

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FİBRİNOLİTİK LUMBROKİNAZ ENZİMİNİN FİLAMENLİ MANTAR
Aspergillus oryzae'de ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze BEK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL

HAZİRAN 2023

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİBRİNOLİTİK LUMBROKİNAZ ENZİMİNİN FİLAMENLİ MANTAR
Aspergillus oryzae'de ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze BEK
(215309002)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL

HAZİRAN 2023

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 215309002 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Gamze BEK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "FİBRİNOLİTİK LUMBROKİNAZ ENZİMİNİN FİLAMENLİ MANTAR *Aspergillus oryzae*'de ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Dr.Öğr.Üyesi Serdar UYSAL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Cem ALBAYRAK**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Muhammed Zeki DURAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi **: 10 Temmuz 2023**
Savunma Tarihi **: 12 Haziran 2023**



Sevgili aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamda beni her zaman destekleyen ve çalışmalarımda her zaman beni aydınlatan, tüm bilgi birikimini benimle paylaşan, emeğini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Serdar UYSAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamda enzim aktivite tayini deneyini yapmamda yardımcı olan ve tüm bilgi birikimlerini benimle paylaşan Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalında öğretim üyesi olarak görev yapmakta olan Sayın Prof. Dr. Mustafa Tunalı'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamda protrombin testi deneyini yapmamda yardımcı olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında öğretim üyesi olarak görev yapmakta olan Sayın Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, tüm bilgi birikimlerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Elif KARAMAN'a ve Beyza KİNSİZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca cihaz, kimyasal ve sarf malzemeler açısından araştırmamızı destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsüne teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde 20220602 nolu proje çalışmam ile araştırmamızı destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırması Projeleri Komisyon Başkanlığına teşekkürlerimi sunarım.

Temmuz 2023

Gamze BEK
(Moleküler Biyolog)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gamze BEK

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ii
BEYAN.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
SEMBOLLER	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı.....	3
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hemostaz ve Tromboz	4
2.2 Trombotik bozukluklar	6
2.2.1 Tromboz Risk Faktörleri	6
2.2.1.1 Kalıtsal risk faktörleri	6
2.2.1.2 Kalıtsal olmayan (edinsel, akkiz) risk faktörleri	9
2.3 Trombotik Hastalıklar.....	10
2.3.1 Ateroskleroz	10
2.3.2 İskemik İnme.....	11
2.3.3 Pulmoner Emboli	12
2.3.4 Derin Ven Trombozu	13
2.4 Trombotik hastalıkların tedavisi	13
2.5 Lumbrokinaz	15
2.6 Aspergillus mantarları.....	17
2.6.1 <i>Aspergillus oryzae</i>	18
2.6.2 <i>Aspergillus oryzae</i> 'nin morfolojisi ve yaşam döngüsü	19
2.6.3 <i>Aspergillus oryzae</i> 'nin transformasyonu	21
2.6.4 <i>Aspergillus oryzae</i> 'de protein sekresyonu	22
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan cihazlar	25
3.1.2. Kullanılan malzemeler ve kullanılma amaçları.....	27
3.2. Metod.....	28
3.2.1. Plazmid sentezi.....	28
3.2.2 <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40'a kodon optimizasyonu yapılmış lumbrokinaz PI239 enziminin <i>Escherichia coli</i> 'ye transformasyonu	29
3.2.2.1. <i>Escherichia coli</i> One Shot TOP10 kompetent hücrelerin hazırlanması	29
3.2.2.2 Ca ⁺⁺ kompetent hücrelerin transformasyonu	30

3.2.2.3 Bakteriden gliserol stok alma.....	30
3.2.2.4 Midiprep plazmit DNA izolasyonu.....	31
3.2.2.5 Restriksiyon endonükleazlar ile plazmid DNA'nın kesilmesi.....	31
3.2.2.6 Agaroz jel elektroforezi.....	31
3.2.2.7 Agaroz jel ekstraksiyonu.....	31
3.3 <i>Escherichia coli</i>'de üretilen lumbrokinaz PI239 geninin <i>Aspergillus oryzae</i>'ye protoplast transformasyonu.....	32
3.4 TAKA-amilaz-lumbrokinaz PI239 füzyon proteininin ekspresyonu.....	33
3.4.1. SDS-PAGE ve coomassie brilliant blue ile proteinlerin boyanması.....	34
3.5. Rekombinant füzyon proteininin büyük hacimli ekspresyonu ve konsantre edilmesi.....	35
3.6. Histidin etiketli rekombinant füzyon proteininin IMAC metodu ile saflaştırılması.....	36
3.6.1. Saflaştırılan histidin etiketli rekombinant füzyon proteininin SDS-PAGE ile analizi.....	37
3.6.2. Saflaştırılan histidin etiketli rekombinant füzyon proteininin Western Blot ile analizi.....	37
3.6.3. Saflaştırılan rekombinant proteinin tuzdan arındırılması ve tampon değişimi.....	38
3.7. Bradford yöntemi ile saflaştırılan rekombinant proteinin konsantrasyonunun ölçülmesi.....	38
3.8. Titanyumla hazırlanmış trombosit zengin fibrin (T-PRF) ve lökosit zengin fibrin (L-PRF) pıhtılarının hazırlanması ve fibrinolitik lumbrokinaz enzimi ile muamelesi.....	39
4.BULGULAR.....	44
4.1. Bakteriyel Transformasyon.....	44
4.1.1 Midiprep plazmid DNA izolasyonu.....	45
4.1.2. Plazmid DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi.....	45
4.1.3. Agaroz jel ekstraksiyonu.....	46
4.2. Aspergillus Protoplast Transformasyonu.....	46
4.3. Protein Ekspresyonu.....	48
4.3.1. SDS-PAGE.....	49
4.3.2. En iyi koloninin büyük hacimli protein ekspresyonu ve saflaştırılması..	50
4.5. Saflaştırılan histidin etiketli rekombinant füzyon proteinin SDS-PAGE ve Western Blot analizi.....	51
4.6. Saflaştırılan protein konsantrasyonunun Bradford yöntemi ile analizi.....	51
4.7. Fibrinolitik lumbrokinaz enziminin pıhtıları çözme analizi.....	51
4.8. Lumbrokinaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi.....	54
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	70

KISALTMALAR

5-FoA	: 5-Floroortik asit
APSAC	: İzole edilmemiş plazminojen SK aktivatör kompleksi
BSA	: Bovin Serum Albumin
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CaCl₂·2H₂O	: Kalsiyum klorür dihidrat
CD Agar medium	: Czapek Dekstroz-Agar
cm²	: Santimetre kare
Da	: Dalton
DMSO	: Dimetil sülfoksil
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPY	: Dekstroz pepton maya ekstraktı
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EcoRI	: <i>Escherichia coli</i> RY 13
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
g	: Yerçekimi kuvveti
gr	: Gram
HCl	: Hidrojen klorür
HindIII	: Haemophilus influenzae Rd
IU	: Uluslararası Enzim Ünitesi
kDa	: Kilo dalton
KH₂PO₄	: Monopotasyum fosfat
L	: Litre
LB	: Luria Broth
L-PRF	: Lökosit zengin fibrin
M	: Molar
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
MgSO₄·7H₂O	: Magnezyum sülfat heptahidrat
mL	: Mililitre
mM	: Mili molar
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
g	: Nanogram
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
PAGE	: Poliakrilamit jel elektroforezi
PEG	: Polietilen glikol
pH	: Solüsyon içerisindeki hidrojen gücü
pyrG	: Orotidine 5'-phosphate decarboxylase

rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TF	: Transformasyon tamponu
T-PRF	: Trombositten zengin fibrin
Tris-HCl	: Tris(hidroksimetil)-aminometan hidroklorür
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
V_{max}	: Maksimum enzim aktivitesi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü



SEMBOLLER

°C	: Derece Santigrat
%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikro Molar



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Venöz trombozda en çok görülen kalıtsal trombofilik defektler ve prevalansları.	7
Tablo 2: Kalıtsal olmayan trombofilik risk faktörleri.	10
Tablo 3: Protrombin Zamanı (PT) testi sonuçları.	54



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: (A) Arteriyel tromboz, (B) Venöz tromboz.....	5
Şekil 2: Ateroskleroz oluşumu ve ilerlemesi	11
Şekil 3: Ateroskleroz ve miyokard enfarktüsü.....	11
Şekil 4: Beyinde iskemik inme oluşumu.....	12
Şekil 5: Pulmoner emboli.....	12
Şekil 6: Derin ven trombozu	13
Şekil 7: Asya ve Kuzey Amerika’da hiper pıhtılaşmayı tedavi etmek amacıyla kullanılan ticari lumbrokinaz ürünü.....	16
Şekil 8: Lumbrokinazın iki farklı şekilde pıhtıları parçalama mekanizması.	16
Şekil 9: <i>Aspergillus oryzae</i> 'nin konidiofor yapıları.....	20
Şekil 10: <i>Aspergillus oryzae</i> 'de protein sekresyonu.....	22
Şekil 11: <i>Aspergillus oryzae</i> 'ye kodon optimizasyonu yapılmış plazmid tasarımı. ..	29
Şekil 12: 96 kuyucuklu plakada standartların ve protein örneklerinin Bradford yöntemi ile gösterilmesi.	39
Şekil 13: Antekübital damardan alınan kan örneği.....	40
Şekil 14: Titanyum tüplere konulan kan örneklerinin santrifüjlenmesi.....	40
Şekil 15: Santrifüj sonrası titanyum tüplerden alınan T-PRF ve L-PRF pıhtıları.....	41
Şekil 16: Fibrin pıhtıdaki eritrositlerden arındırılan plazma kısmı.....	41
Şekil 17: Fibrinolitik lumbrokinaz enzimi ile farklı konsantrasyonlarda muamele edilen plazma parçacıkları ve enzim eklenmeyen kontrol grubu.....	42
Şekil 18: Mavi sitratlı tüplere alınan kan örneği.....	42
Şekil 19: Santrifüj sonrası kan örneğinden ayrılan plazma ve PT kuvvetlerine eklenen plazma ile muamele edilen lumbrokinaz enzimi.....	43
Şekil 20: Sysmex Automated Blood Coagulation Analyzer (CS-1600, Japan) cihazı ile protrombin testinin yapılması.	43
Şekil 21: Ampisilinli LB Agar plakalarında geceboyu büyümüş transforme koloniler ve pozitif kontrol grubu.....	44
Şekil 22: Midiprep plazmid DNA izolasyonu sonrası elde edilen DNA miktarı.....	45
Şekil 23: EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmin DNA'nın agaroz jel görüntüsü.....	45
Şekil 24: Agaroz jel ekstraksiyonu sonrası elde edilen DNA miktarı.	46
Şekil 25: Transformasyon negatif ve pozitif kontrol plakaları.	47
Şekil 26: Transformasyon sonrası oluşan %0,5'lik Top Agar'da büyümüş transformant koloniler.....	47
Şekil 27: CD plakalarda 30°C'de 5-7 gün boyunca büyümüş transformant tekli koloniler.	48
Şekil 28: 1X DPY besiyerinde 1 gün boyunca eksprese olmuş protein örnekleri.	48
Şekil 29: 2X DPY besiyerinde 7 gün boyunca eksprese olmuş protein örnekleri.	49

Şekil 30: 2X DPY besiyerinde 3 gün boyunca eksprese olan protein örneklerinin SDS-PAGE sonrası coomassie blue boyası ile boyanarak görüntülenmesi.....	49
Şekil 31: 2X DPY besiyerinde 6 gün boyunca eksprese olan protein örneklerinin SDS-PAGE sonrası coomassie blue boyası ile boyanarak görüntülenmesi.....	49
Şekil 32: 2X DPY besiyerinde 7 gün boyunca eksprese olan protein örneklerinin SDS-PAGE sonrası coomassie blue boyası ile boyanarak görüntülenmesi.....	50
Şekil 33: GS-X7-3 kolonisi.....	50
Şekil 34: Saflaştırılan histidin etiketli GS-X7-3 proteininin SDS-PAGE ve Western Blot görüntüsü.....	51
Şekil 35: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların ilk 24 saatteki sonuçları.....	52
Şekil 36: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların 42. saatteki sonuçları.....	52
Şekil 37: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların 66. saatteki sonuçları.....	53
Şekil 38: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların 130. saatteki sonuçları.....	53
Şekil 39: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların 150. saatteki sonuçları.....	53

FİBRİNOLİTİK LUMBROKİNAZ ENZİMİNİN FİLAMENTLİ MANTAR *Aspergillus oryzae*'de ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

ÖZET

Solucan *Lumbricus bimastus*, vücut boşluğunda ve sindirim sisteminde keşfedilen lumbrokinaz adı verilen fibrinolitik bir enzime sahiptir. Lumbrokinaz özellikle Asya'da uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde gıda takviyesi olarak kullanılan, klinik onayı almış ve etkinliği kanıtlanmış antitrombotik bir ajandır. Homolog üretim kaynağı lumbrokinaz PI239 için *L. bimastus*'dur. Homolog olarak üretimlerinin kısıtlı, zor, zaman alıcı ve pahalı olması sebebiyle araştırmacılar bu enzimin heterolog çalışmalarına da yönelmiştir. Lumbrokinazın homolog üretimi düşük verimlidir ancak, heterolog üretimi sayesinde üretilen proteinin verimi artırılabilir. Lumbrokinazın şüana kadar sadece bakteri *Escherichia coli*, maya *Pichia pastoris*, keçi sütü, ayçiçeği ve tütün bitkisinde heterolog olarak üretimi yapılmıştır. Ancak literatürdeki varolan çalışmalar incelendiğinde, filamentli bir mantar olan *Aspergillus oryzae*'nin daha önce lumbrokinazın heterolog üretiminde hiç konak ekspresyon sistemi olarak kullanılmadığı tespit edilmiştir. *A. oryzae*, hem yüksek miktarlarda enzim üretme yeteneğine sahip olduğundan hem de GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde olduğundan dolayı homolog ve heterolog enzim üretimi için önemli bir endüstriyel kaynak olmuştur. Dolayısıyla fibrinolitik ve trombolitik etkilere sahip olan lumbrokinaz PI239, ilk defa bu çalışmada *A. oryzae*'de başarıyla üretilmiş ve saflaştırılmıştır. C-terminaline 6 tane histidin etiketlenmiş ve TAKA-Amilaz proteinine füzyon olacak şekilde *A. oryzae*'ye kodon optimize edilen lumbrokinaz PI239 enzimi, pUC19 plazmid vektörüne ligasyon yapılarak sentezletirilmiştir. Sentezlenen vektör önce *E. coli* TOP10 hücrelerine soğuk kalsiyum klorür metodu ile transforme edilmiştir. Transforme koloniler Ampisilinli Luria Broth (LB) besiyerine ekilmiştir ve ekspresyon başlatılmıştır. Ekspresyon sonrası midiprep izolasyonu yapılmıştır. EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesim ve jel ekstraksiyonu sonrası DNA'nın *A. oryzae*'ye protoplast yöntemi ile transformasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, CD agar plaklarına ekimi yapılarak koloniler seçilmiştir. Daha spesifik koloniler ve protein salınımları için koloniler DPY besiyerinde inoküle edilmiştir. Daha sonra en iyi koloni seçilerek büyüme hacimli ekspresyon başlatılmıştır. Üretilen histidin etiketli rekombinant protein IMAC metodu (İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan proteinin varlığı SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) ve Western Blot yöntemi ile ispatlanmıştır. Tampon değişim yöntemi ile protein imidazolden arındırılmıştır ve proteinin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile 87 µg/mL olarak saptanmıştır. Ardından titanyumla hazırlanmış trombositten zengin fibrin (T-PRF) ve lökosit zengin fibrin (L-PRF) pıhtılarına fibrinolitik lumbrokinaz enzimi eklenerek oda sıcaklığında 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. 150. saatte kontrol grubu hariç tüm

fibrin pıhtıları tamamen çözülmüştür. Protrombin Testi (PT) ile enzimin pıhtılaşma süresine etkisine bakılmıştır ve kontrol grubuna kıyasla pıhtılaşma süresi 5 saniye daha geç gerçekteşmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus oryzae*, Bradford, IMAC, lumbrokinaz, protoplast transformasyonu.



