeri ise 1.76 olarak bulunmuştur. Ayrıca % 0,8 'lik agaroz jelde analiz edilerek de elde edilen gDNA'nın kaliesinin iyi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. gDNA jel görüntüsü

4.1.3. gDNA'dan *IL7*'nin PCR ile Çoğaltımının Optimizasyonu

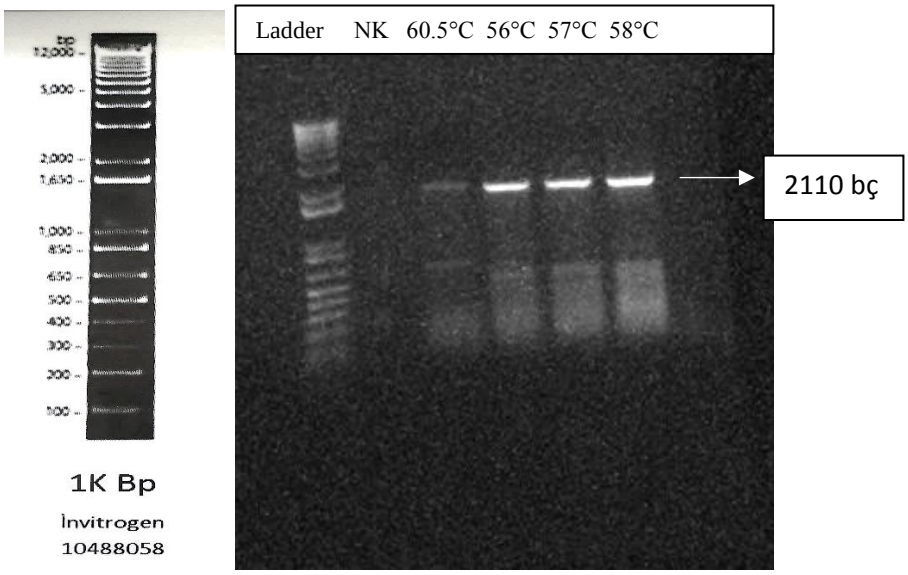
Bölüm 3.1.4.'te dizileri verilen primer çiftlerinin, *IL7*'nin çoğaltımını sağlamak üzere farklı parametreler değiştirilerek PCR optimizasyonu çalışmaları gDNA'da yapılmıştır. Genin boyutu 2116 bç'dir ve primerlerin bağlanma bölgeleri sonucunda gDNA'dan beklenen PCR ürününün boyutu yaklaşık 2100 bç'dir. Detayları bölüm 3.1.5. de verilen optimizasyon çalışmaları her bir primer çiftine uygulanmıştır. Bu çalışmalar sonucunda beklenen boyutta DNA fragmenti [IL-7 Forward/IL-7 Reverse primer] kombinasyonunda ve 4. optimizasyon çalışması kapsamında kullanılan enzim ve PCR içeriği ile sağlanmıştır (Çizelge 4.1., Şekil 4.3.).

Çizelge 4.1. *IL7*'nin çoğaltımı için yapılan optimizasyon çalışmalarının sonuçları

Optim. no	Değişken	Marka	Primer çifti	Annealin sıcaklığı	PCR ürünü (bç)
1	Klasik taq DNA pol.	Invitrogen, cat no: 10342020	IL7-Frw.31/Rvs534	55-60 ºC	-
1	Klasik taq DNA pol.	Invitrogen, cat no: 10342020	IL7-Frw/Rvs (Lou vd 2009)	55-60 ºC	-
1	Klasik taq DNA pol.	Invitrogen, cat no: 10342020	IL7 Fr-SphII/RvBamHI	55-60 ºC	-
1	Klasik taq DNA pol.	Invitrogen, cat no: 10342020	IL7 Fr-SphII/RvHindIII	55-60 ºC	-
2	PCR master miks ve MgCl2 konst.	Genet Bio, cat no: G-5000	IL7-Frw.31/Rvs534	55-60 ºC	-
2	PCR master miks ve MgCl2 konst.	Genet Bio, cat no: G-5000	IL7-Frw/Rvs	55-60 ºC	-
2	PCR master miks ve MgCl2 konst.	Genet Bio, cat no: G-5000	IL7 Fr-SphII/RvBamHI	55-60 ºC	-
2	PCR master miks ve MgCl2 konst.	Genet Bio, cat no: G-5000	IL7 Fr-SphII/RvHindIII	55-60 ºC	-
2	PCR master miks ve MgCl2 konst.	ThermoFisher, cat no: K1081	IL7-Frw.31/Rvs534	55-60 ºC	-
2	PCR master miks ve MgCl2 konst.	ThermoFisher, cat no: K1081	IL7-Frw/Rvs	55-60 ºC	-
2	PCR master miks ve MgCl2 konst.	ThermoFisher, cat no: K1081	IL7 Fr-SphII/RvBamHI	55-60 ºC	-
2	PCR master miks ve MgCl2 konst.	ThermoFisher, cat no: K1081	IL7 Fr-SphII/RvHindIII	55-60 ºC	-
3	AQ90 High fidelity Taq Pol.	AMPLIQON, catno:A457401	IL7-Frw.31/Rvs534	55-60 ºC	-
3	AQ90 High fidelity Taq Pol.	AMPLIQON, catno:A457401	IL7-Frw/Rvs	55-60 ºC	-
3	AQ90 High fidelity Taq Pol.	AMPLIQON, catno:A457401	IL7 Fr-SphII/RvBamHI	55-60 ºC	-
3	AQ90 High fidelity Taq Pol.	AMPLIQON, catno:A457401	IL7 Fr-SphII/RvHindIII	55-60 ºC	-
4	Platinum High fidelity Taq Pol.	Invitrogen, cat no:DBgB1d	IL7-Frw.31/Rvs534	55-60 ºC	-
4	**Platinum High fidelity Taq Pol.**	**Invitrogen, catno:DBgB1d**	**IL7-Frw/Rvs**	**56, 57, 58 ºC**	**2110**
4	Platinum High fidelity Taq Pol.	Invitrogen, cat no:DBgB1d	IL7 Fr-SphII/RvBamHI	55-60 ºC	100
4	Platinum High fidelity Taq Pol.	Invitrogen, cat no:DBgB1d	IL7 Fr-SphII/RvHindIII	55-60 ºC	100

Optimizasyon çalışmaları sonucunda Platinum High fidelity Taq DNA Polimeraz (Invitrogen, cat no:DBgB1d) ile IL7 Forward / IL7 Reverse (Lou vd 2009) primer

kombinasyonu kullanılarak yapılan gradient PCR sonucunda 56, 57, 58 ve 60°C'lerde yaklaşık 2110 bç' de *IL7* için uygun DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.3.). Daha sonraki cDNA'dan genin çoğaltımı sürecinde bu enzim ve IL7 Forward / IL7 Reverse primer çifti kullanılmış ve annealing sıcaklığı 58^{o}C olarak kabul edilmiştir.