PRODUCTION AND PURIFICATION OF FIBRINOLYTIC LUMBROKINASE ENZYME IN FILAMENTOUS FUNGUS *Aspergillus oryzae*

SUMMARY

The worm *Lumbricus bimastus* has a fibrinolytic enzyme called lumbrokinase that has been discovered in its body cavity and digestive tract. Lumbrokinase is an antithrombotic agent that has been used as a food supplement in the treatment of many diseases for many years, especially in Asia, with clinical approval and proven effectiveness. The homologous production source for lumbrokinase PI239 is *L. bimastus*. Since homologous production is limited, difficult, time-consuming, and expensive, researchers have turned to heterologous studies of this enzyme. Homologous production of lumbrokinase is low-yield, but the efficiency of the protein produced can be increased by heterologous production. So far, lumbrokinase has been heterologously produced only in bacteria *Escherichia coli*, yeast *Pichia pastoris*, goat milk, sunflower, and tobacco plants. However, when the existing studies in the literature are examined, it has been determined that *Aspergillus oryzae*, a filamentous fungus, has never been used as a host expression system in the heterologous production of lumbrokinase. *A. oryzae* has been an important industrial resource for the production of homologous and heterologous enzymes, both because it can produce large amounts of enzymes and because it has GRAS (generally recognized as safe) status. Therefore, lumbrokinase PI239, which has fibrinolytic and thrombolytic effects, was successfully produced and purified in *A. oryzae* for the first time in this study. The lumbrokinase PI239 enzyme, which was codon optimized to *A. oryzae*, was synthesized by ligating into the pUC19 plasmid vector, with 6 histidines tagged to the C-terminus and fusion to the TAKA-Amylase protein. The synthesized vector was first transformed into *E. coli* TOP10 cells by the cold calcium chloride method. Transformed colonies were seeded on Luria Broth (LB) medium with Ampicillin and expression was initiated. Midiprep isolation was performed after expression. After cutting and gel extraction with EcoRI and HindIII restriction enzymes, DNA was transformed into *A. oryzae* by protoplast method. Then, colonies were selected by cultivation on CD agar plates. For more specific colonies and protein releases, colonies were inoculated in DPY medium. Then, the best colony was selected and expression was started with a large volume. The produced histidine-labeled recombinant protein was purified by the IMAC method (Immobilized Metal Affinity Chromatography). The presence of the purified protein was proved by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and Western Blot method. The protein was purified from imidazole by the buffer exchange method and the concentration of the protein was determined as 87 µg/mL by the Bradford method. Afterwards, fibrinolytic lumbrokinase enzyme was added to the platelet-rich fibrin (T-PRF) and leukocyte-rich fibrin (L-PRF) clots

prepared with titanium and incubated at room temperature for 7 days. At 150th hour, all fibrin clots dissolved completely except the control group. The effect of the enzyme on the clotting time was examined with the Prothrombin Test (PT), and the clotting time was 5 seconds later compared to the control group. The presence of the purified protein was proved by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and Western Blot method. The protein was purified from imidazole by the buffer exchange method and the concentration of the protein was determined as 87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by the Bradford method. Then, thrombocyte-rich fibrin (T-PRF) and leukocyte-rich fibrin (L-PRF) clots prepared with titanium were incubated at room temperature for 7 days with the addition of fibrinolytic lumbrokinase enzyme. At 150th hour, all fibrin clots dissolved completely except the control group. The effect of the enzyme on the clotting time was examined with the Prothrombin Test (PT), and the clotting time was 5 seconds later compared to the control group.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, Bradford, IMAC, lumbrokinase, protoplast transformation.



1. GİRİŞ

Dolaşım sistemi içinde bir pıhtının gelişmesi durumu tromboz olarak adlandırılmaktadır. Tromboz, dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Dünyada her dört kişiden biri pıhtı nedeniyle ölmektedir. Bu, günümüzde insanların karşı karşıya olduğu en ciddi sağlık sorunlarından birinin tromboz olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Ayrıca, Dünya çapında morbidite ve mortaliteye neden olan yeni koronavirüs hastalığı (COVID-19) raporlarına göre akciğerlerde, dalakta, beyinde, midede ve periferik damar sisteminde sıklıkla makro ve mikro seviyede trombotik komplikasyonlar gözlemlenmiştir (1-4).

Trombotik komplikasyonların önlenmesinde ve tedavisinde kompresyon uygulaması, anti-trombotik ilaç tedavisi ve ameliyat olmak üzere 3 temel tedavi yöntemi kullanılmaktadır. Ancak kompresyon ve cerrahi tedavi kesin çözüm olmamakla birlikte, hastaların günlük yaşamlarında çok fazla dikkat etmesi de gerekmektedir. Ayrıca, tedavi şekli ve uygulama yöntemi de hastanın yaşına, cinsiyetine, önceki sağlık hikayesine ve immün sistemine göre değişiklik göstermektedir. Streptokinaz, doku plazminojen aktivatörü (t-PA), ürokinaz (u-PA), APSAC (İzole edilmemiş plazminojen SK aktivatör kompleksi) ve pro-ürokinaz (scu-PA) olmak üzere en çok kullanılan 5 adet anti-trombotik ajan bulunmaktadır. Ancak APSAC ve pro-ürokinazın preparatları Türkiye’de bulunmamaktadır. Bu trombolitik ajanlar pahalıdır ve çok fazla yan etkisi bulunmaktadır (5). Bundan dolayı, güçlü ve etkili bir anti-trombotik ilaç keşfetmek araştırmacılar için önemli bir öncelik haline gelmiştir.

Asya’da uzun yıllardır fibrinolitik enzim takviyeleri kullanılmaktadır. Özellikle geleneksel Çin tıbbında uzun yıllardır ateş düşürücü ve idrar söktürücü olarak kullanılan solucanların fibrinolitik ve trombolitik etkileri bilim insanları tarafından keşfedilmiştir. Sonraki araştırmalar, solucanların vücut boşluğunda ve sindirim sisteminde keşfedilen lumbrokinazların bir fibrinolitik enzim sınıfı olduğunu ortaya çıkarmıştır (6-8). Uzun zamandır lumbrokinazın gıda takviyesi olarak fibrinolitik ve trombolitik etkilerinden yararlanılmaktadır. Solucanlardan ekstrakte edilen veya rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak üretilen lumbrokinazlar üzerinde çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Lumbrokinazın kan pıhtılaşmasının önlenmesi ve kan

dolaşımının iyileştirilmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu sebeple tüketiciler tarafından bu ürüne talep artmıştır. Artan talebin karşılanması amacıyla, lumbrokinazın yüksek verimde, yeterli saflıkta ve düşük maliyetle üretimi için yeni ekspresyon sistemleri geliştirilmektedir. Homolog olarak üretiminin kısıtlı, zaman alıcı ve pahalı olması sebebiyle araştırmacılar bu proteinin heterolog üretimi çalışmalarına yönelmiştir. Bugüne kadar lumbrokinaz heterolog olarak bakteri *Escherichia coli* (9-14), maya *Pichia pastoris* (15-20), keçi sütü (21) ve ayçiçeği ve tütün bitkisi gibi bitki ekspresyon sistemlerinde (22, 23) başarılı bir şekilde üretilmiştir. Her ne kadar *E. coli* ekspresyon sisteminin kullanım kolaylığı, hızlı büyümesi, düşük maliyeti ve yüksek verimde üretimi gibi avantajları olsa da posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştiremediği için, lumbrokinazlar *E.coli*'de inklüzyon cisimciği olarak üretilirler (9-14). Lumbrokinazlar, ökaryot ekspresyon sistemi olan *P. pastoris* 'te başarılı bir şekilde üretilmişlerdir. Ancak *P.pastoris*'te gen ekspresyonunun aktivasyonu için metanol kullanılması güvenlik endişesi teşkil etmektedir (15-20).

Literatürdeki varolan çalışmalar incelendiğinde, lumbrokinazın daha önce *Aspergillus* cinsi küf mantarlarında üretilmediği tespit edilmiştir. *Aspergillus* türleri gelişen teknoloji ile birlikte yüksek düzeyde salgılanan enzimler, birincil ve ikincil metabolitler üretirler, bundan dolayı en önemli ticari öneme sahip mantar türüdür (24-26).

Aspergillus, *Trichocomaceae* ailesinin bir üyesidir ve diğer mantar türlerinin aksine filamentli-ipliksi yapılı mantarlardır (24). *Aspergillus* mantarları yaklaşık 200 mantar türüne sahip bir cinstir. En yaygın türleri; *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger*'dir. Bazı *Aspergillus* türleri insan ve hayvanlarda ciddi hastalıklara yol açarken, bazıları da bitkilerde hastalık yapmaktadır. Ancak filamentli bir mantar olan *A. oryzae*, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde yer almaktadır. Ayrıca *A. oryzae*, glikolizasyon ve katlanma gibi posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilme, amilolitik ve proteolitik enzimler gibi büyük miktarlarda hidrolitik enzim üretme yeteneğine de sahiptir. Bu özellikler sayesinde, homolog ve heterolog enzim üretimi için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. *A. oryzae*'nin, güçlü protein salgılama yeteneği, hızlı büyüme, kolay kültüre ve optimize edilebilme özelliği, en önemli avantajlarındanıdır. Bu avantajları sayesinde de kısa sürede, güvenli ve yüksek verimde, az maliyetle protein üretimi

sağlanabilmektedir (27, 28). Bu çalışmada fibrinolitik ve trombolitik özelliklere sahip olan lumbrokinaz PI239, filamentli bir mantar türü olan *A. oryzae*'de üretilmiş ve saflaştırılmıştır.

1.1 Tezin Amacı

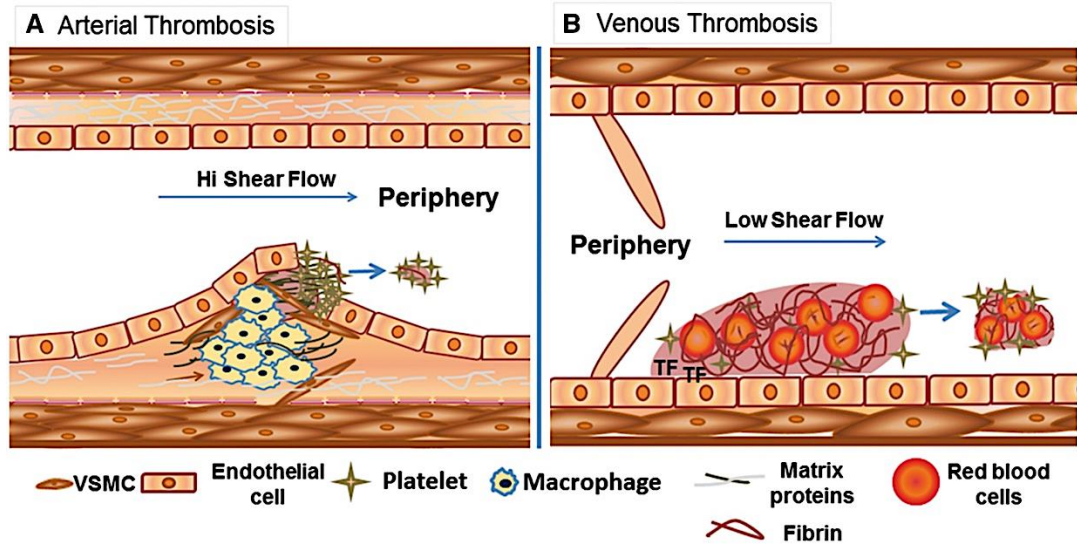
Lumbrokinaz fibrinolitik ve trombolitik etkiye sahip olduğundan dolayı birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Homolog olarak üretiminin kısıtlı, zaman alıcı ve pahalı olması sebebiyle araştırmacılar bu proteinin heterolog üretimi çalışmalarına yönelmiştir. Fakat farklı ekspresyon sistemlerinde üretilme çalışmalarına rağmen yeterli ve istenilen verimde üretimleri sağlanamamıştır. *A.oryzae*, amilolitik ve proteolitik enzimler gibi büyük miktarlarda hidrolitik enzim üretme yeteneğine sahiptir. Bu özellik sayesinde *A. oryzae*, homolog ve heterolog enzim üretimi için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. *A. oryzae*'nin güçlü protein salgılama, hızlı büyüme, kolay kültüre ve optimize edilebilme özelliklerinden dolayı bu çalışmada ekspresyon sistemi olarak seçilmiştir.

Bu çalışmada fibrinolitik enzim lumbrokinazın *A. oryzae*'de hücre dışı üretilmesi ve saflaştırılması hedeflenmiştir. Üretilen rekombinant proteinin terapötik özelliklerinden faydalanılarak, *A. oryzae*'nin rekombinant protein üretimi çalışmalarındaki kullanımının artırılmasını sağlamak ve araştırmacıların in vivo ve in vitro çalışmalara yönelimini artırmak uzun vadeli hedeflerimizdendir. Aynı zamanda, piyasadaki ürün talebinin karşılanması ve rekombinant protein üretim maliyetinin düşürülmesi de hedeflenmektedir. Böylelikle *Aspergillus* türlerinin, en verimli rekombinant protein üretim sistemi yarışına dahil olabileceğini düşünülmektedir. Sadece rekombinant proteinler için değil, aynı zamanda biyoaktif bileşikler, organik asitler, peptitler ve enzimler için de büyük ölçekli bir üretim platformu olma potansiyeli, *Aspergillus* türlerinin çeşitli pazarlar ve endüstriler için sürdürülebilir çözümler sağlayacağını göstermektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Hemostaz ve Tromboz

Birçok gelişmiş ülkede, kalp hastalığı başta gelen ana ölüm nedenlerinden biridir ve trombotik olaylar, malign neoplazmalara bağlı tüm ölümlerin yaklaşık %50'sinden sorumludur. Her yıl insanları ciddi olarak etkileyen ve ölümüne sebep olan tromboz, kan damarlarında kısmi veya tamamen pıhtı oluşturarak kan akışını etkileyen ciddi bir hastalıktır ve çeşitli travma, travmatik olmayan hasarlar veya damar içi bir hasar sonrası intravasküler hemostazdan kaynaklanır (29, 30). Yaşam boyunca, sürekli olarak vasküler sistem hasarı ve kanın dışarı çıkması riski vardır. Kanın akışını sağlayan ve vasküler sistem hasarından sonra kanamanın durdurabilmesi için gerçekleşen normal pıhtılaşma sürecine hemostaz denmektedir. Ancak, pıhtılaşma sürecinin patolojik olarak sıkıntıya girmesi tromboz olarak adlandırılmaktadır (30, 31). Patolojik durumlar hemostazı engelleyerek arterlerde veya venlerde kontrolsüz pıhtı oluşumuna ve vasküler tıkanıklığa neden olabilir. Arteriyel trombozda atardamarlarda pıhtı oluşurken, venöz trombozda toplardamarlarda pıhtı oluşur. Venöz ve arteriyel trombüs yapısal olarak farklılık gösterir. Arteriyel trombozda trombüs içeriği trombositler iken, venöz trombozda trombüs içeriği fibrinlerdir. Vasküler hemostaz ve trombozun önemli araçları arasında trombositler, endotel hücreler ve dolaşımdaki pıhtılaşma faktörleri bulunur. Trombositten zengin arteriyel trombüsler, parçalanmış aterosklerotik plaklar veya zarar görmüş endoteller ile çevrili veya bitişiktir ve yüksek kesme akışı koşulları sırasında gelişirler (Şekil 1-A). Fibrin ve eritrositler açısından zengin olan venöz trombüsler ise sağlam bir endotel duvarı çevresinde oluşabilmektedir ve düşük kesme akışı koşulları olan yerlerde gelişirler (Şekil 1-B) (30, 31).



Şekil 1: (A) Arteriyel tromboz, (B). Venöz tromboz (30).

Arteriyel tromboz tipik olarak klinikte miyokard enfarktüsü, iskemik inme ve ekstremitte iskemisi, kangren ve amputasyon riskini artıran periferik arter hastalığı şeklinde kendini gösterir (30). Venöz tromboz ise çoğunlukla bacaklardaki ve kollardaki derin damarlarda venöz trombüslerin ortaya çıkması ile kendini gösterir ve bu duruma derin ven trombozu adı verilir. Bu pıhtılar koparak pulmoner arterlere hareket ederek akciğerlere yerleşebilir. Bu duruma da pulmoner emboli denmektedir. Venöz tromboembolizm, hem derin ven trombozunu hem de pulmoner emboliyi tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Son yıllarda, bilim insanları Virchow'un üçlüsünü yöneten hüresel ve moleküler süreçleri belirleme ve karakterize etmede önemli ilerleme kaydetmişlerdir İlk olarak 19. yüzyılda Virchow'un önerdiği "Virchow triadı", hemostatik dengeyi korumak için 3 temel kuraldan oluşmaktadır: 1- Endotel hasarı, 2- Kan akımında yavaşlama (Staz), 3- Hiperkoagülabilité. Staz ve hiperkoagülabilité kombinasyonunun venöz tromboembolizm gelişiminde endotel hasarından çok daha önemli olduğu yaygın olarak bilinmektedir. Venöz tromboembolizm, "Virchow triadı"nın bileşenlerinden biri veya daha fazlasının gerçekleşmesiyle meydana gelmektedir (32, 33). Genetik faktörler, endojen antikoagülan eksiklikleri ve genetik olmayan değişkenler venöz tromboembolizm ve diğer trombotik hastalıklar için birer risk faktörüdür ve trombotik hastalıkların teşhisi ve tedavisinde ciddi derecede önemi vardır.

2.2 Trombotik bozukluklar

Hemostaz veya kanın doğal olarak pıhtılaşma mekanizması, trombotik bozukluklar olarak bilinen hastalıklar tarafından bozulur. Hemostaz düzgün çalıştığında, bir kan damarı hasar gördüğünde kan pıhtıları veya trombüsler oluşur, ancak sağlıklı damarları tıkayan pıhtılarla sonuçlanmaz. Hem pıhtı oluşturmadaki başarısızlık hem de anormalliklerden kaynaklanabilecek aşırı pıhtı üretimi vücuda ciddi şekilde zarar verebilir ve ölümcül olabilir. Kalıtsal bir hastalık veya edinilmiş bir durum trombotik sorunlara neden olabilir. Uzun süre hareketsizlik veya belirli hastalıklar hiper pıhtılaşmaya neden olabilir. Obez olan, sigara içen, hamile olan, doğum kontrol hapı kullanan veya hormon replasman tedavisi alan kişilerde olağandışı pıhtılaşma olasılığı daha yüksektir. Kalıtsal trombofililer olarak bilinen bir dizi genetik hastalık, insanları trombotik olaylara yatkın hale getirir. Arteriyel trombozdan ziyade, venöz tromboembolizm daha yaygın olarak kalıtsal trombotik hastalıklarla bağlantılıdır. Trombozlu hastalarda sıklıkla tanımlanmış bir veya daha fazla genetik risk faktörü ve/veya çevresel risk faktörü vardır (34, 35).

2.2.1 Tromboz Risk Faktörleri

2.2.1.1 Kalıtsal risk faktörleri

Sistasyonin beta sentetaz, metiyonin sentetaz ve metilentetrahidrofolat redüktaz enzimlerinin kalıtsal defektlerine bağlı Hiperhomosisteinemi, Aktif protein C direnci (Faktör V Leiden), Protrombin G20210A mutasyonu, Protein C, Protein S ve Antitrombin-III eksiklikleri ve Antifosfolipid Antikor Sendromu kalıtsal trombofililerin başlıca sebeplerindedir. Heparin kofaktör II eksikliği, plazminojen eksikliği, disfibrinojenemiler, faktör XII eksikliği, faktör VIII koagülan aktivitesinde artış ve doğuştan venöz anomaliler de diğer kalıtsal trombofili nedenleri olarak sıralanabilir. Kalıtsal trombofilide en sık görülen neden otozomal resesif geçişli Faktör V Leiden'dir. Venöz trombozda kalıtsal trombofilik defektlerin prevalansı tablo 1'de gösterilmiştir (Tablo 1) (35). Bu mutasyonun popülasyondaki tahmini prevalansı, Avrupa ve Amerika'da %2-7 arasında değişmektedir ve kalıtsal trombofili ve tromboz vakalarının %20-50'sinin nedeni olduğu düşünülmektedir. Veriler, bu mutasyon için %7,1'lik bir insidans oranı göstermektedir. Bu mutasyon Afrika ve Asya'da nadir görülmektedir. Heterozigotlar arasında, Aktif protein C direnci oldukça otozomal

resesiftir. Homozigot durum ölümcül olmasa da, homozigotlarda heterozigotlara kıyasla önemli ölçüde artmış tromboz riski yoktur. Heterozigotların 5-10 kat daha fazla tromboz riskine sahip olduğu tahmin edilirken, homozigotların 50-100 kat daha fazla riske sahip olduğu düşünülmektedir (36-39).

Tablo 1: Venöz trombozda en çok görülen kalıtsal trombofilik defektler ve prevalansları (35).

Kalıtsal Trombofilik Defektler	Görülme Sıklığı
Aktif protein C direnci (Faktör V Leiden)	% 12-40
Hiperhomosisteinemi	% 10-20
Protrombin G20210A gen mutasyonu	% 6-18
Protein C, Protein S ve Antitrombin-III eksiklikleri	% 5-15
Antifosfolipid Antikor Sendromu	% 5-10

Aktif protein C direnci (Faktör V Leiden)

Trombofilinin en sık görülen kalıtsal nedenidir. Aktif protein C'nin antikoagülan etkisine karşı otozomal resesif geçişli Faktör V Leiden mutasyonu oluşur. Faktör V Leiden mutasyonu F5 geninin 1691.nükleotidinde meydana gelmektedir. Plazmada faktör V, trombin tarafından FVa'ya dönüştürülen inaktif bir kofaktör olarak bulunur. Protrombin, faktör Va'da trombin üretiminde bir kofaktör olarak işlev görür. Protein C, önce faktör Va'yı 506 konumunda, ardından arginin'den 306 ve 679 konumlarında devre dışı bırakır. FV geni ve 506 pozisyonundaki arginin yerine glutamin ikame edilmiştir. Bu, protein C'nin aktif bölünme grupları FVa'ya atfedilir. Söz konusu gen ürünü, FV Leiden olarak bilinir (39, 40).

Hiperhomosisteinemi

Doğuştan metabolik bir hastalık olan otozomal resesif geçişli hiperhomosisteinemi, hem arteriyel hem de venöz olarak indüklenen tek kalıtsal trombofili nedenidir. Hiperhomosisteineminin sebeplerini anlamak için yapılan moleküler çalışmalarda sistatyonin-beta sentaz, metiyonin sentetaz ve metilen tetrahidrofolat redüktaz enzimlerini kodlayan genlerde mutasyonlar keşfedilmiştir (41).

Protrombin G20210A gen mutasyonu

Faktör V Leiden mutasyonundan sonra ikinci sıklıkta görülen mutasyon çeşididir. Bu mutasyon otozomal dominant geçişlidir, Asya ve Amerikada nadir görülmektedir. Karaciğerde meydana gelen protrombin üretimi için K vitamini gereklidir. Dolaşımda, yarılanma ömrü beş güne yakındır. 13 intron ve 14 ekzona sahip olan 21 kb uzunluğundaki insan protrombin geni, 11. kromozomun kısa kolunda yer alır. 20210.nükleotiddeki guaninin adenin ile yer değiştirmesi sonucu protrombin geninin promotör bölgesinde bir mutasyon meydana gelir. Bu mutasyon protrombin G20210A gen mutasyonu olarak bilinir (40, 41).

Protein C eksikliği

Karaciğerin protein C üretmesi için K vitamini gereklidir. 2.kromozomun uzun kolunda protein C üreten bir gen bulunmaktadır. Yalnızca trombin, protein C'yi aktif olmayan durumundan aktif durumuna geçirebilir ve endotelial trombomoduline bağlanması bu sürecin daha sorunsuz ilerlemesine yardımcı olur. FVa ve FVIIIa'nın inaktivasyonu, aktif protein C (aPC) tarafından sağlanır. Başka bir K vitamini tarafından üretilen protein S, aktif protein C'nin inhibe edici etkisini büyük bir farkla artırır. Sağlıklı olan genel popülasyonda 1/200-1/500 sıklıkta, heterozigot protein C eksikliği otozomal baskınlıkla kalıtılır. Hem immünolojik hem de fonksiyonel teknikler, iki farklı heterozigot protein C eksikliğini tanımlamak için kullanılmıştır. Tip 1, protein C eksikliğinin en yaygın türüdür. Hastaların kan protein C içeriği, immünolojik ve fonksiyonel yaklaşımlarla belirlendiği üzere normalin yarısıdır. Bu tür protein C eksikliğinin yarısından fazlası, genetik okuma sırasında missense (yanlış anlamlı) veya nonsense (anlamsız) mutasyondan kaynaklanırken, diğer durumlar, promotör bölgesindeki mutasyonlar, inframe (çerçeve içi) delesyonları, frameshift (çerçeve kayması) delesyonları veya insersiyonları tarafından sağlanır. Tip 2, bu tür eksikliklerde kan protein C düzeyi normal olsa da, protein C fonksiyonel olarak aktif değildir (41).

Antitrombin-III eksikliği

Bulunan ilk kalıtsal trombofili antitrombin-III eksikliğidir. Antitrombin-III bir glikoprotein olduğundan, üretimi için K vitamini gerekli değildir. Trombin ve diğer serin proteazlar [Faktör FIXa ve FXa vb.] antitrombin-III tarafından inhibe edilir. Heparin, antitrombin-III'ün inhibe edici etkisini artırır. Antitrombin-III üreten gen, 6 intron ve 7 ekzon içerir ve 1.kromozomun uzun kolunda bulunur. 464 amino asitten oluşan antitrombin-III karaciğerde öncü protein olarak üretilir ve daha sonra öncü proteine bağlı olan sinyal peptid çıkarılarak 432 amino asitlik bir yapıya dönüştürülür ve kan dolaşımına salınır. Antitrombin-III geni, bilinen 127 farklı mutasyon tipine sahiptir. AT-III eksikliği iki şekilde oluşmaktadır; Tip 1: AT-III sentezinde bir azalma ile ortaya çıkar. Bu durum heterozigotlarda yaklaşık %50 oranında azalır. Tip 2: AT-III plazma konsantrasyonu normaldir ancak etkin değildir. Bu, açık bir protein eksikliğinden kaynaklanır (40, 41).

Antifosfolipid Antikor Sendromu

Antifosfolipid sendromu (AFS), diğer klinik belirtilerin yanı sıra serum antifosfolipid antikorlarının uzun süreli kalıcılığı, tekrarlayan fetal kayıplar, trombositopeni ve venöz/arteriyel tromboz ile kanıtlanan hiper pıhtılaşma ile karakterizedir. Primer ve sekonder antifosfolipid sendromunun her ikisi de aynı klinik tabloyla sonuçlanan iki farklı tipe sahiptir. Primer AFS'de yatan hasta öyküsüne dair herhangi bir belirti veya ek bir komorbid durum yoktur. Ancak ikincil AFS, sistemik lupus eritematozus başta olmak üzere çeşitli otoimmün bozukluklardan dolayı ortaya çıkmaktadır (41, 42).

2.2.1.2 Kalıtsal olmayan (edinsel, akkiz) risk faktörleri

Çevresel birçok nedene bağlı olarak trombofili gelişebilmektedir. Kalıtsal olmayan trombofilik risk faktörleri tablo 2'de detaylı olarak gösterilmiştir (Tablo 2).

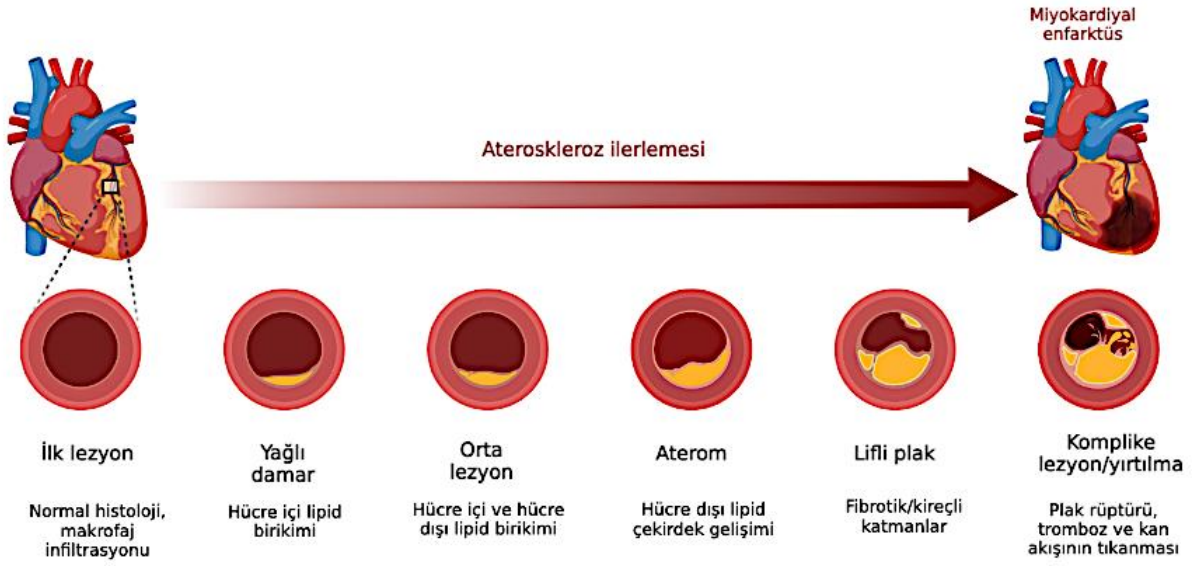
Tablo 2: Kalıtsal olmayan trombofilik risk faktörleri.

Yaş	Sigara kullanımı
Cinsiyet	Hormon replasman tedavisi
Obezite	Cerrahi ameliyatlar
Hareketsizlik	Kanser
Gebelik	Otoimmün hastalıklar
Doğum kontrol ilaçları	Travmatik kazalar

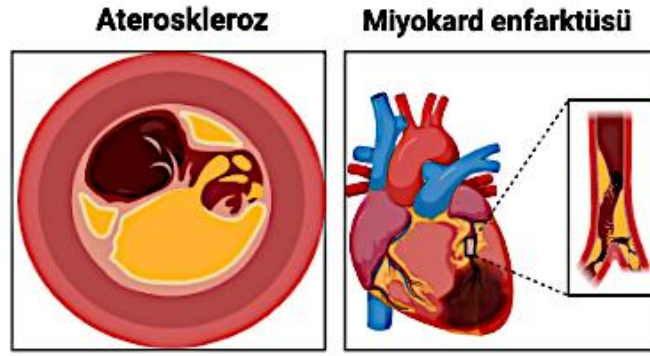
2.3 Trombotik Hastalıklar

2.3.1 Ateroskleroz

Arterlerin tipik şekli düz, içi boş ve esnektir ve bu yapı sayesinde rahat kan akışı sağlar. Atardamarların başlangıcında orada biriken yağlar çizgiler oluşturarak biriken yağ damarın normal yapısını değiştirir ve yabancı maddelerden oluşan plaklara karşı doğal bir savunma sistemi oluşturarak damarın kendi hücrelerinin büyümesini teşvik eden kimyasallar salgılar. Kan dolaşırken, kan hücreleri atardamarın içine yapışır ve yağ birikintileri ile birlikte toplanır. Aterosklerotik plak bu soruna verilen isimdir. Zamanla ortaya çıkan bu plaklar genişler ve yayılır, böylece damar daha az esnek hale gelir. Plakaların dışı sert, içi yumuşaktır. Kanın pıhtılaşmasından sorumlu olan trombositler, sertleşmiş plak yüzeyleri kırıldığında plağa yapışır ve bu da arterin daha fazla daralmasına neden olur. Beslenme için bu kanala bağımlı olan organlarda damar tıkanıklığı ve bunun sonucunda dejenerasyon meydana gelir. Darlığın iç yüzeyinde pıhtı oluştuğundan sonra kan akışı tamamen durmuştur. Aterosklerotik plağın yırtılması arteriyel trombozun başlıca sebebidir. Plak bozulması, plağın lipidden zengin, trombojenik merkezini koruyan ve dolaşımdaki kanla temasını engelleyen fibröz kapağın yırtılması veya çatlaması, tromboz riskini önemli ölçüde artırır. Ateroskleroz zaman geçtikçe damarlarda daha fazla ilerleyerek miyokard enfarktüsüne (kalp krizi) sebep olabilmektedir (Şekil 2 ve 3) (43, 44).



Şekil 2: Ateroskleroz oluşumu ve ilerlemesi (BioRender kullanılarak hazırlanmıştır).