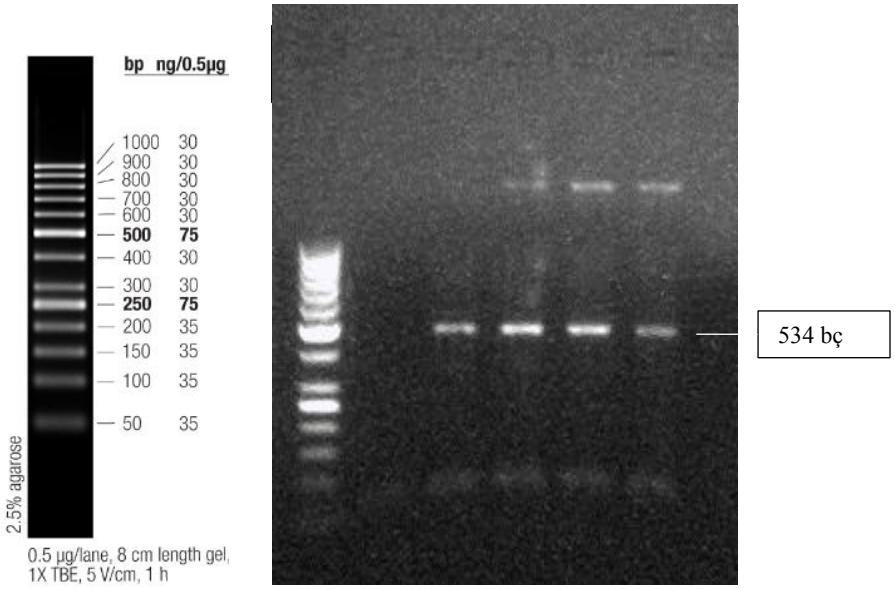
Şekil 4.3. IL-7 Forward / IL-7 Reverse primer çifti ile gDNA gradient PCR jel görüntüsü

4.1.4. cDNA'dan *IL7*'nin PCR ile Çoğaltımı

Mononükleer beyaz kan hücrelerinden izole edilen total RNA konsantrasyonu spektrofotometrede ölçüm yapılarak 35.3 ng/µL olarak tespit edilirken saflığı da 1.87 olarak bulunmuştur. RNA miktarı kısıtlı olduğundan agaroz jelde analiz edilmemiştir. Total RNA'nın 350-500 ng'ı cDNA sentez için kullanılmış ve High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen cDNA'nın 2 µL'si *IL7*'nin çoğaltımı için kalıp olarak kullanılmıştır. *IL7* çoğaltımı için gDNA'da iyi sonuç veren ve Luo vd. (2009)'da önerilen IL-7 Forward/Reverse primer kombinasyonu kullanılmıştır. Ayrıca genin çoğaltımında yüksek doğrulukta sentez yapabilen (High Fidelity) DNA polimeraz kullanılmıştır. *IL7*'nin kodlama yapan ve IL-7 Forward/Reverse primer kombinasyonu ile çoğaltılan kısmı 534 bç boyutundadır ve yapılan PCR'lar sonucunda bu boyutta DNA fragmenti elde edilmiştir (Şekil 4.4.). Bu fragmentler steril bir bistüri yardımıyla kesilerek alınmış ve

saflaştırılmıştır. 1000 bç üzerinde görülen bantların, gDNA kontaminasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.4. Platinum taq DNA polymerase ile cDNA'dan çoğaltılan IL7'nin jel görüntüsü

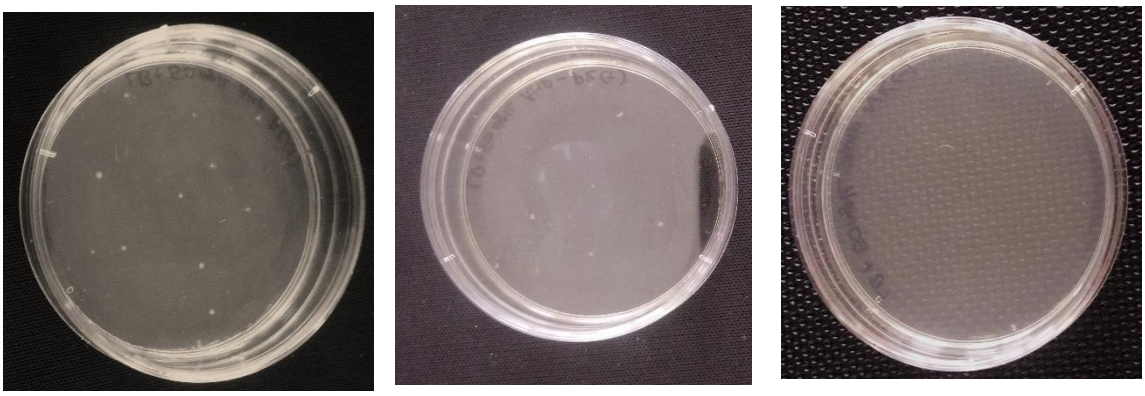
4.2. *IL7*'nin Klonlanma Vektörüne Bağlanması

Jelden kesilerek *IL7*'ye ait DNA fragmenti saflaştırılmıştır. Spektrofotometrede konsantrasyon ölçümü yapılmış ve 10 ng/µL'nin altında konsantrasyonu olan örnekler, DNA konsantratör kullanılarak 30-100 ng/µL konsantrasyona çıkarılmıştır. Konsantre edilen *IL7*'ye ait DNA fragmenti, pJET1.2/Blunt vektörü ve pCR-BluntII-TOPO vektörlerine klonlanmak üzere ligasyonları yapılmıştır. Ligasyon ürünleri *E. coli*'ye transformasyonu için kullanılmıştır.

4.2.1 *E. coli*'ye Transformasyon

pJET 1.2/Blunt vektörüne klonlanan *IL7*'nin *E. coli*'ye transformasyonu için 3 deneme yapılmış, ilk denemede herhangi bir koloni üremesi gözlenmemiştir. İkinci ve

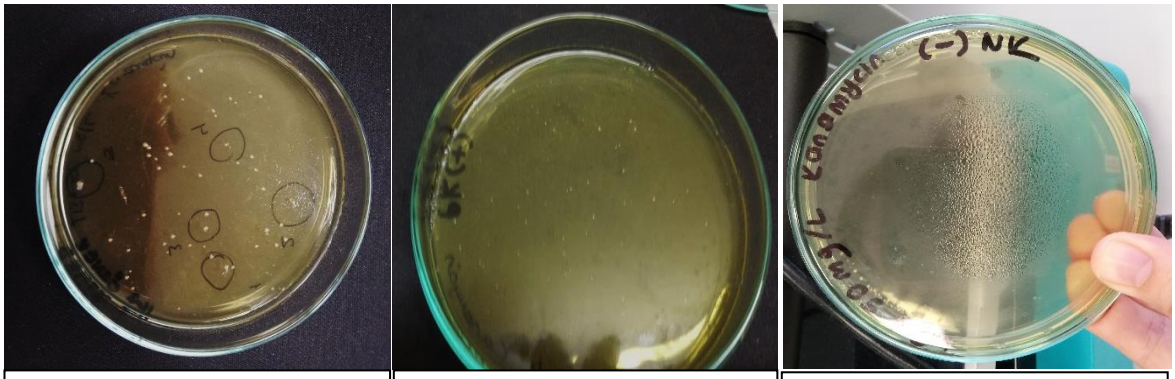
üçüncü denemelerde ise LB+50 mg/mL ampisilinli besiyerinde *IL7* ve pozitif kontrol için 3-10 koloninin ürediği gözlenirken, negatif kontrolde üreme gözlenmemiştir (Şekil 4.5.).