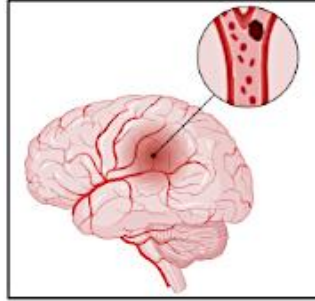
Şekil 3: Ateroskleroz ve miyokard enfarktüsü (BioRender kullanılarak hazırlanmıştır).

2.3.2 İskemik İnme

İskemik inme, vücudun herhangi bir bölgesinde bir kan pıhtısı oluştuğunda ve beyne gidip bir kan arterini durdurduğunda meydana gelen bir inme türüdür (Şekil 4) (45). Damarlarda biriken kan pıhtılaşması veya yağ dokusu nedeniyle de olabilir. Semptomların erken teşhisi ve müdahalesi iskemik inmeyi iyileştirebilir. Tedavisi 2 adımdan oluşmaktadır: İlk adım olarak, beynin düzenli kan akışı yeniden sağlanır. Beyin damarını tıkayan pıhtıyı eritmek için kan sulandırıcı ilaçlar kullanılır veya pıhtı ameliyatla alınır. Beslenmeyen beyin dokusu, kan akışı düzelene kadar bozulmaya devam eder. Eğer hastanın durumu stabilize olursa tedavinin ikinci adımını başlar. Hastanın beyin hasarının derecesi, felç olup olmayacağını belirleyecektir. Felçli bir hasta, kaybettiği yeteneklerinin bir kısmını tamamen veya kısmen geri kazanabilir,

ancak bazılarını sonsuza kadar kaybedebilir. Hastaların iyileşme kapasitesi; hastanın iyileşme şansı, yaşı, inmenin şiddeti, etkilediği alan ve etiyojisi gibi bir dizi değişkene bağlıdır (45).

İskemik inme



Şekil 4: Beyinde iskemik inme oluşumu (BioRender kullanılarak hazırlanmıştır).

2.3.3 Pulmoner Emboli

Vücutta herhangi bir damardaki oluşmuş pıhtının kan dolaşımına karışarak dokulara veya organlara yerleşmesiyle damar tıkanıklığına sebep olma durumuna emboli denir, eğer emboli akciğere ait pulmoner damarlarda oluşuyorsa buna pulmoner emboli adı verilmektedir (Şekil 5) (46). Derin ven trombozu meydana geldiğinde, damarların içinde, genellikle alt ekstremitelerde bir pıhtı oluşur. Pulmoner emboli genellikle bu pıhtıdan bir parçanın ayrılıp pulmoner dolaşıma girmesiyle ortaya çıkar. Nadirde olsa hava, yağ ve tümör hücreleri gibi diğer maddelerin embolizasyonu sonucu da pulmoner emboli gelişebilir. Pulmoner emboli ve derin ven trombozunun birleşmiş spektrumuna venöz tromboembolizm denir (47). Pulmoner emboli çok ciddi acil tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır çünkü pulmoner sistemde veya diğer organlarda ciddi hasarlar oluşturabilmektedir ve ölüme sebep olabilmektedir.

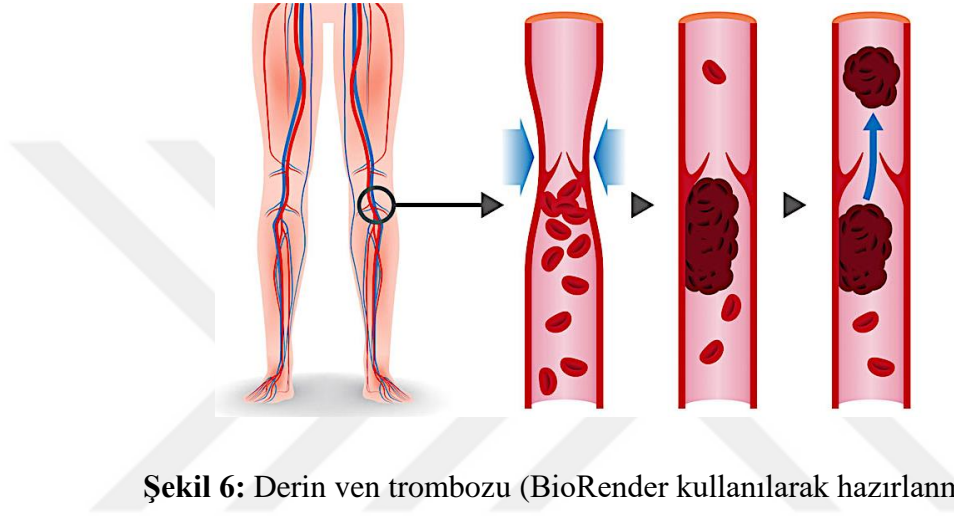
Akciğer embolisi



Şekil 5: Pulmoner emboli (BioRender kullanılarak hazırlanmıştır).

2.3.4 Derin Ven Trombozu

Derin yerleşimli toplardamarlarda bir pıhtının oluşması derin ven trombozu olarak bilinir. Derin ven trombozu uen çok bacaklarda görülmektedir (Şekil 6). Derin ven trombozu pulmoner emboliye yol açmanın yanı sıra bacaklarda kronik venöz yetmezlik veya post-trombotik sendrom olarak bilinen sonuçlara da neden olabilir. Derin ven trombozu kan pıhtılaşması, sürekli bacak şişmesi, yüksek tansiyon, cilt pigmentasyonu ve bacaklardaki venöz staz ülserleri ile karakterizedir (47, 48).



Şekil 6: Derin ven trombozu (BioRender kullanılarak hazırlanmıştır).

2.4 Trombotik hastalıkların tedavisi

Tromboz tedavisindeki temel amaç, pıhtının endotelden ayrılmasına ve emboli sonucu kan dolaşımı yoluyla uzuvlara ve organlara ulaşmasına engel olmaktır. Çünkü bir pıhtının atar damarı tıkanması sonucu ciddi derecede onarılamaz hayati tehlikeler oluşturabilir. Buna post-trombotik sendrom adı verilmektedir (49). Ciddi komplikasyonları önlemek için herhangi bir tromboz semptomu yaşanırca derhal tıbbi yardım almak zorunludur. Zamanında ve etkili bir tedavi planı, durumla ilişkili ağrı ve rahatsızlığın hafifletilmesine de yardımcı olabilir. Bu nedenle, trombozun doğru teşhisi ve tedavisi için bir sağlık uzmanına danışılmalıdır.

Trombozun tedavisinde kullanılan yöntemler kompresyon tedavi, ilaç tedavi (antikoagülanlar, antitrombotik ve fibrinolitik ajanlar) ve cerrahi yöntemler olmak üzere 3'e ayrılır. Pıhtının gerçekleştiği alana göre uygulanacak tedavi yöntemi de değişmektedir.

Kompresyon ile tedavide sınıf II tromboz çorapları kullanılmaktadır. Bu tedavi, damar içinde kan akışının daha şiddetli bir şekilde daralmasına ve etkilenen uzuvlardaki

şışlığın şiddetlenmesine yol açabilecek ek tıkanıklıkların oluşmasına karşı önleyici bir önlem olarak hizmet eder. Bu adımı atarak, durumun ilerlemesi durdurulur ve daha fazla komplikasyon önlenir (49). Ancak bu tedavi şekli kesin çözüm değildir.

İlaç tedavisinin öncelikli nihai hedefi, pıhtıların ilerlemesini engelleyerek kan dolaşımı yolu ile organlara girişlerini engellemektir. Dolayısıyla, kan pıhtısı küçülmekte veya tamamen çözülebilmektedir. Ayrıca pıhtılaşmayı önleyen heparin gibi antikoagülan ilaçların verilmesi de tromboz oluşumunu önlemede önemli rol oynamaktadır (49). Trombotik hastalıkların tedavisi için geleneksel olarak ürokinaz (uPA), streptokinaz ve doku plazminojen aktivatörü (t-PA) gibi ticari trombolitik ajanları kullanılmaktadır. Bir bakteri ürünü olan streptokinaz, hızlı bir şekilde antikor yanıtı oluşturur. Ayrıca, streptokinazın tekrarlayan uygulamalarında anafilaksiye kadar sebep olabilen alerjik reaksiyonlar meydana gelebilir. Streptokinaz içeren anistreplaz, bakteriyel streptokinaz ve insan plazminojeni karışımından oluşmaktadır. Streptokinaza alerjik olan kişilerde ürokinaz kullanılmaktadır. İlk olarak insan idrarından izole edilen ürokinaz, esasen böbreklerin sentezlediği bir enzimdir ve insan embriyonik böbrek hücre kültürlerinden elde edilmektedir. t-PA ise endotel hücrelerinin sentezlediği ve insan melanoma hücre kültürlerinden elde edilen bir proteazdır. uPA, t-PA ve bunlardan geliştirilmiş analoglar kısa etkiye sahipken; streptokinaz ve anistreplaz ise uzun etkiye sahip trombolitik ajanlardır. Ayrıca, bu trombolitik ajanlar pahalıdır ve damar içi enjeksiyondan sonra yarılanma ömürleri kısalmaktadır (50, 51). Ek olarak, bu trombolitik ajanlar fibrine spesifik değildir, böylece alerji, kontrol edilemeyen fibrinolitik hızlanması, şiddetli kanama, beyin kanamasına bağlı olarak felç, düşük kan basıncı, santral ve derin ven trombozu, akut miyokard infarktüsü ve multipl pulmoner emboli gibi tehlikeli durumlara sebep olabilmektedirler (52-54). Dolayısıyla bu dezavantajlardan dolayı, uzun yıllardır artan kalp ve damar hastalıkları ve koronavirüs hastalığı (COVID-19) sonrası meydana gelen trombotik bozuklukların tedavisi için bilim insanları güçlü, etkili ve güvenilir anti-trombotik ajanların arayışı içerisinde. Ayrıca, bu anti-trombotik ajanların endüstriyel olarak üretilmesi tedavideki maliyetlerin azaltılmasına da ciddi derecede yarar sağlayacaktır.

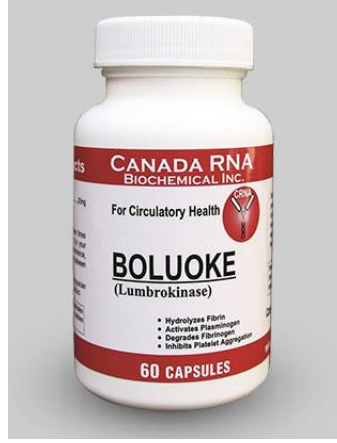
Kan pıhtılarını çözmek için hastaya anti-trombotik ilaç verilmesi, kanama riski yüksek olan hastalarda her zaman tercih edilen bir tedavi yöntemi değildir. Bu durumda vücuttan kan pıhtısını çıkarmak için tercih edilen iki cerrahi yöntem vardır: kateter yöntemi ve açık ameliyat yöntemi. Kateter yöntemi, etkilenen kan damarına ince bir tüp yerleştirmeyi ve pıhtıyı parçalamak ve çıkarmak için özel aletler kullanmayı içerir

(49). Bu minimal invaziv teknik, daha az risk taşınması ve daha hızlı iyileşme süresi sağlanması nedeniyle sıklıkla tercih edilir. Buna karşılık açık ameliyat, daha büyük bir kesi yapmayı ve etkilenen bölgeden pıhtıyı fiziksel olarak çıkarmayı içerir. Bu yaklaşım pıhtının çıkarılmasında etkili olmakla birlikte daha yüksek komplikasyon riski taşır ve daha uzun bir iyileşme süreci gerektirir. Sonuç olarak, seçilen yöntem hastanın bireysel tıbbi geçmişine, pıhtının ciddiyetine ve tıbbi ekibin uzmanlığına bağlı olacaktır.

2.5 Lumbrokinaz

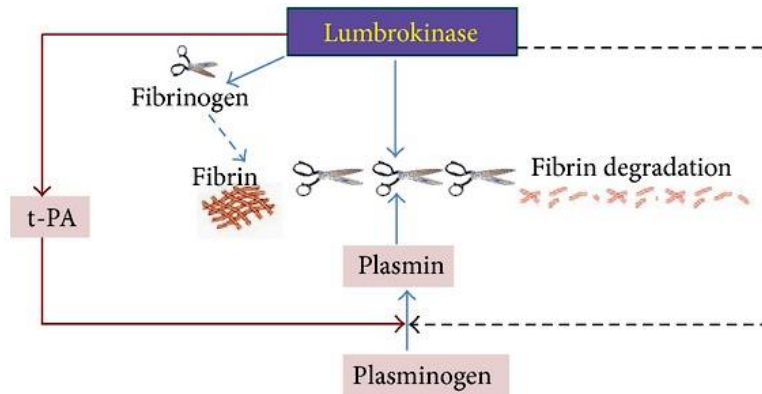
Lumbrokinazlar, 25 ila 32 kDa moleküler ağırlığı arasında değişen boyutlara sahip bir proteaz türüdür. Bu enzimler vücut boşluğu, sindirim ve boşaltım sistemleri dahil olmak üzere solucanların çeşitli bölgelerinde bulunmaktadır (6). Araştırmacılar, Çin tıbbında geleneksel olarak uzun yıllardır ateş düşürücü ve idrar söktürücü olarak kullanılan *Lumbricus* cinsi solucanlardan; fibrinolitik bir enzim olan lumbrokinazı izole etmişlerdir ve lumbrokinazın trombolitik bir ilaç olma potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir (55). Boluoke® gibi ticari lumbrokinaz ürünleri, hiper pıhtılaşmayı tedavi etmek için Asya ve Kuzey Amerika'da kullanılmıştır (Şekil 7).

Mikrobiyal fibrinolitik enzimler, fibrini yüksek oranda doğrudan parçalayarak trombüsü çözme gibi benzersiz bir özelliğe sahiptir. Bu özellik, onları trombozu ve diğer ilgili hastalıkları tedavi edecek ilaçların geliştirilmesi için umut verici bir aday yapar. Bu enzimlerin ilaç olarak kullanılması, kan damarlarında oluşan pıhtıları etkili bir şekilde parçalayarak pulmoner emboli, inme ve kalp krizi gibi ciddi komplikasyon riskini azaltabilir. Ek olarak, mikrobiyal fibrinolitik enzimler, derin ven trombozu, periferik arter hastalığı ve trombotik bozukluklar gibi diğer durumların tedavisinde potansiyel göstermiştir. Bu nedenle, bu enzimlerin kullanımı, çeşitli trombotik hastalıklar için etkili tedavilerin geliştirilmesi için yeni yollar açabilir ve hasta sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirebilir (56).



Şekil 7: Asya ve Kuzey Amerika’da hiper pıhtılaşmayı tedavi etmek amacıyla kullanılan ticari lumbrokinaz ürünü.

Gastrointestinal kanalda bozulmadan emilebilen, organik çözeltilere karşı güçlü tolerans gösterebilen ve geniş bir pH aralığına sahip olan lumbrokinazlar, in vitro çözelti içinde stabil halde uzun süre kalabilirler. Ayrıca geleneksel trombolitik ilaçlardan farklı olarak lumbrokinazlar, yalnızca fibrin varlığında trombolitik aktivite gösterdiklerinden dolayı şiddetli kanamaya sebep olmazlar (6, 52, 57). Lumbrokinaz, fibrini iki yol ile parçalayabilir. İlk olarak, doğrudan fibrinin kendisini çözebilir. Alternatif olarak, plazminojeni fibrin pıhtılarını parçalamaktan sorumlu bir enzim olan plazmine dönüştürerek vücudun doğal t-PA üretimini uyarabilir (52) (Şekil 8). Dolayısıyla lumbrokinazların bu avantajlarından dolayı, anti-trombolitik ilaçlara dönüşmeleri kolaydır. Ancak, lumbrokinazların moleküler kütle aralığı (25-33 kDa) nispeten dardır ve ayrıca, solucanların yaşam döngüsü uzun olduğundan dolayı, geleneksel yöntemler ile lumbrokinazların izolasyonu ve saflaştırılması zor, zaman alıcı ve yoğun emek gerektirmektedir. Ne yazık ki, izolasyondan sonra elde edilen lumbrokinaz ekstraktı kolaylıkla kontamine olabilmektedir (52, 58, 59).



Şekil 8: Lumbrokinazın iki farklı şekilde pıhtıları parçalama mekanizması (52).