pJET1.2/Blunt +*IL7*	pJET1.2/Blunt +kontrol	Negatif kontrol

Şekil 4.5. pJET 1.2/Blunt vektörle transformasyon (LB+50 mg/mL ampisilin)

pCR-BluntII-TOPO vektörüne klonlanan *IL7*'nin *E. coli*'ye transformasyonu için 2 deneme yapılmış, ilk denemede herhangi bir koloni üremesi gözlenmemiştir. İkinci denemede ise LB+50 mg/mL kanamisinli besiyerinde *IL7* ve pozitif kontrol için 10'dan fazla koloninin ürediği gözlenirken, negatif kontrolde de birkaç koloni gözlenmiştir. Bu durum elde edilen olası transformantların güvenirliliği konusunda şüphe oluşturmuş ancak yine de doğrulama çalışmaları yürütülmüştür (Şekil 4.6.).



pCR-BluntII-TOPO +*IL7*	pCR-BluntII-TOPO +kontrol	Negatif Kontrol

Şekil 4.6. pCR-BluntII-TOPO vektörle transformasyon (LB+50 mg/mL kanamisin)

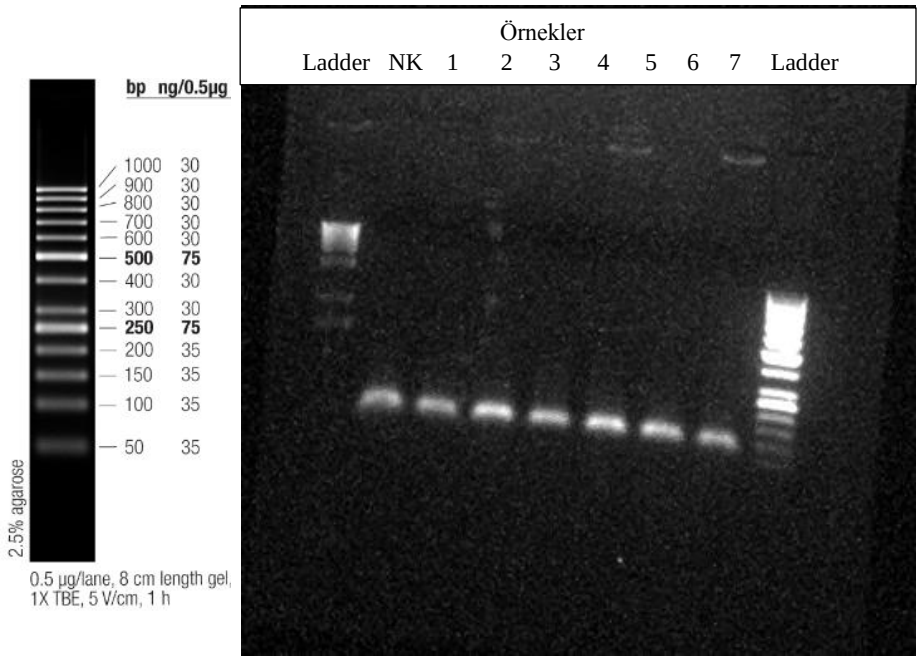
4.3. Transformantların Analizi

4.3.1. PCR ile Doğrulama

Transformant bakterileri belirleyebilmek için besiyerinde gözlenen kolonilerin *IL7* DNA'sı taşıyıp taşımadıkları PCR ile doğrulanmıştır.

4.3.1.1. pJET1.2/Blunt İçin PCR ile Doğrulama

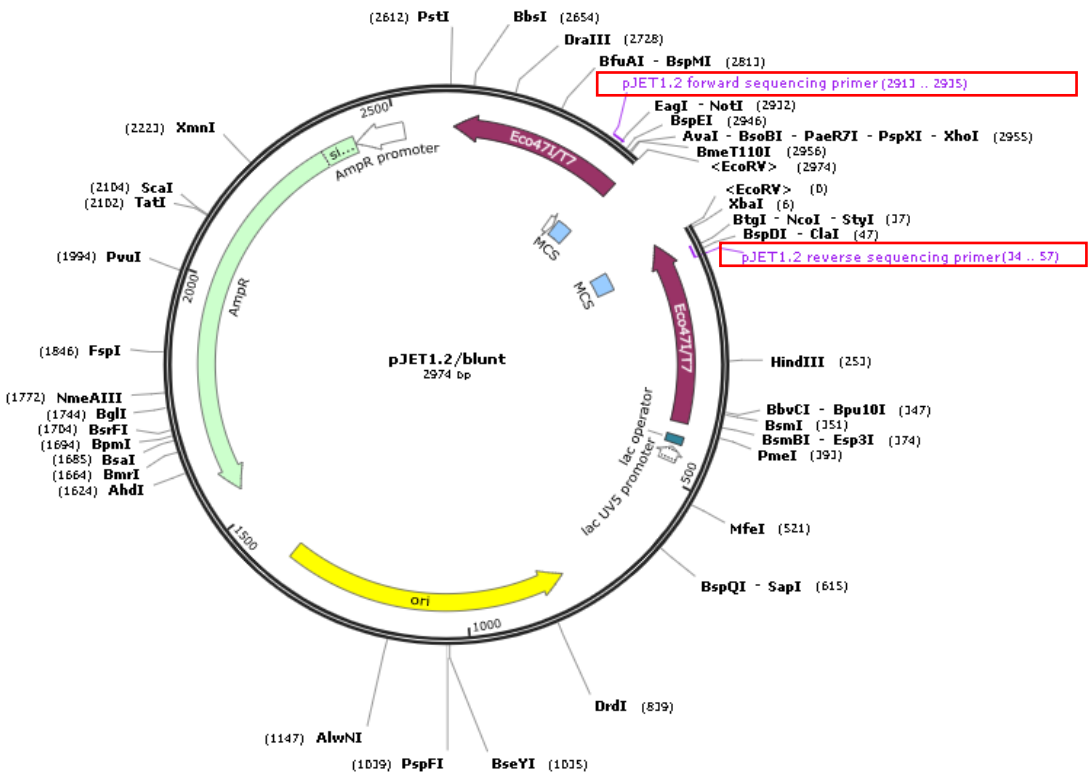
pJET1.2/Blunt vektörüne *IL7*'nin klonlanması ve E. coli'ye transformasyonun ardından besiyerinde gözlenen koloniler PCR ile doğrulanmaya çalışıldı. Bu kolonilerin, *IL7*'ye ait DNA'yı içerip içermediğini kontrol için öncelikle *IL7*'ye ait primerler (2. Primer çifti) kullanılarak koloni PCR yapılmış ancak sonuç elde edilememiştir (Şekil.4.7.). Ancak bu primer ile yapılan PCR'larda zaman zaman çalışmama durumu ile karşılaşılmaktadır. Bu nedenle daha sonra pJET1.2/Blunt vektörünün kendi sequencing primerleri kullanılarak koloni PCR uygulanmıştır.



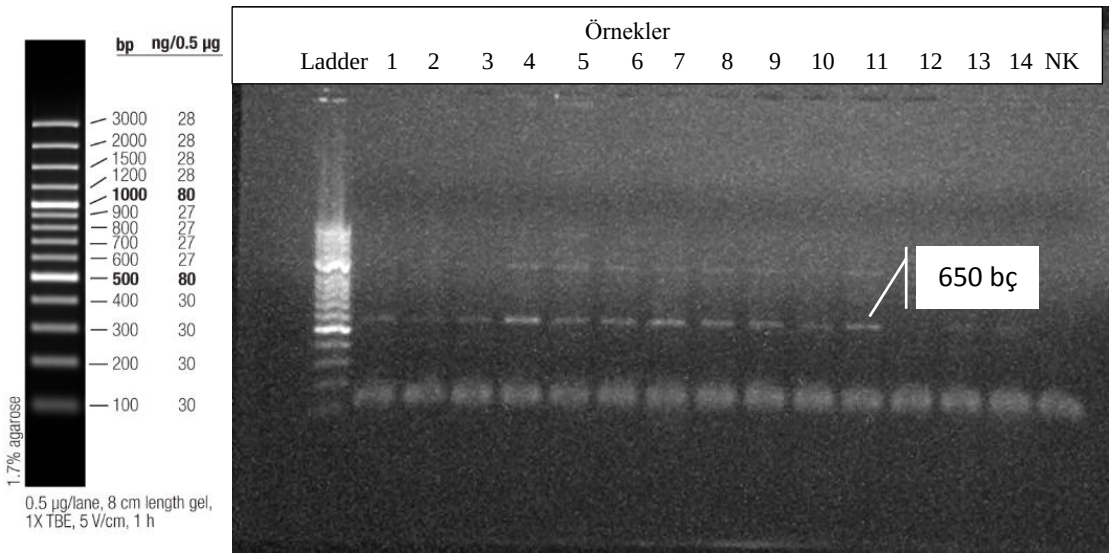
Şekil.4.7. *IL7*'ye ait primerler ile yapılan koloni PCR sonucu

pJET1.2/Blunt vektörü dizileme-forward primer 2913-2935 bç aralığında ve reverse primer ise 35-57 bç aralığında yer almaktadır (Şekil 4.8.). Bu primerler ile PCR sonucu elde edilecek DNA fragmentinin boyutu, *IL7* insert DNA'sının varlığında yaklaşık 650 bç boyutunda olması beklenmektedir. pJET 1.2/Blunt vektörünün primerleri

ile yapılan koloni PCR sonucunda 13 kolonide (1-11, 13, 14) beklenen boyutta DNA bantları gözlenmiştir (Şekil 4.9.).



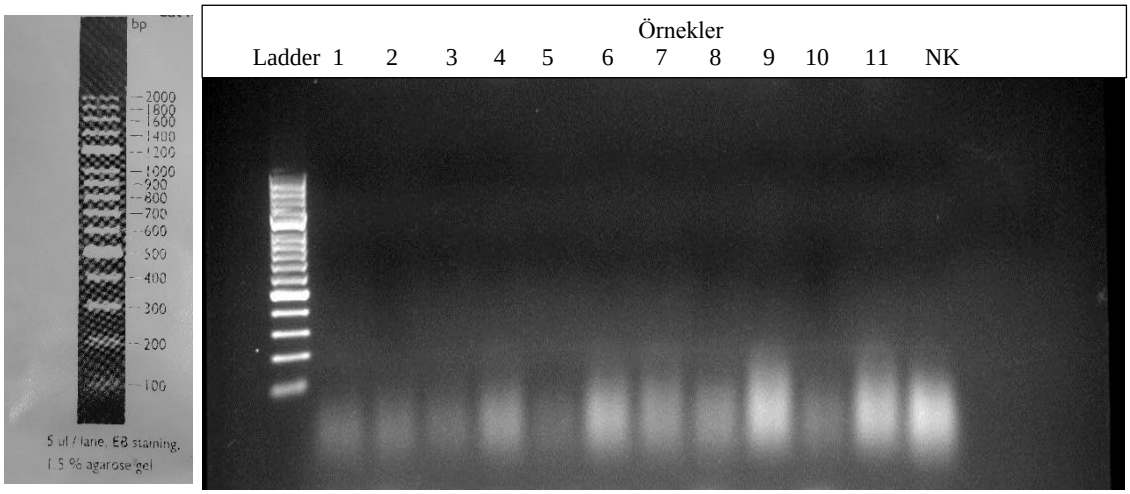
Şekil 4.8. pJET 1.2/Blunt vektör haritası



Şekil 4.9. pJET1.2/Blunt vektörü dizileme primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu

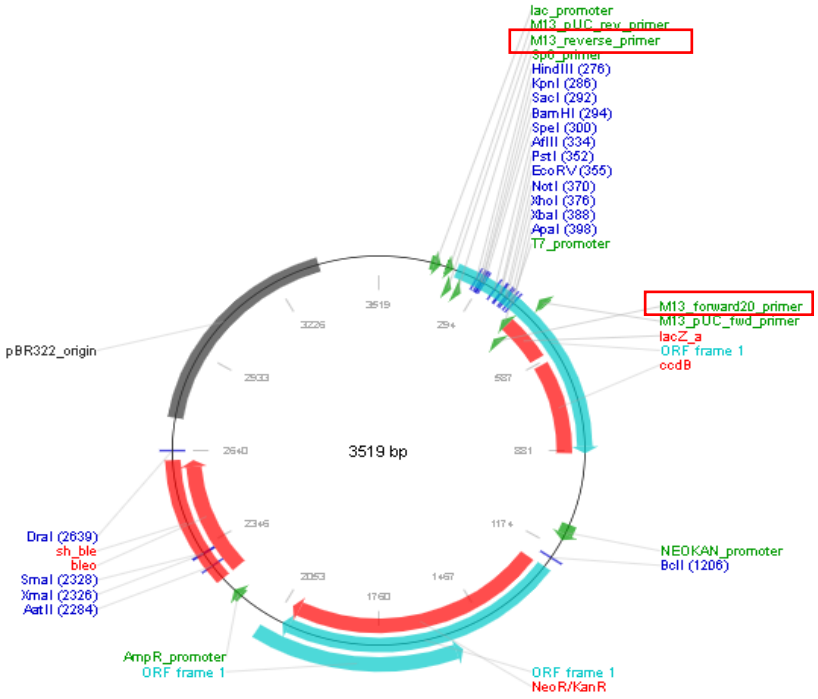
4.3.1.2. pCR-BluntII-TOPO İçin PCR ile Doğrulama

pCR-BluntII-TOPO vektörüne *IL7*'nin klonlanması ve *E. coli'*ye transformasyonun ardından besiyerinde gözlenen koloniler PCR ile doğrulanmaya çalışıldı. Bu koloniler, yine öncelikle *IL7*'ye ait primerler kullanılarak koloni PCR yapılmış ancak sonuç elde edilememiştir (Şekil.4.10). Daha önce de açıklandığı gibi *IL7* primerleri ile yapılan PCR'larda zaman zaman çalışmama durumu ile karşılaşılmaktadır. Bu nedenle daha sonra pCR-Blunt vektörünün dizileme primerleri olan M13 primerleri kullanılarak k oloni PCR yapılmıştır.