Uzun yıllardır dolaşım sağlığına katkı olarak Japonya, Kore, Kanada ve ABD’de kullanılan lumbrokinaz kapsülleri ve Çin’de anti-trombolitik ajan olarak klinikte kullanılan solucan tozlarından elde edilen lumbrokinaz ürünlerinde birden fazla bileşen bulunmaktadır. Bu çoklu bileşenler, lumbrokinazın farmasötik bir ürün olarak onaylanmasında ve kullanılmasında engel teşkil etmektedir. Dolayısıyla, solucanlardan lumbrokinaz proteinini izole etmek ve saflaştırmak çok zor olduğundan ve ayrıca fibrinolitik özelliğinin sisteminin ve mekanizmasının aydınlatılabilmesi için lumbrokinazın rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak yüksek verimde ve saflıkta üretilmesi gerekmektedir (52, 57). Bugüne kadar lumbrokinaz enzimleri rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak bakteri *E. coli* (9-14), maya *P. pastoris* (15-20), keçi sütü (21) ve ayçiçeği ve tütün bitkisi gibi bitki ekspresyon sistemlerinde (22, 23) başarılı bir şekilde üretilmiştir. Literatürdeki varolan çalışmalar incelendiğinde, lumbrokinazın daha önce *Aspergillus* cinsi küf mantarlarında üretilmediği tespit edilmiştir.

2.6 *Aspergillus* mantarları

Aspergillus, Trichocomaceae ailesinin bir üyesidir ve diğer mantar türlerinin aksine filamentli-ipliksi yapılı mantarlardır. *Aspergillus* mantarları yaklaşık 200 mantar türüne sahip bir cinstir. En yaygın türleri; *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger*’dir (23). *Aspergillus* türleri gelişen teknoloji ile birlikte yüksek düzeyde salgılanan enzimler, birincil ve ikincil metabolitler üretirler, bundan dolayı ticari öneme sahiptirler. Ayrıca *Aspergillus*’lar ökaryotik canlılar olduklarından dolayı post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmektedirler, böylece karmaşık proteinleri üretebilirler. Ek olarak, hücre dışı ortamda fazla miktarda protein salgılama yeteneği, hızlı büyüme, kolay kültüre ve optimize edilebilme özelliği *Aspergillus* türlerinin en önemli avantajlarındanıdır. Dahası, *Aspergillus* ekspresyon sistemleri, uzun yıllardır güvenli olarak gıda üretiminde kullanıldığından dolayı FDA ve WHO tarafından onaylanarak GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde yerini almıştır. Dolayısıyla, *Aspergillus* tarafından sentezlenen ürünler, diğer onaylanmamış üretim konakları tarafından sentezlenen ürünlerden daha kolay kabul görürler. Bu avantajları sayesinde az maliyetle, kısa sürede, güvenli ve yüksek verimde rekombinant protein ve enzim üretimi sağlanabilmektedir. *Aspergillus* türlerinin ürettikleri ticari enzimler arasında gıda, deterjan, tekstil, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde amilazlar, kimozin, glikoz

oksidazlar, katalazlar, selülozlar, pektinazlar, lipazlar, proteazlar, fitazlar ve ksilanazlar bulunur. Son zamanlarda, *Aspergillus* türleri tarafından insan laktoferrin, buzağı kimozeni, bitki türevli tatlandırıcılar olan taumatin ve neoculin gibi çeşitli heterolog proteinler endüstriyel olarak üretilmiştir. Bu avantajlarına rağmen, *Aspergillus* türleri rekombinant proteinlerin endüstriyel üretiminde henüz tam olarak kullanılmamıştır. Yakın zamanda *Aspergillus* sistemleri, en verimli rekombinant protein üretim sistemi yarışına dahil olacaktır. Sadece rekombinant proteinler için değil, aynı zamanda biyoaktif bileşikler, organik asitler, peptitler ve enzimler için de büyük ölçekli bir üretim platformu olma potansiyeli, *Aspergillus* türlerinin çeşitli pazarlar ve endüstriler için sürdürülebilir çözümler sağlayacağını göstermektedir (20-23, 60-63).

2.6.1 *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae, küresel olarak çeşitli ülkelerde geniş çapta tanınan ve çok önemli bir biyoteknolojik araç olarak kullanılan çok hücreli bir mantar türüdür. *A. oryzae* 44°C'nin üzerinde gelişemez ve gelişme aralığı ortalama 32–36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) arasında değişmektedir. Büyüme pH'ı ortalama 5 ila 6 arasındadır. Raporlara göre *A. oryzae*, su seviyesi yaklaşık %16 olan mısır ununda gelişebilir. Nadiren 0,8'in altına büyür, ancak tipik olarak su aktivitesi (aw) 0,8'in üzerinde olan substrat üzerinde büyüebilir. *A. oryzae*'nin tüm genomu total olarak 37.6 Mb boyutundadır ve 12.074 genden oluşan sekiz tane kromozom içerir. *A. oryzae* RIB40 vahşi tip suşunun genom dizilemesi Japon bilim insanları tarafından Whole Genome Shotgun Sequencing (Av Tüfeği Dizilimi) yöntemiyle 2005 yılında tamamlanmıştır. Sekanslanması tamamlanan bu suş, soya sosu fermentasyonu için en önemli niteliklerden biri olan güçlü proteaz üretimi kapasitesine sahiptir. İlk olarak, H. Ahlburg 1876'da koji'den *A. oryzae*'yi izole etmiştir. Daha sonra F. Cohn, eşeyli üreme yeteneğine sahip olmadığını keşfettikten sonra orijinal adı olan *Eurotium oryzae*'yi *A. oryzae* olarak değiştirmiştir (64, 65).

Asya'da gıda üretim endüstrisinde büyük bir öneme sahip olan *A. oryzae*, soya fasulyesi ezmesi, soya sosu, pirinç maltı, fermente siyah soya fasulyesi, soya peyniri çeşnişi ve sirke gibi fermente gıdalar üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca *A. oryzae*, yüzyılı aşkın bir süredir Avrupa'da gıda işleme amacı ile mayalama ve fırınlama işlemlerinde kullanılan endüstriyel enzimlerin üretiminde de uygulama

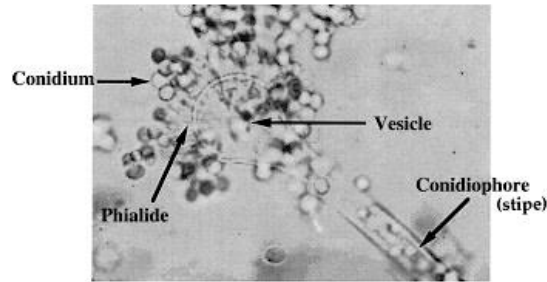
alanı bulmuştur. Amilazlar ve proteazlar gibi olağanüstü enzim üretme yeteneği sayesinde nişasta ve protein formlarını şekerlere ve amino asitlere parçalama kapasitesine sahiptir. Ek olarak, *A. oryzae* GRAS statüsünde yer almaktadır ve bu da onu veterinerlik endüstrisinde de bir probiyotik olarak uygun bir seçenek haline getirmiştir. Biyolojik özellikleri, onu bakteriyosinler üretebilen veya *E. coli* ve *Salmonella* gibi zararlı bakterilerin büyümesini engelleyebilen laktobasiller gibi faydalı bakteriler için çekici bir substrat haline getirmiştir. Dolayısıyla, *A. oryzae*'nin hayvansal üretim için bir probiyotik olarak önemli bir potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, GRAS statüsünde olduğu için veterinerlik sektörü *A. oryzae*'yi probiyotik olarak kullanabilir. Biyolojik nitelikleri, onu bakteriyosin oluşturan veya *E. coli* ve *Salmonella* gibi zararlı bakterilerin büyümesini baskılayan laktik asit bakterileri gibi avantajlı bakteriler için arzu edilen bir substrat haline getirir. Bu nedenle *A. oryzae*'nin probiyotik potansiyelinin hayvansal üretim için çok yüksek olduğu düşünülmektedir (66-70). *A. oryzae* tarafından üretilen güçlü enzimlerin ayrıca sindirim süreci ve amilolitik ve proteolitik lipidlerin kuru maddeden aktif olarak parçalanması üzerinde bir etkisi vardır, bu da besin emilimini artırmaya yardımcı olur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada *A. oryzae* ve bir hurma tohumu karışımı, *Nile tilapia*'sının daha hızlı ve daha özgürce gelişmesini sağlamak için kullanılmıştır (71). Yapılan diğer bir çalışmada da, etlik piliçlere verilen diyetin %0,1'lik gibi çok düşük bir oranda *A. oryzae*'nin dahil edilmesi, etlik civcivlerde kan serum kolesterol seviyelerini etkili bir şekilde azaltabildiği ve gerekli enzimi serbest bırakarak sentezini engelleyebildiği gözlemlenmiştir (72).

2.6.2 *Aspergillus oryzae*'nin morfolojisi ve yaşam döngüsü

Aspergillus oryzae, tıpkı diğer birçok mantar gibi, hif veya misel olarak bilinen haploid çok çekirdekli filamentler olarak büyüyen bir mantar türüdür ve bu suş sadece eşeysiz yaşam döngüsüne sahiptir. *A. oryzae*'nin eşeysiz yaşam döngüsünde konidiasyon sık görülen bir durumdur. Bu süreçte kullanılan çok hücreli organlar olan konidioforlar, 10.000'den fazla konidyum üretebilmektedir. *A. oryzae*, maddeleri parçalamak için ilk fermantasyon sürecinde sıklıkla başlatıcı olarak konidyumları kullandığı için gıda endüstrisinde çok önemlidir (73). *A. oryzae*'nin hifleri apikal uçlarda uzanır ve dallanma yoluyla çoğalarak, birkaç günlük inkübasyondan sonra katılaşmış agar besiyerinin yüzeyini kaplayan bir koloniyle sonuçlanır. Sıvı ortamda, hifler hava

atmosferine maruz kalmadıkça hif büyümesi devam eder. Bununla birlikte, hifler katılaştırılmış agar ortamına aktarıldığında, konidia adı verilen aseksüel üreme sporlarını taşıyan konidiofor yapıları üretilir (Şekil 8) (74). Koloni başlangıçta vejetatif hif büyümesi nedeniyle beyaz görünür, ancak büyük miktarda konidyum oluştuğunda yavaş yavaş sarımsı-yeşile döner. *A. oryzae*'nin çoğu suşunda taze kültürün veya konidyumun rengi tipik olarak sarımsı yeşilken, eski kültürün rengi kahverengidir, bazen kahverengi tonları olan yeşildir. Konidial kafalar genellikle 100–200 mm çapında, yayılacak şekilde küreseldir. *A. niger* ve *Penicillium chrysogenum* gibi endüstriyel açıdan önemli diğer iplikli mantarların aksine, *A. oryzae*'nin eşeyli yaşam döngüsü yoktur. *A. oryzae*'nin konidyumları haploid olmasına rağmen, *A. nidulans* veya *A. niger*'in tek çekirdekli konidyumlarının aksine, çoğunlukla iki ila dört veya daha fazla çekirdekli çok çekirdekli dirler (74).

A. oryzae yaşam döngüsü boyunca, konidyumların çimlenmesinden konidiofor taşıyan olgun konidyum zincirlerinin büyümesine kadar bir dizi gelişim aşamasından geçer. Özellikle geç misel gelişim aşaması endüstriyel uygulamalar için çok önemlidir. Bu aşamada, Taka-amilaz A (α -amilaz), glukoamilaz, β -galaktosidaz, proteazlar, lipazlar ve selülozlar dahil olmak üzere birçok hidrolitik enzimin üretiminin bir sonucu olarak, endüstriyel sektör artık fermente gıda maddeleri için büyük miktarlarda endüstriyel enzime erişebilmektedir. Çimlenmenin endüstrideki önemine rağmen, onlar hakkında çok az şey anlaşılmaktadır. Hücre dışı veya hücre içi hidrolitik enzimler, tohum tüplerinin substratı delme yeteneğine yardımcı oldukları için, konidial çimlenme aşamasının beslenmesi için gereklidir (80).



Şekil 9: *Aspergillus oryzae*'nin konidiofor yapıları (74).

A. oryzae, gıda endüstrisinde ham maddeleri hidrolize etmek için çeşitli enzimlerin kaynağı olarak hayati bir rol oynar. Saké fermantasyonunda, α -amilaz ve glukoamilaz, *A. oryzae* tarafından üretilen ve nişastanın çözünmesine ve sakarifikasyonuna yardımcı olan en önemli hidrolitik enzimlerdir. Kapsamlı bir şekilde araştırılan

TAKA-amilaz A, X-ışını kristalografisi ile karakterize edilen, 478 amino asit tortusundan oluşan tek bir polipeptit zincirinden oluşan glikoprotein enzimidir. α -amilaz kodlayan genler, *A. oryzae*'nin soyağacıyla alakasız suşlarından klonlanmış ve dizilenmiştir. İlginç bir şekilde, tüm suşlar α -amilaz kodlayan genlerin (amyA, amyB ve amyC) iki veya üç kopyasına sahiptir; bu genler, kodlama ve 50-yan bölgelerde neredeyse aynı nükleotit sekanslarına ve yalnızca 30-yan bölgede önemli farklılıklara sahiptir. Bu amy genlerinin tümü küf mantarında işlevseldir. *A. oryzae*'de çok sayıda işlevsel amy geninin olduğu gözlemi, bu küfün neden yüksek bir α -amilaz üreticisi olduğunu açıklayabilir. *A. oryzae*, *A. sojae* ve aflatoksijenik mantarlar, *A. flavus* ve *A. parasiticus* ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte, *A. oryzae*, bir α -amilaz hiper üreticisi olarak bilinir ve enzimin endüstriyel üretimi için kullanılır (74,75).

2.6.3 *Aspergillus oryzae*'nin transformasyonu

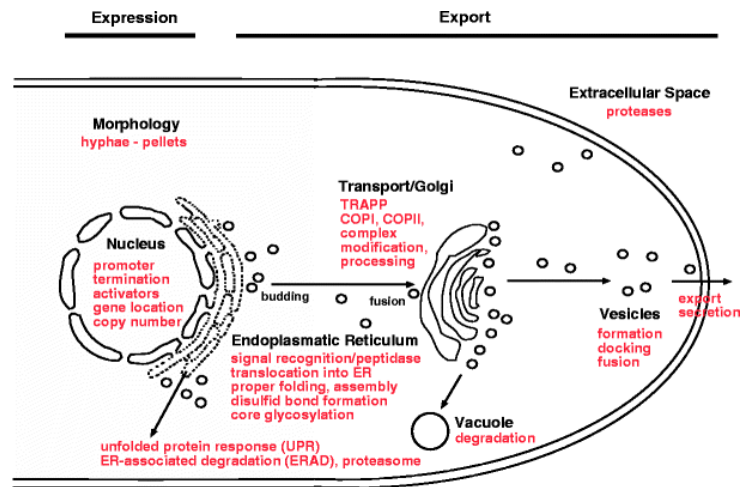
Fungal genetik transformasyon, tipik olarak seçim markörleri olarak ilaç direnci markörlerini kullanır. Bu belirteçler baskındır ve konak suşunun oksotrofik olmasını gerektirmez. Bununla birlikte, *A. oryzae*'nin yüksek yerli ilaç direncine sahip olması, yabancı hetero gen markörlerinin transformasyon markörleri olarak kullanılmasını zorlaştırmaktadır. *A. oryzae* genetik transformasyonu için en sık kullanılan ilaç direnç belirteçleri, hph ve hygr gibi higromisin B direnç genleridir. Bleomisin (Bm) direnç belirteci, piritiamin (PT) ve fleomisin direnç genleri de seçim belirteçleri olarak kullanılmıştır. Ancak gıda mikroorganizmalarında ilaç direnç belirteçlerinin kullanımı, bu genlerin çevreye ve diğer mikroorganizmalara aktarılmasındaki potansiyel riskler nedeniyle FDA tarafından yasaklanmıştır. Bununla birlikte, ilaç direnci belirteçleri de dahil olmak üzere transformasyon sistemlerinin çoğu, pahalı antibiyotiklere ihtiyaç duyar. Bir alternatif olarak, *A. oryzae* genetik transformasyonu için oksotrofik markörler kullanılmıştır. PyrG geni, en yaygın kullanılan ilaç direnci belirtecidir ve mutantları, büyüme için ek üridin veya urasil takviyesi gerektirir. Nitrat özümlemesi için niaD, adenin için adeA ve arginin biyosentezi için argB gibi diğer beslenme belirteçleri de *A. oryzae*'nin transformasyon sistemleri için kullanılmıştır (76-82).