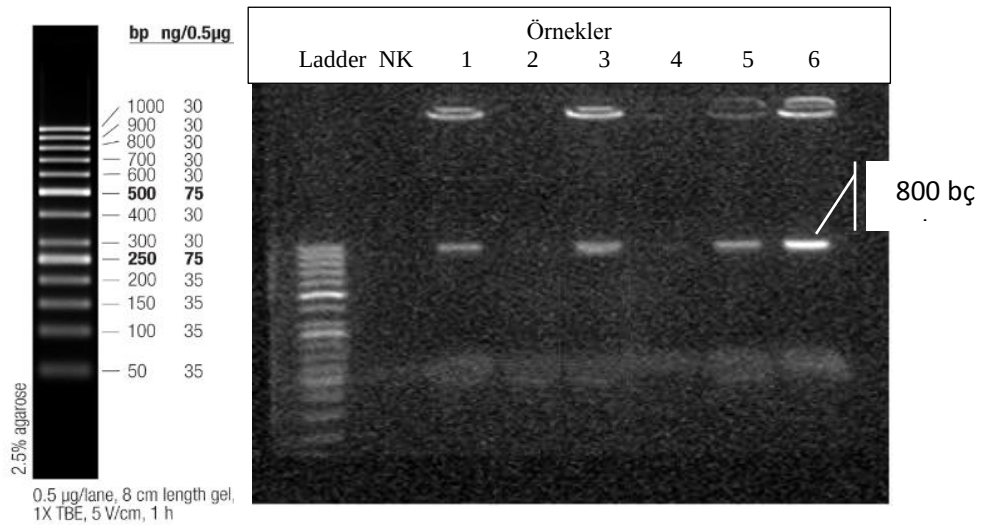


Şekil.4.10. *IL7*'ye ait primerler ile yapılan koloni PCR sonucu

pCR-BluntII-TOPO vektörünün kendi dizileme primerleri (M13) kullanılarak koloni PCR gerçekleştirilmiştir. M13-forward primeri 448-432 bç aralığındadır, reverse primer ise 207-225 bç aralığında yer almaktadır (Şekil 4.11.). *IL7* DNA fragmenti kolonlama bölgesine yerleştiğinde, M13 primerleri ile çoğaltılan DNA fragmentinin beklenen boyutu yaklaşık 800 bç olmaktadır. M13 primerleri ile yapılan PCR sonucunda 4 kolonide (1, 3, 5 ve 6 nolu koloniler) 800 bç boyutunda DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 4.12.).



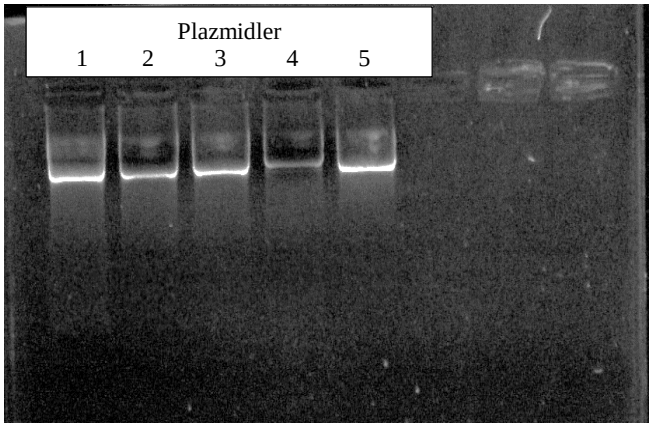
Şekil 4.11. pCR-Blunt II-TOPO vektör haritası



Şekil 4.12. pCR –BluntII-TOPO vektörünün primerleri (M13) ile yapılan koloni PCR sonucu

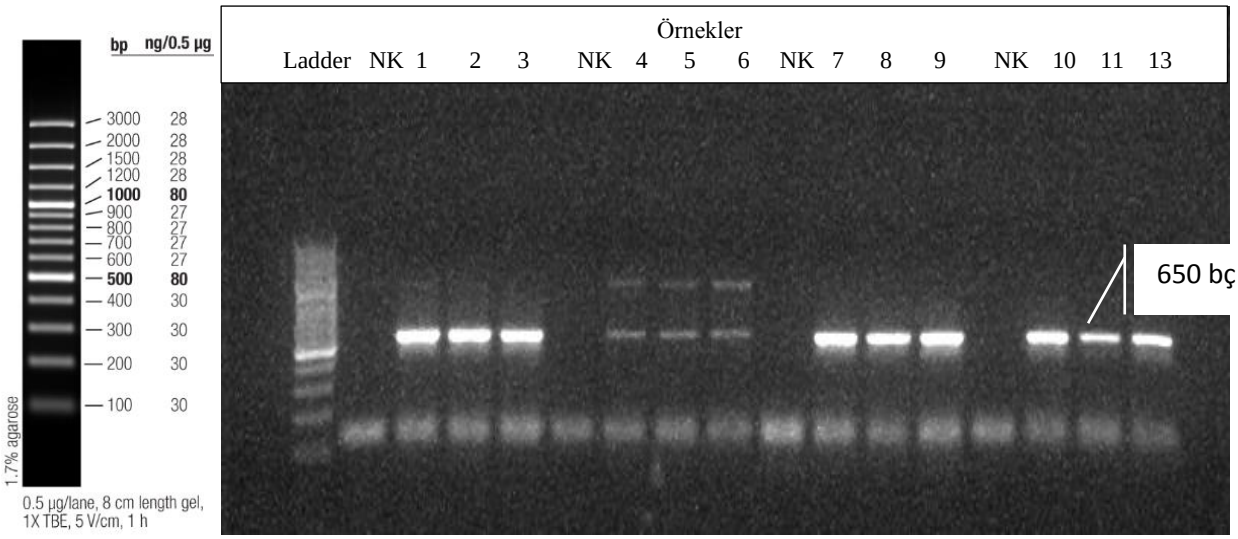
4.3.2. Dizi Analizi ile Doğrulama

pJET1/2.Blunt vektörüne klonlama sonucu elde edilen ve koloni PCR sonucu pozitif olan kolonilerden bakteri çoğaltımı yapılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmidlerin konsantrasyonu spektrofotometrede ölçülerek 250-1200 ng/uL olarak tespit edilmiştir. İzole edilen plasmidler %1'lik agaroz jel de görüntülenmişlerdir (Şekil 4.13.)



Şekil 4.13. pJET1/2.Blunt vektörüne klonlama sonucu elde edilen kolonilerden izole edilen plazmit DNA'ları

Dizi analizi için izole edilen plasmid DNA'ları kalıp olarak kullanılmış ve pJET1/2-Blunt vektörünün dizileme primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR sonucu çoğaltılan ve uygun boyutta olan DNA fragmentleri (650 bç) jelden kesilip saflaştırılarak dizi analizi için kullanılmışlardır (Şekil 4.14.). Dizi analizi özel bir firmadan hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. Ancak DNA transferi sırasında yıkılmış olabileceği ve bu nedenle dizileme sonucunda sağlıklı bir sonuç elde edilemediği bildirilmiştir.



Şekil 4.14. Dizi analizi için plazmid DNA'sı kullanılarak çoğaltılan *IL7*'yi temsil eden DNA (650 bç) bantları

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanlarda, IL-7 T hücrelerinin gelişimi için gereklidir ve immün sistem hastaların (kemoterapi, radyasyon, AIDS ve kemik iliği nakli) lenfoid rekonstrüksiyonu için potansiyel terapötik uygulamalara sahiptir. Terapötik uygulamalarda kullanılmasından dolayı son yıllarda IL-7'ye talep artmıştır ve IL-7 ile ilgili rekombinant üretimi üzerine çalışmalar yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir.

Ülkemizde ise henüz *IL7*'nin klonlanması ve IL-7'nin rekombinant üretimine dair akademik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bu tez çalışması ile *IL7'nin E. coli* bakterisine klonlanması başarılmış ve IL-7'nin mikrobiyal üretimi için ilk adımlar gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde IL-7'nin rekombinant olarak üretimi konusunda çalışmaların azlığı göz önüne alındığında tez kapsamında gerçekleştirilen klonlama çalışmaları ve elde edilen *IL7* taşıyan klonların önemi açıktır. Elde edilen klonlar daha sonra rhIL-7 üretimi için temel bir kaynak niteliği taşımaktadır. Ayrıca edinilen bilgi birikimi bu yöndeki çalışmaların hız kazanmasına katkı sağlayacaktır.

Literatürde yer alan *IL7*'nin klonlanması ve hIL-7'nin rekombinant üretimine dair çalışmalar incelendiğinde, IL-7'nin terapötik olarak değerinin ortaya çıkmasının ardından klonlama çalışmalarının 2000'li yıllarda başladığı ve bugüne kadar devam ettiği görülmektedir. 2003 yılında Oualette vd. (2003) tarafından hIL-7'nin bir rekombinant formu, bT7 promotörünün kontrolü altında *E. coli HMS174 (DE3) pLysS'*de klonlanmış ve büyük ölçekli üretimi yapılmıştır. Diğer birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da *IL7* sentetik olarak elde edilmiş, 456 bç'lik gen dizisi başlangıçta PCR tabanlı bir klonlama stratejisi ile pET-11d'ye (Novagen) yerleştirilmiştir. Ardından klonlanan gen dizisi, ekspresyon vektörü pLC124'ye aktarılmıştır. HMS174 (DE3) pLysS (pLC124)

ekspresyon sistemi ile expresyon sağlanmış, fermentasyon ve saflaştırma adımları gerçekleştilmiştir. Bir litre fermentör ürünü için 10 mg saflaştırılmış rhIL-7 elde edilmiştir (Oualette vd., 2003).

Luo vd. (2009) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, *IL7* gen kaynağı olarak satın alınan ilgili cDNA kütüphanesi klonu kullanılmıştır. cDNA klonundan tez çalışmasında da kullanılan primerler ile PCR yoluyla *IL7* çoğaltılmış ve mayaya (*Pichia pastoris*) klonlanmıştır. Klonlama için *Pichia pastoris X-33* suşu, ekspresyon vektörü olarak da pPICZaB kullanılmıştır. Böylece maya ekspresyon sisteminde aktif rekombinant proteinin ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve ticari kaynaklarla karşılaştırılması araştırılmıştır. *IL7*'nin doğal N terminalini ifade etmek için, pPICZaB'nin bir faktör sekresyon sinyaline çerçeve içinde klonlanmasına izin veren bir XhoI bölgesi tanıtılmış ve KEX2 bölünme bölgesini kodlayan bir nükleotit sekansı *IL7*'nin önüne yerleştirilmiştir. Fermentasyon ve saflaştırma adımlarının ardından SP Sepharose FF katyon değişim kromatografisi kullanılarak %95 saflıkta 35 mg/L verimle saflaştırılmış rhIL-7 elde edilmiştir. Saflaştırılmış rhIL-7'nin pre-B hücre MTT çoğalma tahliliyle fonksiyonel analizi, ekpresyon ürününün ticari kaynaklarla karşılaştırılabilir spesifik bir aktiviteye sahip olduğunu kanıtlamıştır. Ve bunun klinik uygulamalar için kullanılan rhIL-7'nin büyük ölçekli üretimini gerçekleştirilebileceğini gösterilmiştir (Luo vd, 2009).

Bir başka çalışmada, araştırmacı hIL-7'nin üretim yöntemlerinin geliştirilmesine ve insan proteinlerinin bitkilerde rekombinant üretimine katkıda sağlamayı amaçlamıştır. Bu çalışmada üretici bitki kültür sistemini tanımlamak ve bitki kültürü sistemlerinden hIL-7 rekombinant proteinlerini üretip saflaştırma üzerine yoğunlaşılmıştır. Bitkilerde rekombinant proteinlerin ekspresyonun, diğer ekspresyon sistemlerine göre üstünlüğü ortaya konmak istenmiştir. *IL7'*nin *E.coli rosetta-gami* B hücrelerine, BY-2 hücre hattına, tütün kökü tüylerine transfrome etmek için başarılı bir şekilde pET32c (+) / IL7; pENTR221 / cal / IL7; pK7WG2D.1 / cal / IL7; pRTRA 35S / IL7-histag-cmyc-100xELP transgenik vektörlerini tasarlamışlardır. IL-7 rekombinant proteinlerinin en yüksek içeriği toplam çözünür proteinlerin 36.7 ng/µg'si, en düşük ise toplam çözünür proteinlerin 2.25 ng / µg si olarak elde edilmiştir. Ekspresyon sistemlerinden elde edilen IL-7 proteinlerinin biyoaktivitesi, 2 µg/ml'de %82.5'e ulaştığı belitilmiştir (Hoang, 2017).