A. oryzae için protoplast aracılı transformasyon (PMT), *Agrobacterium* aracılı transformasyon (AMT) ve elektroporasyon (EP) gibi çeşitli transformasyon yöntemleri oluşturulmuştur. PMT en sık kullanılan yöntemdir ve anahtar adım, hücre

duvarının çıkarılmasını gerektiren protoplast hazırlığıdır. AMT, *Agrobacterium tumefaciens*'ten Ti plazmitinin T-DNA bölgesinin enfekte bitkinin genomuna transferini içeren, *A. oryzae*'de gen hedefleme için kullanılan başka bir yöntemdir. T-DNA ve seçim markörü, transformantların genomuna rastgele entegre edilir. Elektroporasyon tekniğinde ise protoplastları ve DNA'yı bir çözeltiye sokmak için yüksek voltajlı bir elektrik darbesi kullanılır. Bununla birlikte hızlı ve pratik bir teknik olmasına rağmen, elektroporasyon yöntemi oldukça karmaşıktır ve farklı mantarlar ile kullanımı için optimizasyonunun sağlanması gerekmektedir. Ayrıca, PMT ve AMT prosedürleriyle karşılaştırıldığında, EP'nin DNA transfer etkinliği zayıftır (83-86).

2.6.4 *Aspergillus oryzae*'de protein sekresyonu

Aspergillus oryzae, protein salgılayan bir mantar türüdür. Proteinler yeni sentezlendiklerinde, glikosilasyon gibi modifikasyonlara uğradıkları ve katlandıkları endoplazmik retikulum (ER) girerler. Bir sonraki adım, bu değiştirilmiş proteinlerin, SNARE proteinleri tarafından kolaylaştırılan veziküller yoluyla Golgi aparatına taşınmasını içerir. Bu, proteinlerin SNARE güdümlü veziküler kaçakçılığı yoluyla tekrar salgılanmadan önce glikosilasyon yoluyla daha fazla değiştirildiği yerdir. Hifal ucu, proteinlerin ortama salındıkları son varış noktasıdır. Bununla birlikte, proteinlerden herhangi biri yanlış katlanmışsa veya yetersiz glikosile edilmişse, ER'de sıralanır ve parçalanma için hedeflenir. Bu, proteazom veya vakuoller aracılığıyla yapılır. Bu süreçten geçerek, yalnızca uygun şekilde katlanmış ve değiştirilmiş proteinler salgılanır ve *A. oryzae*'nin verimli çalışması sağlanır (62).



Şekil 10: *Aspergillus oryzae*'de protein sekresyonu (62).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

- BioShop Bacteriological Grade Agar (Cat. No. AGR001.500, Canada Inc., Burlington)
- WISENT Multicell Bacteriological Peptone Microbiological Grade (Cat. No. 800-157-CG, Canada)
- Sigma Aldrich D2006 Dextrin from corn Type I, powder (Cas. No. 9004-53-9, China)
- ISOLAB chemicals Magnesium Sulfate Heptahydrate (Cas. No. 10034-99-8 for Analysis ACS, Reag. Ph. Eur, Germany)
- Sigma Aldrich Potassium dihydrogen phosphate for analysis (Cas. No. 7778-77-0, Germany)
- WISENT Multicell Yeast Extract Low Sodium (Cat. No. 800-150-LG, Canada)
- TEKKİM TK.010020.01002 Ammonium Sulfate Extra Pure (Cas. No. 7792-20-02, Turkey)
- TEKKİM TK.200790.01002 Iron (II) Sulfate Heptahydrate Extra Pure (Cas. No. 7782-63-0, Turkey)
- BIOMATİK A3916 Sodium Nitrate, High Purity Grade (Cas. No. 7631-99-4, USA)
- Sigma Aldrich 60356 Potassium Phosphate Dibasic puriss. p.a., ACS reagent, anhydrous, $\geq 99.0\%$ (T) (Cas. No. 7758-11-4, Germany)
- Caisson Labs Sucrose ACS Grade (Cas. No. 57-50-1, USA)
- ISOLAB chemicals Sodium Chloride for Analysis ACS, ISO, Reag. Ph. Eur (Cas. No. 7647-14-5, Germany)
- WISENT Multicell Potassium Chloride (Cas. No. 7447-40-7, Canada)
- ISOLAB chemicals Polysorbate 80 for synthesis (Cas. No. 9005-65-6, Germany)
- BIOFROXX TWEEN® 20 for biochemistry (Cas. No. 9005-64-5, Germany)
- BioShop Uracil (Cas. No. 66-22-8, Canada Inc., Burlington)

- PanReac AppliChem ITW Reagents A0666 Uridine BioChemica (Cas. No. 58-96-8, Italy)
- Scharlab ET00032500, Ethanol 96% v/v, Pharmapur®, Ph Eur, BP (Cas. No. 64-17-5, Spain)
- TEKKİM TK.120320.05001 Methanol Extra Pure (Cas. No. 67-56-1, Turkey)
- WISENT Multicell LB Miller's broth (Cat. No. 800-061-LG, Canada)
- GENAXXON Bioscience M3044.0100 Agarose LE for DNA electrophoresis (Cas. No. 9012-36-6, Germany)
- Sigma Aldrich 12022 Calcium Chloride Dihydrate puriss., meets analytical specification of Ph. Eur., USP, FCC, E509, 99-103%, ≤0.0001% Al (Cas. No. 10035-04-8, Germany)
- Thermo Fisher Scientific 88221 HisPur™ Ni-NTA Resin (Cas. No. 64-17-5, USA)
- TAKARA Biotechnology His60 Ni Superflow Resin (Cat. No. 635660, Japan)
- PanReac AppliChem ITW Reagents A0830 Nonfat dried milk powder (EC No. 271-045-3, Spain)
- WISENT Multicell Glycine Ultra Pure for in vitro use (Cat. No. 800-045-LG, Canada)
- BIOFROXX 1460KG001 Imidazole for biochemistry (Cas. No. 288-32-4, Germany)
- TEKKİM TK.080231.02501 Analytic grade Hydrochloric Acid %37 (Cas. No. 7647-01-0, Turkey)
- MERCK EMSURE® 1.00063.2500 Acetic acid (glacial) 100% anhydrous for analysis (Cas. No. 64-19-7, Germany)
- Sigma Aldrich T1503 Trizma® base Primary Standard and Buffer, ≥99.9% (titration), crystalline (Cas. No. 77-86-1, USA)
- MERCK EMSURE® Calcium sulfate dihydrate precipitated for analysis (Cas. No. 10101-41-4, Germany)
- BioShop GLY001. GLYCEROL, Biotechnology Grade, min 99.7% (Cas. No. 56-81-5, Canada Inc., Burlington)
- WISENT Multicell Tryptone, Ultra Pure Grade (Cat. No. 800-158-LG, Canada)
- BIOFROXX 1177GR100 SDS ultrapure for molecular biology (Cas. No. 151-21-3, Germany)
- BioBasic Coomassie Brilliant Blue R-250, Ultra Pure (Cas. No. 6104-59-2, Canada)

- SIGMA Life Science S1876 D-Sorbitol $\geq 98\%$ (Cas. No. 50-70-4, Germany)
- Sigma Aldrich 71496 Sodium phosphate monobasic purum p.a., anhydrous, $\geq 99.0\%$ (T) (Cas. No. 7558-80-7, Germany)
- PanReac AppliChem ITW Reagents A2204 Polyethylene Glycol 8000 BioChemica (Cas. No. 25322-68-3, Italy)
- BIOFROXX 8027ML100 TEMED for biochemistry (Cas. No.110-18-9, Germany)
- Cosmo Bio LTD Yatalase for research use only (Cat. No. OZK-OZ-10EX, USA)
- BIOFROXX 1146GR025 Ampicillin sodium salt for biochemistry (Cas. No. 69-52-3, Germany)
- BioBasic Acrylamide/ Bis-Acrylamide Solution (29:1), 40% (W/V), Ultra Pure (Cat. No. A0007, Canada)
- Zymo Research 5-FOA (5-Fluoroorotic Acid Monohydrate) (Cat. No. F9001-1, USA)
- iNtRON Biotechnology GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder (Cat. No. 24052, Korea)
- Applied Biological Materials Inc. (abm) Opti-Protein Marker (Cat. No. G252, Canada)

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından sağlanan;

- OHAUS Pioneer hassas terazi ile besiyeri ve solüsyon hazırlanması için kimyasallar tartıldı.
- BIO-RAD Digital Hotplate Stirrer cihazı ile besiyeri ve solüsyonların homojen olarak karıştırılarak hazırlanması sağlandı.
- WITEG Digital Fuzzy Control System Water Bath cihazı ile solüsyonlar ve besiyeri için uygun sıcaklık koşulları sağlandı.
- HE99X-15-1.5 MAX HORIZ SUB W/CAST KIT/COMB cihazı ve GE Amersham Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS 301 cihazı ile agaroz jel elektroforezi yapıldı.
- BIO-RAD mini santrifüj cihazı, numunelere spin atmak için kullanıldı.

- Thermo Scientific MICROCL21 Centrifuge cihazı, midiprep DNA izolasyonu ve jel ekstraksiyonu için santrifüj işlemlerinde kullanıldı.
- Thermo Scientific NanoDrop One cihazı ile DNA ve protein konsantrasyonlarının ölçümü yapıldı.
- INFORS HT Ecotron incubator shaker cihazı ve Thermo Scientific HERATHERM cihazı ile *Escherichia coli* ve *Aspergillus oryzae* mikroorganizmaları büyütülmek için kullanıldı.
- Thermo Scientific Maxisafe 2020 1.5 biyogüvenlik kabini mikrobiyal ekim ve sterilizasyon işlemleri için kullanıldı.
- Leica ışık mikroskopu ile protoplast olan *Aspergillus* hücreler incelendi.
- BECKMAN COULTER Avanti JXN-26 Centrifuge cihazı ile protein çöktürme yapıldı ve Amicon ile protein konsantre edildi.
- Sartorius Stedim Biotech Sartoflow Smart cihazı ile protein örneklerinin ultrafiltrasyonu sağlandı.
- Thermo Scientific Digital Dry Bath cihazı ile SDS-PAGE’de yürütülecek olan protein örneklerini ısıtmak için kullanıldı.
- GE Healthcare miniVE Vertical Electrophoresis System cihazı ve GE Amersham Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS 301 cihazı ile protein örneklerine SDS-PAGE yöntemi uygulandı.
- Benchmark Scientific BenchRocker 2D cihazı ile örneklerin ve solüsyonların çalkalamalı inkübasyonları yapıldı.
- VILBER Fusion Solo 5 cihazı ile Agaroz jel görüntüleme ve Western Blot görüntüleme yapıldı.
- Amersham Biosciences TE 70 PWR cihazı ile Western Blot yapıldı.
- Bio-Rad iMark™ Microplate Absorbance Reader cihazı ile 595 nm’de protein konsantrasyon ölçümü yapıldı.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız ve Diş Sağlığı Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından sağlanan;

- BioHorizons Intra-Spin Centrifuge (IS110Z, USA) cihazı ile titanyum tüplerdeki kan örnekleri santrifüjlendi.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı tarafından sağlanan;

- VWR Mega Star 1.6 santrifüj (Germany) cihazı ile mavi sitratlı tüplerdeki kan örneklerine santrifüj yapıldı.
- Sysmex Automated Blood Coagulation Analyzer (CS-1600, Japan) cihazı ile protrombin testi yapıldı.

3.1.2. Kullanılan malzemeler ve kullanılma amaçları

- *E.coli*'nin büyümesi için antibiyotikli LB besiyeri kullanıldı.

Antibiyotikli LB besiyeri için: Trpytone, Yeast Extract, NaCl, Agar, Ampicillin.

- *A.oryzae*'nin büyümesi için CD ve DPY besiyeri kullanıldı.

CD besiyeri için: Sodium Nitrate, Potassium Phosphate Dibasic, Magnesium Sulfate, Potassium Chloride, Iron (II) Sulfate Heptahydrate, Sucrose, Sodium Chloride.

DPY besiyeri için: Dextrin, Polypepton, Yeast Extract, Potassium Dihydrogen Phosphate, Magnesium Sulfate Heptahydrate.

- DNA'nın jel üzerinde yürütülmesi için Agaroz jel kullanıldı.

Agaroz jel için: Agarose, 1X TAE Buffer, Etidium Bromide.

- Proteinlerin jel üzerinde yürütülmesi için SDS jel ve SDS tamponu kullanıldı.

%12'lik SDS jel için: Akrilamid, Tris (pH=8.8, 1.5 M), Tris (pH=6.8, 1.5 M), SDS (%10), APS (%10), TEMED.

1X SDS Buffer için: Trizma Base, Glycine, SDS.

- Proteinlerin SDS jel üzerinde görüntülenmesi için fiksasyon solüsyonu, coomassie blue boyama solüsyonu ve destaining solüsyonu kullanıldı.

Fiksasyon solüsyonu için: %50 Methanol, %10 Acetic acid.

Coomassie blue boya için: %0,1 Coomassie Blue, %50 Methanol, %10 Acetic acid.

Destaining (boya kaldırma) solüsyonu için: %40 Methanol, %10 Acetic acid.

- Proteinlerin varlığının ispatlanması için Western Blot yapıldı ve birincil antikor olarak %5'lik süt tozu, proteinlerin transferi için Transfer Buffer ve nitroselüloz membranı yıkamak için TBST Wash Buffer kullanıldı .

%5'lik süt tozu için: 2 gr Milk Powder, 40 ml TBST Wash Buffer.

Transfer Buffer (Transfer Solüsyonu) için: 24 mM Trizma Base, 192 mM Glycine, %20 Methanol.

TBST Wash Buffer (TBST yıkama solüsyonu) için: 10 mM Tris-HCl (1 M, pH=7.4), %0,9 NaCl, %0,2 Tween20.

- Proteinlerin IMAC metodu ile saflaştırılmasında Wash Buffer (Yıkama Solüsyonu) ve Elution Buffer (Elüsyon Solüsyonu) kullanıldı.

Wash Buffer (pH=7.4) için: 50 mM NaH₂PO₄ (Moleküler ağırlığı: 119,98 g/mol), 500 mM NaCl (Moleküler ağırlığı: 58,44 g/mol).

Elution Buffer (pH=7.4) için: 50 mM NaH₂PO₄ (Moleküler ağırlığı: 119,98 g/mol), 250 mM NaCl (Moleküler ağırlığı: 58,44 g/mol), 200 mM Imidazole (Moleküler ağırlığı: 68.08 g/mol).

3.2. Metod

3.2.1. Plazmid sentezi

Lumbrokinaz PI239 (*Lumbricus bimastus*) enzimine ait gen dizisi Uniprot (Q95V22)'taki protein sekansından yola çıkılarak belirlenmiştir. Bu sekanstan 44 amino asitlik sinyal peptid dizisi çıkarılmıştır ve geriye kalan 239 aminoasitlik olgun peptidin C-terminaline 6 tane his-tag eklenmiştir. Daha sonra değiştirilen bu protein sekansı TAKA-Amilaz proteinine füzyon yapılmıştır. Oluşturulan bu plazmidin *Aspergillus oryzae* RIB40'a göre kodon optimizasyonu yapılmış ve GenScript firması tarafından sentezletirilmiştir.