Sunulan tez çalışması ile *IL7*'nin *E. coli* baktesine klonlanması amaçlanmıştır. Bununla birlikte çalışmanın asıl hedefi literatürde yer alan çalışmalara benzer biçimde rekombinant IL-7'nin üretiminin gerçekleşmesi için bir başlangıç oluşturmak ve gerekli bilgi birikimine katkı sağlamaktır. *IL7* gen kaynağı olarak sağlıklı bireyden alınan periferik kandan ayrıştırılan mononükleer beyaz kan hücreleri kullanılmıştır. NCBI gen bankasından sağlanan *IL7*'ye ait diziler kullanılarak genin çoğaltılması ve ayrıca doğrudan ekspresyon vektörüne klonlanması için primerler tasarlanmıştır. Planlanan PCR çalışmalarının optimizasyonu mononükleer beyaz kan hücrelerinden izole edilen gDNA'lar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bir yandan da aynı kan hücrelerinden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda başarılı bulunan PCR koşulları ile cDNA'dan *IL7* çoğaltılmış ve 2 ayrı klonlama vektörüne bağlanmıştır. pCR-BluntII-TOPO ve pJET 1.2/Blunt vektörlerine bağlanan *IL7 E. coli* bakterisine transforme edilmiştir. Elde edilen olası transgenik bakteri kolonileri PCR ile doğrulanmış ve içerdiği *IL7* dizisinin hata içerip içermediğinin belirlenmesi amacıyla ilgili DNA fragmenti plazmit DNA'sından çoğaltılmıştır. Saflaştırılarak özel bir firmaya nakledilen DNA fragmentlerinin dizi analizi hizmet alımı yoluyla sağlanmaya çalışılmış ancak transfer sırasında DNA'nın yıkılması olasılığına istinaden bir sonuç alınamadığı firma tarafınca raporlanmıştır.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında insana ait *IL7*'nin *E.coli* bakterisine klonlanması hedeflenmiş ve yapılan çalışmalar sonucunda pJET 1.2/Blunt vektörü aracılığıyla *IL7* içeren 3 bakteri kolonisi elde edilerek -20^{o}C'de stoklanmıştır.

KAYNAKLAR

Akdis, M., Burgler, S., Crameri, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*, *127*(3), 701-721.

Akyol, G. (1994). İnterlökinler. *Mikrobiyoloji Bülteni 28*. 286-293.

Almeida, H., Amaral, M., Lobao, P.(2011). Drugs obtained by biotechnology processing. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 47*(2), 200-207.

Bachmann, M.F., Oxenius, A. (2007). Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO reports, 8*(12), 1142-1148.

Bertani, G., (1951). Studies On Lysogenesis. *Department of Bacteriology, University of Illinois, Urbana, Illinois, 67*, 202-209.

Baykal, Y., Karaayvaz, M., Kutlu, M. (1998). İnterlökinler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, *18*(2), 77-84.

Biopharmaceuticals Market - Growth, Trends, And Forecast (2019 - 2024). (2019). 10 Haziran 2019 tarihinde https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biopharmaceuticals-market-industry adresinden erişildi.

Brown, N., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U., Gileadi, O. (2008). Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Elsevier*. Protein Expression and Purification, *59*(1), 94-102.

Boozarpour, S., Sadeghizadeh, M., Shokrgozar, M.A., Hosseinkhani, S., Shojaosadati, S.A., Gharavi, S., Ahangari, G., Ranjbar, B. (2010). Bacterial overexpression of the human interleukin-2 in insoluble form via the pET Trx fusion system. Iranian *Journal of Biotechnology*, *8*(4), 270-274.

Chen,Y.C., Yeh, M.K. (2018). *Biopharmaceuticals*. Chapter 1. London: IntechOpen.

Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., Helling, R. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(11), 3240-3244.

Dünya İlaç Pazarı. (2018). 9 Haziran 2019 tarihinde ieis.org.tr/ieis/tr/indicators/32/dunya-ilac-pazari adresinden erişildi.

Gawad, J.K., Tauro, S., Kolhe, S. (2016). Recombinant DNA Technology: A Short Communication. *International Journal of Pharmacovigilance*, *1*(2), 3.

Giasuddin, A.S.M., Ziu, M.M. (1996). Views for future development cytokines in health and disease: Implications for clinical medicine. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, *9*(3), 67-74.

Goodwin R.G., Lupton S., Schmierer A., Hjerrild K.JJerzy., R., Clevenger W., Gillis S., Cosman D.,. Namen A.E (1989). Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells, Proceedings of the *National Academy of Sciences of the United States of America 86* (1) 302– 306.

Hassan, R., El-Mowafy, M., Zaher, E.S. (2018). Expression and purification of human IL-2 protein from *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, *17*(17), 560-566.

Hoang, N.H. (2017). Research on Expressing The Recombinant Interleukin 7 Protein in Plant Culture Systems. *Thai Nguyen University*, *16*(5), 10267-10280.

Homo sapiens chromosome 8 interleukin 7 (IL7) gene, complete cds. (2019). 15 Haziran

2019 tarihinde https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AH006906.2 adresinden erişildi.

Interleukin-7 in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, *6*(1), 66-73.

Invitrogen™ Platinum™ *Taq* DNA Polymerase High Fidelity Manuel. (2019), 15 Haziran 2019 tarihinde https://www.fishersci.com/shop/products/invitrogen-platinum-i-taq-i-dna-polymerase-high-fidelity-3/p-4922143 adresinden erişildi.

İlbasmış Tamer, S., Değim İ. T. 2016. "Biyoteknolojik İlaclar, Genel Bakış", *Türkiye Klinikleri Journal Of Pharmacy Sciences"*, *5*(2), 77-92.

Justiz Vaillant A., Qurie, A. (2019). Interleukin, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499840/

Khan, S., Ullah, M.W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., Hou, H. (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, 2016, Article ID 2405954, 1-14.

Kishore, K., Krishan P.(2009). Pharmacology of Recombinant or Genetically Engineered Drugs. *Journal of Young Pharm*acists, *1*(2), 140-150.

Kogut, M.H (2010). Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry: A review. *Avian Pathology*, *29*(5). 395-404.

Lagassé, D., Alexaki, A., Simhadri, V., Katagiri, N., Jankowski, W., Sauna, Z., Kimchi-Sarfaty, C. (2017). Recent Advances in (therapeutic protein) drug development [version; referees: 2 approved]. *F1000Research*. *6*(113), 1-17.

Landgraf, W., Sandow, J. (2016). Recombinant Human Insulins – Clinical Efficacy and Safety in Diabetes Therapy. *European Endocrinology*, *12(*1), 12–7.

Lipiainen, T., Peltoniemi, M., Sarkhel, S., Yrjonen, T., Vuorela, H., Urtti, A., Juppo, A. (2014). Formulation and Stability of Cytokine Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 104*(2), 307–326.

Luo, Y., Kong, X., Xu, A., Jin, S., Wu, D. (2009). Expression, purification, and functional characterization of recombinant human interleukin-7. *Protein Expression and Purification, 6*(1), 1-4.

Nausch, H., Huckauf, J., Koslowski, R., Meyer, U., Broer, I., Mikschofsky, H. (2013). Recombinant Production of Human Interleukin 6 in *Escherichia coli*. *Plos One. 8*(1), e54933. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054933

On Soruda Biyoteknolojik İlaçlar. (2016, Ekim). 20 Nisan 2019 tarihinde http://www.ieis.org.tr/ieis/assets/media/Bio/10_soruda_biyoteknolojik_ilaclar.pdf adresinden erişildi.