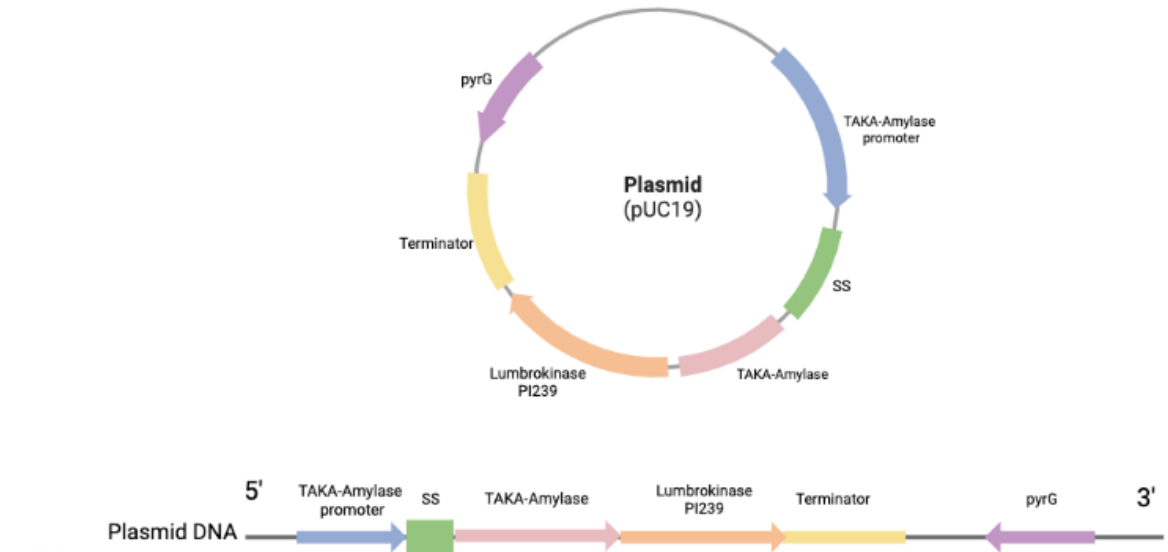
Lumbrokinaz PI239 protein sekansı

```
      10      20      30      40      50      60
IVGGIEARPY EFPWQVSVRR KSSDSHFCCG SIINDRWVVC AAHCMQGESP ALVSLVVGEH

      70      80      90     100     110     120
DSSAASTVRQ THDVDSIFVH EDYNGNTFEN DVSVIKTVNA IAIDINVGPI CAPDPANDYV

     130     140     150     160     170     180
YRKSQC SGWG TINS GG VCCP NVLRYVTLNV TTNAFCDDIY SPLYTITSDM ICATDNTGQN

     190     200     210     220     230
ERDSCQGDSG GPLSVKDGSG IFSLIGIVSW GIGCASGYPG VYARVGSQTG WITDIITNN
```



Şekil 11: *Aspergillus oryzae*'ye kodon optimizasyonu yapılmış plazmid tasarımı.

3.2.2 *Aspergillus oryzae* RIB40'a kodon optimizasyonu yapılmış lumbrokinaz PI239 enziminin *Escherichia coli*'ye transformasyonu

3.2.2.1. *Escherichia coli* One Shot TOP10 kompetent hücrelerin hazırlanması

- Tek bir koloni 50 ml'lik bir falkon tüpünde 5 ml LB'ye inoküle edildi. 37°C'de bir gece büyütüldü.
- Ertesi sabah bundan 1 ml alınarak 100 ml LB'ye aşılama için kullanıldı.
- 37°C'de 1,5-3 saat çalkalandı.
- Spektrofotometre ölçümünde 0.4 OD değerine ulaşıldığında protokole devam edildi.
- Sonra hücreler 10 dakika buzda inkübe edildi.
- Büyük santrifüjde 4°C'de 3 dakika 6000 rpm'de santrifüjlenerak hücreler toplandı.
- Süpernatant döküldü ve 10 ml filtreden geçirilmiş soğuk 0,1 M CaCl solüsyonu ile nazik bir şekilde süspanse edildi.
- Buz üzerinde 20 dakika tekrar inkübe edildi.
- Tekrar büyük santrifüjde 4°C'de 3 dakika 6000 rpm'de santrifüjlenerak hücreler toplandı.

- Süpernatant döküldü ve 5 ml soğuk 0,1 M CaCl / %15 Gliserol solüsyonu ile nazikçe yeniden süspanse edildi.
- Mikrotüplere dağıtıldı (300 µL/tüp) ve -80°C'de donduruldu.

3.2.2.2 Ca⁺⁺ kompetent hücrelerin transformasyonu

- 4 µg dairesel plazmitin içine 40 µL nükleaz içermeyen su eklendi ve yavaşça süspanse edildi.
- Yavaşça 1 µL dairesel plazmitin üzerine ~100 µL kompetent hücreden eklendi (Hücreli ve DNA içermeyen kontrol tüpüne bu işlem uygulanmadı).
- Buz üzerinde 30 dakika inkübe edildi.
- 42°C'de 45 sn inkübe edildi.
- Tekrar buzda 2 dakika inkübe edildi.
- Tüplere 500 µL LB eklendi.
- 180 rpm, 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Hücrelerden sırayla 30,60 ve 120 µL'lik alınarak LB+Ampisilin içeren plakalara eklendi ve yayıldı (Kontrol plakasına 60 µL eklendi).
- Plakalar 37°C'de 1 gece inkübe edildi.
- Ertesi gün midiprep plazmit DNA izolasyonu için 500 ml'lik erlene 100 ml LB+Ampisilin eklendi.
- Aynı zamanda gliserol stok almak için bir falkona da 5 ml LB+Ampisilin eklendi.
- LB+Ampisilin plakalarında 1 gece büyümüş kolonilerden öze ile birer tane alınıp midiprep plazmit DNA izolasyonu ve gliserol stok için hazırlanmış olan LB+Ampisilin'li erlene ve falkona eklendi.
- 180 rpm, 37°C'de 1 gece inkübe edildi.

3.2.2.3 Bakteriden gliserol stok alma

- Cryo tüplere 500'er µL %50 gliserol eklendi.
- Üzerine 500'er µL 37°C'de gece boyu inkübe olan bakteriden eklendi ve karıştırıldı. Bu stoklar -80°C'de saklandı.

3.2.2.4 Midiprep plazmit DNA izolasyonu

- 180 rpm, 37°C'de gece boyu inkübe edilen erlendeki bakteriler 3 falkona eşit şekilde bölüştürüldü.
- Plazmit DNA izolasyonu için QIAGEN Midiprep Plasmid Isolation Kit (Cat. No: 12143 ve 12145) kullanılarak protokol adımları takip edildi.
- İzolasyon bittikten sonra nanodrop ile protein konsantrasyonu ölçüldü.

3.2.2.5 Restriksiyon endonükleazlar ile plazmid DNA'nın kesilmesi

- İzolasyondan sonra nanodrop ile ölçülen protein konsantrasyonuna göre, agaroz jelde yürüyecek örneklerin hacimleri hesaplandı.
- Buzun üzerinde çalışılarak total hacim 20 µL olacak şekilde bir mikrotüpe sırasıyla; 12.1 µL nükleaz içermeyen su, 2 µL enzim tamponu (CutSmart Buffer 10X), 3.5 µL DNA ve en son 1.2'şer µL restriksiyon enzimleri (EcoRI ve HindIII) eklendi ve karıştırıldı.
- 37°C ısı bloğunda 2- 2,5 saat inkübe edildi.

3.2.2.6 Agaroz jel elektroforezi

- %1'lik agaroz jel (1.2 gr Agaroz + 120 ml 1X TAE Solüsyonu) hazırlandı.
- 37°C ısı bloğunda 2- 2,5 saat inkübe olmuş örneğe spin atıldı.
- 20 µL DNA örneğinin üzerine 2 µL 6X Yükleme Tamponu (Loading Buffer) eklendi ve karıştırıldı.
- %1'lik agaroz jel kuyucuklarına sırasıyla; 3 µL DNA belirteci (GeneRuler DNA ladder) ve boya ile karıştırılan DNA örneklerinin tamamı eklendi.
- Agaroz jelde 120 V, 400 mA' da 1,5-2 saat DNA yürütüldü.

3.2.2.7 Agaroz jel ekstraksiyonu

- Agaroz jelde DNA örneği yürütüldükten sonra, UV ışıkta üstteki bant jel (lineer hale getirilmek üzere) fazlalıklarından arındırılarak kesildi.
- Boş bir mikrotüp hassas terazide tartıldı.

- Daha sonra boş mikrotüpün içerisine kesilen jeldeki DNA parçası eklendi ve dolu hali de tekrar hassas terazide tartıldı.
- Mikrotüpün boş ve dolu halinin farkı alındı. (100 mg jel parçası yaklaşık olarak 100 µL'ye denktir)
- Daha sonra agaroz jel ekstraksiyonu için Thermo Scientific GeneJet PCR Purification Kit (Cat. No: K0701) kullanılarak protokol adımları takip edildi (8.adımdaki 50 µL Elüsyon Tamponu yerine 65°C sıcak su banyosunda ısıtılmış nükleaz içermeyen sudan 22 µL eklendi).
- Elde edilen DNA konsantrasyonu nanodrop ile ölçüldü. Nanodropta blank (kör) alınırken nükleaz içermeyen su kullanıldı.

3.3 *Escherichia coli*'de üretilen lumbrokinaz PI239 geninin *Aspergillus oryzae*'ye protoplast transformasyonu

1.Gün:

- CD+(5-FoA)+Uridine+Uracil besiyerinde 5-7 gün inkübe olmuş *Aspergillus oryzae* RIB40 pyrG(-)'ye 10 ml steril Tween80+distile su solüsyonu eklendi ve hücreler kaldırılarak steril falkona toplandı.
- Hücreler 1/10 şeklinde dilüe edildi.
- Spektrofotometre 600 nm'de hücrelerin OD değeri kontrol edildi ve absorbansı ölçüldü.
- Çıkan sonuca göre hesaplama yapıldı (50 ml besiyeri için 0,4 OD olmalı).
- Bu hesaplama göre toplanılan hücreden alınarak erlendeki steril 50 ml 1X DPY+Uridine+Uracil besiyeri üzerine eklendi.
- Hücreler 30°C, 180 rpm'de 1 gece inkübe edildi.

2.Gün:

- Gliserol stok almak için kriyo tüplere 1'er ml steril %50 gliserolden eklendi.
- Üzerine de gece boyu inkübe olmuş erlendeki hücreden 1'er ml eklenerek karıştırıldı. Kriyo tüpler -80°C'de saklandı.
- Aynı zamanda CD+(5-FoA)+Uridine+Uracil içeren besiyerine de erlendeki hücreden 1'er ml eklenerek plakaya yayıldı. Bu plakalar 30°C'de 5-7 gün inkübe edildi.
- Transformasyona başlamadan önce kabinde steril beherin üzerine peynir bezi konularak 15 dk UV'lendi.

- Daha sonra, gece boyu inkübe olmuş erlendeki hücreler peynir bezi üzerine aktarılarak steril otoklavlı behere süzüldü ve sonra üzerine 30 ml distile su eklendi.
- Peynir bezi üzerinde kalan pelet hücreler otoklavlı kaşık ile alınarak %1'lik yatalaz enzim solüsyonunun içine eklendi.
- Enzim solüsyonu ile karıştırılan hücreler 30°C, 80 rpm'de 4 saat boyunca inkübe edildi.
- Boş bir falkonun üzerine peynir bezi konuldu ve 15 dk UV'lendi.
- İnkübasyon bitince enzim solüsyonu ekli hücreler UV'lenmiş falkon üzerindeki peynir bezi üzerine aktarıldı ve süzüldü. Peynir bezinin üzerinde kalan pelet hücreler atıldı.
- Süzülen süpernatant hücreler ile gerekli solüsyonlar muamele edildi ve PEG 4000 ile yıkama aşamaları takip edilerek kontrol ve DNA bulunan falkonlar hazırlandı.
- Otoklavdan çıkan ılık %0,5'lik Top Agar'dan 8 ml DNA olmayan kontrol falkonuna ve 12 ml DNA bulunan falkona eklenerek karıştırıldı.
- Kontrol falkonundaki karışımdan 4'er ml alınarak pozitif ve negatif kontrol plakalara yayıldı.
- DNA bulunan falkondaki karışımdan 4'er ml alınarak diğer CD plakalara yayıldı.
 - *CD+5'FoA+Uridine+Uracil plaka = Pozitif kontrol
 - *1 tane CD plaka = Negatif kontrol
 - *3 tane CD plaka = DNA içeren transformant hücreler
- Plakalar 30°C'de 5-7 gün boyunca inkübe edildi.

Transformasyondan 5-7 gün sonra;

- %0,5'lik Top Agar'da tekli koloni olarak büyümüş plakalardan en iyi koloniler seçildi.
- Bu koloniler yaklaşık 250-500 µl steril distile su ile toplanarak ayrı ayrı CD plakalara yayıldı.
- CD plakalar 30°C'de 5-7 gün boyunca inkübe edildi.

3.4 TAKA-amilaz-lumbrokinaz PI239 füzyon proteininin ekspresyonu

- CD plakalarda 30°C'de 5-7 gün boyunca büyümüş hücrelerden ekspresyon başlatıldı.

1.Gün

- CD plakalarda 30°C'de 5-7 gün boyunca büyümüş hücrelerden 1X DPY besiyerinde (pH=5.5) ekspresyon başlatıldı.
- Plakalara 10'ar ml steril distile su eklendi ve yayıldı.
- Yayılan hücreler 15 ml'lik falkonlara aktarıldı.
- Bir mikrosantrifüj tüpüne 980 µl distile su + 20 µl toplanılan hücreden konularak mikroskopta (10X) sayım yapıldı ve çıkan sonuca göre hesaplamalar yapıldı.
- Steril erlenlere 15'er ml 1X DPY besiyeri (pH=5.5) eklendi.
- Erlenlerin hepsine toplanılan hücrelerden hesaplama sonucunda çıkan miktar kadar (800 µl) eklendi.
- Erlenler 180 rpm, 30°C'de 1 gün boyunca inkübe edildi.

2.Gün

- 250 ml'lik steril erlenlere 75'er ml 2X DPY besiyeri (pH=5.5) eklendi.
- 1 gün boyunca inkübe olmuş 1X DPY besiyerindeki hücrelerden 7.5'er ml serolojik pipetle alınarak 250 ml'lik erlenlere aktarıldı.
- Erlenler 180 rpm, 30°C'de 5-7 gün boyunca inkübe edildi.
- 1X DPY'da kalan hücrelerin bulunduğu erlenler ise parafilmleli kısa süreli olarak +4°C'ye kaldırıldı (Protein üretimi gerçekleştiğinde stok almak için).
- Bu süreçte 3., 6. ve 7. günlerde örnekler alınıp %12'lik SDS jelde yürütüldü.

3.4.1. SDS-PAGE ve coomassie brilliant blue ile proteinlerin boyanması

- 2X DPY besiyerinde inkübe olmuş protein örneklerinden ependorflara 1'er ml aktarıldı.
- Protein örneklerine 21000 g, 4°C, 10 dk santrifüj yapıldı.
- Santrifüj bitince süpernatantlar toplandı ve yeni ependorflara aktarıldı.
- 6X laemmlili boyadan 7 µl alınarak, 30 µl süpernatant ile karıştırıldı.
- Boya ile karışmış örnekler 95°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 15 dk ısıtıldıktan sonra spin atıldı.
- %12'lik SDS jeldeki kuyucuklara sırayla 2,5 µl protein belirteci ve 20'şer µl protein örneklerinden konuldu.

- Proteinler SDS jelde 400 mA, 120 V'de 2 saat yürütüldü.
- SDS'de yürütülen jel distile sudan geçirilip, 40 dk fiksasyon solüsyonunda çalkalandıktan sonra gece boyunca coomassie brilliant blue boyasında çalkalamaya bırakıldı. Ertesi gün jel boyadan alınarak boya kaldırma (destaining) solüsyonunda en az 4-5 saat çalkalandı.

3.5. Rekombinant füzyon proteininin büyük hacimli ekspresyonu ve konsantre edilmesi

- SDS-PAGE jel analizi sonucunda en iyi koloni (GS-X7-3) seçilerek büyük hacimli protein ekspresyonu başlatıldı. Büyük hacimli ekspresyon başlatılırken +4°C'de saklanan 1X DPY besiyerindeki hücreler kullanıldı.
- Plakadaki hücreler 10 ml steril distile su ile yayıldıktan sonra falkona toplandı.
- Bir mikrosantrifüj tüpüne 980 µl distile su + 20 µl toplanılan hücreden konularak mikroskopta (10X) sayım yapıldı ve çıkan sonuca göre hesaplamalar yapıldı.
- Steril 2 tane erlene 75'er ml 1X DPY besiyeri (pH=5.5) eklendi.
- Erlenlerin ikisine de toplanılan hücrelerden hesaplama sonucunda çıkan miktar kadar eklendi.
- Erlenler 180 rpm, 30°C'de 1 gün boyunca inkübe edildi.
- Ertesi gün, 250 ml'lik 10 tane steril erlene 100'er ml 2X DPY besiyeri (pH=5.5) eklendi.
- 1 gün boyunca inkübe olmuş 1X DPY besiyerindeki hücrelerden 10'ar ml alınarak 250 ml'lik erlenlere aktarıldı.
- Erlenler 180 rpm, 30°C'de 7 gün boyunca inkübe edildi.
- 1X DPY'da kalan hücrelerin bulunduğu erlenler ise parafilmle kapalı olarak +4°C'ye kaldırıldı.
- Ekspresyonun 7. gününde örnek alınıp %12'lik SDS jelde yürütüldü.
- 7.gün sonunda protein örnekleri kurutma kağıdı kullanılarak süzüldü ve sonra da membran filtrasyon sisteminden geçirildi.
- Filtrelenen örnek 10 kDa'lık filtre kullanılarak ultrafiltrasyon yöntemiyle 1000 ml'den 100 ml'ye kadar 10 kat konsantre edildi.
- Konsantre edilen örnekten 15 ml alınarak 10 kDa'lık amicon santrifüj filtre ile 1 ml'ye kadar konsantre edildi.
- Protein örneği totalde 25 kat konsantre edildi.