Open Reading Frame For IL-7. (2017). 20 Nisan 2019 tarihinde http://genomics.senescence.info/genes/seq.php?id=46&type=orf adresinden erişildi.

Oprelvekin. (2016). 20 Nisan 2019 tarihinde https://livertox.nih.gov/Oprelvekin.htm adresinden erişildi.

Orhan, H. (2019, 19 Nisan). *İlaç Sektörel Bakış 2019*. 9 Haziran 2019 tarihinde https://assets.kpmg/content/dam/kpmg/tr/pdf/2019/04/sektorel-bakis-2019-ilac.pdf adresinden erişildi.

Orhan, H. (2018). *İlaç Sektörünün Geleceği Biyoteknolojide*. 9 Haziran 2019 tarihinde https://home.kpmg/tr/tr/home/gorusler/2018/04/ilac-sektorunun-gelecegi biyoteknolojide.html adresinden erişildi.

Ouellette, T., Destrau, S., Ouellette, T., Zhu, J., Roach, J.M., Coffman, J.D., Hecht, T., Lynch, J.E., Giardina, S.L. (2003). Production and purification of refolded recombinant human IL-7 from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, *30*(2). 156–166.

Primer 3 Plus Yazılımı. (2019). 13 Mayıs 2019 tarihinde http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi adresinden erişildi.

Quianzon, C.C., Cheikh I. (2012). History of insülin. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives*, *2*(2), Article: 18701,1-3. https://doi.org/10.3402/jchimp.v2i2.18701.

Rane, L. (2014). *Biology Of Interleukin-7 Variant Isoforms*. The Department Of Microbiology, Tumor And Cell Biology Stockholm, Sweden: Karolinska Institutet.

Recombivax HB. (2018). 13 Temmuz 2019 tarihinde https://www.fda.gov/media/74274/download adresinden erişildi.

Rider, P., Carmi, Y., Cohen, I. (2016). Biologics for Targeting Inflammatory Cytokines, Clinical Uses, and Limitations. *International Journal of Cell Biology*, *2016*, Article ID 9259646, 1-12.

Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Frontiers in Microbiology, *5*, Article 172, 1-17. DOI:10.3389/fmicb.2014.00172. http://dx.doi.org/10.1155/2016/9259646.

Sanchez-Garcia, L., Martin L., Mangues R., Ferrer-Miralles, N., Vazquez, E., Villaverde, A. 2016. "Recombinant Pharmaceuticals From Microbial Cells: A 2015 Update*", Biomed Central*, *15*(33), 1-7.

Sekhon, B.S. (2010). Biopharmaceuticals: an overview. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 34.* 1-19.

Shinde,S. A., Chavhan S. A., Sapkal S. B., Shrikhande V. N. (2018). Recombinant DNA Technology and its Applications: A Review. *International Journal of MediPharm* Research, *4*(2), 79-88.

Stenken1, J.A., Poschenrieder, A.J. (2015). Bioanalytical Chemistry of Cytokines-A Review. *Analytica Chimica Acta. 853,* 95–115.

Sutherland RG, Baker R, Fernandez KE (1989). The gene for human interleukin-7. *Hum Genet* 1989; *82*(4), 371-372.

Şardaş, S., Akgül, V. (2014). Biyobenzer Ürünlerle İlgili Global Toksisite Sorunları. *Toksikoloji Bülteni, 38,* 7.

The Race to Clone Factor VIII. (2016, 19 Nisan). 20 Nisan 2019 tarihinde https://medium.com/lsf-magazine/the-race-to-clone-factor-viii-ac354581d51b adresinden erişildi.

Toghraie, F.S., Sharifzadeh, S.M., Ramezani, A., Maymand, E.M., Yazdanpanah-Samani, M., Ghaderi, A. (2017). Cloning and Expression of Recombinant *Human. Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, *6*(1), 66-73.

Tu, LT. (2015, Eylül). *FDA Information on Medication Errors Involving Activase and TNKase*. 13 Temmuz 2019 tarihinde https://www.fda.gov/media/93606/download adresinden erişildi.

Türkiye İlaç Sektörü 2018 Raporu. (2019, Haziran). 10 Temmuz 2019 tarihinde http://ieis.org.tr/ieis/tr/sektorraporu2018#15 adresinden erişildi.

User guide: CloneJet PCR cloning kit user manual. (2019). 8 Haziran 2019 tarihinde https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-cloning/clonejet-pcr-cloning-kit.html adresinden erişildi.

UniProtKB-P13232 (IL7_HUMAN). (2019). 16 Mayıs 2019 tarihinde https://www.uniprot.org/uniprot/P13232 adresinden erişildi.

Von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R.(1995). Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *The Journal of Experimental Medicine.181*(4), 1519-1526.

Wingfield, P., Payton, M., Tavernier, J., Barnes, M., Shaw, A., Rose, K., Simona, M. G., Demczuk, S., Williamson, K., Dayer, J. 1986. "Purification and characterization of human. interleukin-1β expressed in recombinant Escherichia coli", *European Journal of Biochemistry*, *160*, 491-497.

- Zdravkovic, N., Rosic, M., Lutovac, M., Zdravkovic, V. (2018). Physiology and Pathology of Cytokine: Commercial Production and Medical Use. *Intechopen.* Chapter 3. DOI: 10.5772/66541

  Zero Blunt TOPO PCR CloningKit-User Guide. (2014, 14 Şubat). 15 Mayıs 2019 tarihindehttps://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/zeroblunttopo_man.pdf adresinden erişildi.

EK

EK-1. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Raporu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2019/76	
	PROTOKOL ADI	İnterlökin-7 E. Coli'ye Klonlanması ve Ekspresyonu	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:03/33**		**Tarih:11.02.2019**
	Üniversitemiz Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ'nin sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Gamze KORKUT'un tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda ve veri toplanacak yerlerden gerekli izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E (H)	(E) H	
Dr. Öğr.Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E (H)	(E) H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E (H)	E H	
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E (H)	(E) H	
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	Mazeretli
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	Mazeretli

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER			
İsim Soyisim	:	Gamze KORKUT	
Adres	:	Lüleburgaz / Kırklareli	
Telefon	:	5076605945	
E-mail	:	gamzekrkt@gmail.com	
Doğum tarihi	:	15.08.1988	
EĞİTİM BİLGİLERİ			
2016 – 2019		Yüksek Lisans - Trakya Üniversitesi / Biyoteknoloji ve Genetik	
2008 – 2013		Lisans - Ege Üniversitesi / Kimya Mühendisliği (İngilizce)	
İŞ DENEYİMİ			
2017-2018		Arven İlaç San. Tic. A.Ş. / Kalite Güvence	
2016-2017		Polifarma İlaç San. Tic. A.Ş. / Ar-Ge	
YABANCI DİLLER			
İngilizce		İleri Seviye	