3.6. Histidin etiketli rekombinant füzyon proteininin IMAC metodu ile saflaştırılması

Ultrafiltrasyon ve amicon santrifüj filtre yöntemi ile total olarak 25 kat konsantre edilerek 1 ml'ye düşürülen protein örneğini saflaştırmak üzere IMAC metodu kullanılmıştır.

- IMAC metodunda ilk olarak kolona 2 ml resin eklendi.
- Resin ekledikten sonra kolondan en az 200 ml steril distile su geçirildi.
- Steril distile su geçtikten sonra 10 ml Wash Buffer eklendi.
- Wash Buffer resinin iki katı kalana kadar aktığında kolonun tıpası kapatıldı ve resin ile Wash Buffer iyice karıştırıldı.
- Daha sonra karıştırılan bu resin, 25 kat konsantre edilen 1 ml protein örneğine eklendi.
- Resin ile karıştırılan protein örneği 4°C'de 16 saat çalkalamaya bırakıldı.
- Ertesi gün, önce kolondan 10 ml Wash Buffer geçirildi.
- Wash Buffer geçirildikten sonra, 4°C'de 16 saat çalkalanmış olan protein örneği 5 kere kolondan geçirildi ve falkona toplandı (Protein örneği ile ilgili kısımlar buzun üzerinde yapılmıştır).
- Daha sonra, kolondan 2 defa 15'er ml Wash Buffer geçirilerek ayrı ayrı falkonlara toplandı.
- Falkona toplanan örnekler -20°C'ye kaldırıldı.
- Kolonun tıpası kapatılarak kolona resinin iki katı kadar Elution Buffer eklendi ve 10 dk beklendi.
- 10 dk bittikten sonra tıpa çıkarıldı yerine şırınga iğne ucu takılarak Elution Buffer'ın falkona akması sağlandı.
- Elution Buffer aşaması 2 kere aynı şekilde yapıldı.
- Daha sonra, kolondan tekrar en az 200 ml steril distile su geçirildi.
- Son olarak 10 ml %20 etanol geçirildi ve resinin 2 katı etanol kalacak şekilde kolonun tıpası kapatılarak 4°C'ye kaldırıldı.
- 2 kere Elution Buffer ile toplanılan protein örnekleri birleştirilerek 10 kDa'lık amicon santrifüj filtre ile 500 µl'ye kadar konsantre edildi.

- Konsantre edilen bu örnek bir mikrosantrifüj tüpüne toplanarak SDS-PAGE ve Western Blot yapılmak üzere 20°C'ye kaldırıldı.

3.6.1. Saflaştırılan histidin etiketli rekombinant füzyon proteininin SDS-PAGE ile analizi

- Elution Buffer ile toplanılan ve 10 kDa'lık amicon santrifüj filtre ile 500 µl'ye kadar konsantre edilen protein örneğinden 30 µl alınarak, 7 µl 6X laemmlı boya ile karıştırıldı.
- Pozitif kontrol için 21 µl histidin etiketli bir protein ve 4 µl 6X laemmlı boya; negatif kontrol için ise 27 µl TAKA-Amilaz ile 4 µl 6X laemmlı boya karıştırıldı.
- Boya ile karışmış örnekler 95°C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 15 dk ısıtıldıktan sonra spin atıldı.
- %12'lik SDS jeldeki kuyucuklara sırayla; 20 µl pozitif kontrol, 2,5 µl protein marker, 20 µl protein örneği ve 20 µl negatif kontrol koyuldu.
- Proteinler SDS jelde 400 mA, 120 V'de 2 saat yürütüldü.

3.6.2. Saflaştırılan histidin etiketli rekombinant füzyon proteininin Western Blot ile analizi

- SDS'de yürütülen jelin boyutlarına uygun olarak dört tane whatman kurutma kağıdı ve bir tane nitroselüloz membran kağıdı kesildi.
- SDS jel ve nitroselüloz membran kağıdı ayrı kaplardaki Transfer Buffer içerisinde 10 dk boyunca bekletildi.
- 10 dk bitince Western Blot cihazına Transfer Buffer dökülerek yayıldı.
- Whatman kurutma kağıtlarını Transfer Buffer ile ıslattıktan sonra sırayla; en alt kısma iki tane whatman kurutma kağıdı, üzerine nitroselüloz membran kağıdı, membranın üzerine jeli ve en üst kısma da diğer iki tane whatman kurutma kağıdı konuldu.
- Daha sonra hava almaması için bir falkon ile üzerinden geçildi ve Western Blot cihazında 300 mA'da 1,5 saat transfer yapıldı.
- Transfer bittikten sonra hızlıca nitroselüloz membran kağıdında protein belirteci ait bantlar işaretlendi.
- Membran 5 dk , jel ise 10 dk distile suda çalkalamaya bırakıldı.

- Daha sonra jel fiksasyon solüsyonuna alındı ve 40 dk çalkalamaya bırakıldı.
- Membran ise sırayla önce distile su, sonra TBST Wash Buffer ile 5'er dk aralıklarla 3 defa çalkalamaya bırakıldı.
- Son olarak membran %5'lik süt tozuna aktarılarak +4 °C'de geceboyu çalkalamaya bırakıldı.
- Ertesi gün 5'er dk aralıklarla membran 2 defa TBST Wash Buffer ile çalkalandı.
- Membran yıkandıktan sonra HRP Anti-6X His tag® antibody (Ab1269, Abcam) (1/5000 dilüe) konjuge antikoru aktararak +4 °C'de 3 saat çalkalandı.
- 3 saat sonra membran antikordan alınarak 5 kere 5'er dk aralıklarla TBST Wash Buffer ile yıkandı.
- Daha sonra ADVANSTA WesternBright Sirius HRP substrate kiti ile membrana 300 µl distile su + 300 µl reagent A + 300 µl reagent B karıştırılıp eklenerek kemilüminesans görüntüleme yapıldı.

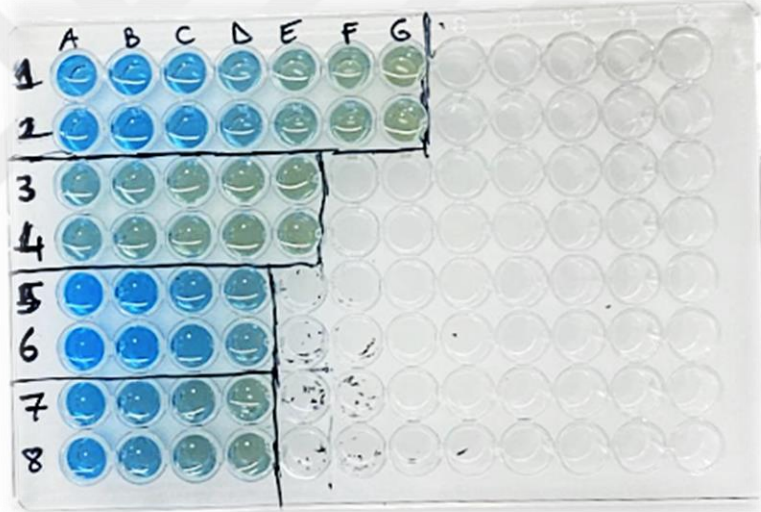
3.6.3. Safılaştırılan rekombinant proteinin tuzdan arındırılması ve tampon değişimi

- IMAC metodu sonrası safılaştırılan histidin etiketli proteinin imidazolden arındırılması için 10 kDa'lık amicon santrifüj filtre kullanılarak PBS (pH=7.4) ile tampon değişim (buffer exchange) yöntemi uygulandı.
- Bu yöntemde 1 ml'lik protein örneği PBS ile 3 kere muamele edildi.

3.7. Bradford yöntemi ile safılaştırılan rekombinant proteinin konsantrasyonunun ölçülmesi

- Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit 23200 (MAN0011181, USA) kullanılarak standard microplate prosedürü uygulandı (Şekil 12).
- Protein konsantrasyonu ölçümü deneyinde 96 kuyucuğu bulunan plaka ile çalışıldı.
- Ölçüm yapılacak saf halde bulunan ve buffer exchange yapılmış protein örneği (200 µl) öncelikle 1:1 oranında PBS (200 µl) ile seyreltilerek ana stok olarak hazırlandı.
- Bu ana stok kullanılarak 1/4, 1/8, 1/16 ve 1/32 oranında protein örnekleri tekrardan PBS ile seyreltilerek hazırlandı.

- Çalışmada kullanılacak her bir kuyucuğa 150 µl Coomassie çalışma solüsyonu eklendi.
- Coomassie çalışma solüsyonu eklenen ilk 6 adet kuyucuğa konsantrasyonu bilinen standart BSA örnekleri eklendi (2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/ml, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL).
- Son kuyucuk ise blank (örnek olmayan sadece çalışma solüsyonu) olarak belirlendi.
- Son olarak ise ölçüm alınacak protein örnekleri, 150'şer µl olarak kuyucuklara eklendi.
- Daha sonra plaka 30 saniye boyunca hafifçe çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- Bu prosedürlerin ardından Bio-Rad iMark™ Microplate Absorbance Reader cihazı kullanılarak 595 nm'de protein konsantrasyonu ölçümü yapıldı.



Şekil 12: 96 kuyucuklu plakada standartların ve protein örneklerinin Bradford yöntemi ile gösterilmesi.

3.8. Titanyumla hazırlanmış trombosit zengin fibrin (T-PRF) ve lökosit zengin fibrin (L-PRF) pıhtılarının hazırlanması ve fibrinolitik lumbrokinaz enzimi ile muamelesi

Bu deney Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız ve Diş Sağlığı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, Prof. Dr. Mustafa Tunalı eşliğinde

yapıldı ve etik kurallar açısından sorun teşkil etmemesi amacıyla işlemin anlık fotoğrafı çekildi (Şekil 13).



Şekil 13: Antekübital damardan alınan kan örneği.

- Fibrin pıhtısı oluşturmak için deneyde kullanılmak üzere gereken 20 ml kan örneği kolumdaki antekübital damardan şırınga ile tek seferde sağlık personeli tarafınca alındı (Şekil 13) ve 2 tane titanyum tüpe 10'ar ml kan örnekleri hızlı bir şekilde aktarıldı.
- Titanyum tüpler parafilmleterek hızlı bir şekilde BioHorizons Intra-Spin Centrifuge (IS110Z, USA) cihazına konarak oda sıcaklığında 2,800 rpm'de 12 dakika santrifüjlendi (Şekil 14).



Şekil 14: Titanyum tüplere konulan kan örneklerinin santrifüjlenmesi.

- Sırasıyla 4 tane 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 100 µl, 250 µl ve 500 µl önceden saflaştırılmış ve sonra buffer exchange yapılmış lumbrokinaz enzimi eklendi (kontrol tüpüne enzim eklenmedi).
- Santrifüjden sonra T-PRF ve L-PRF pıhtıları steril cımbız ile titanyum tüplerden çıkarıldı ve steril bir gazlı bez üzerine yerleştirildi (Şekil 15).



Şekil 15: Santrifüj sonrası titanyum tüplerden alınan T-PRF ve L-PRF pıhtıları.

- Plazma kısmı kırmızı kan hücrelerinden bistüri kullanılarak ayrıldı ve ayrılan plazma serum fizyolojik ile yıkandı (Şekil 16).



Şekil 16: Fibrin pıhtıdaki eritrositlerden arındırılan plazma kısmı.

- Daha sonra plazma bistüri yardımıyla eşit parçalara kesildi.
- Eşit parçalara ayrılan plazmalar pens yardımıyla mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve üzerlerine 1,5 mL serum fizyolojikten eklendi (Şekil 17).
- Mikrosantrifüj tüpleri parafilmlelenerek oda sıcaklığında 7 gün boyunca gözlemlenmeye bırakıldı.



Şekil 17: Fibrinolitik lumbrokinaz enzimi ile farklı konsantrasyonlarda muamele edilen plazma parçacıkları ve enzim eklenmeyen kontrol grubu.

3.9. Protrombin Zamanı (PT) testi ile fibrinolitik lumbrokinaz enzimi aktivitesi tayini

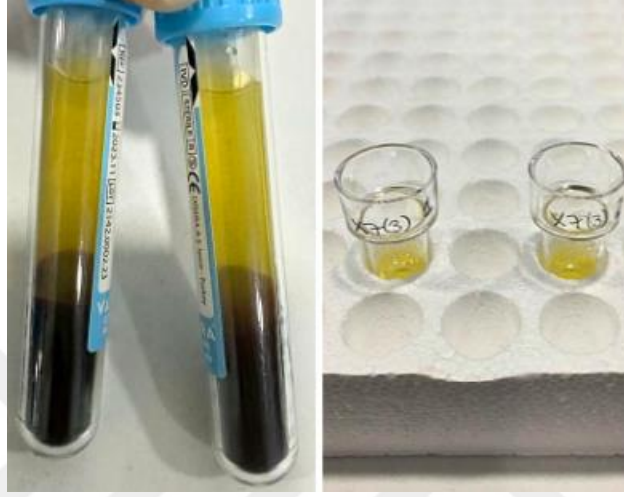
Bu deneyin tamamı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi biyokimya laboratuvarında yapılmıştır. Kullanılan cihazlar ve malzemeler aynı laboratuvar tarafından sağlanmıştır.

- Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde sağlık personeli yardımıyla tarafımdan alınan kan örneği 2 adet mavi sitratlı tüpe aktarıldı ve etik kurallar açısından sorun teşkil etmemesi için işlemin anlık fotoğrafı çekildi (Şekil 18)



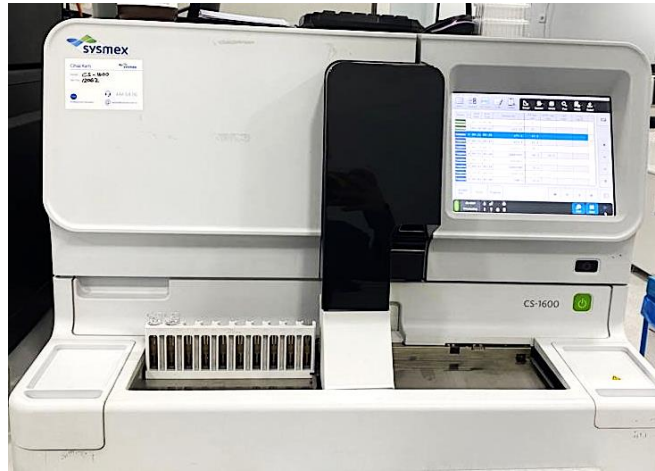
Şekil 18: Mavi sitratlı tüplere alınan kan örneği.

- VWR Mega Star 1.6 santrifüj (Germany) cihazı kullanılarak alınan kan örneklerine 2500 g'de 10 dk santrifüj yapıldı.
- 2 tane PT küvetine 250'şer µl santrifüj sonrası elde edilen plazmadan ve üzerlerine 250'şer µl önceden saflaştırılmış ve sonra buffer exchange yapılmış lumbrokinaz enzimi eklendi (Şekil 19).
- Kontrol küvetine ise sadece 500 µl plazma eklendi.



Şekil 19: Santrifüj sonrası kan örneğinden ayrılan plazma ve PT küvetlerine eklenen plazma ile muamele edilen lumbrokinaz enzimi.

- Hazırlanan küvetlere pipetaj yapıldıktan sonra Sysmex Automated Blood Coagulation Analyzer (CS-1600, Japan) cihazına yerleştirildi ve protrombin formatında cihaz çalıştırıldı (Şekil 20).
- Cihaz otomatik olarak 15'er dk aralıklarla kontrolün ve enzim örneklerinin sonuçlarını listeledi.

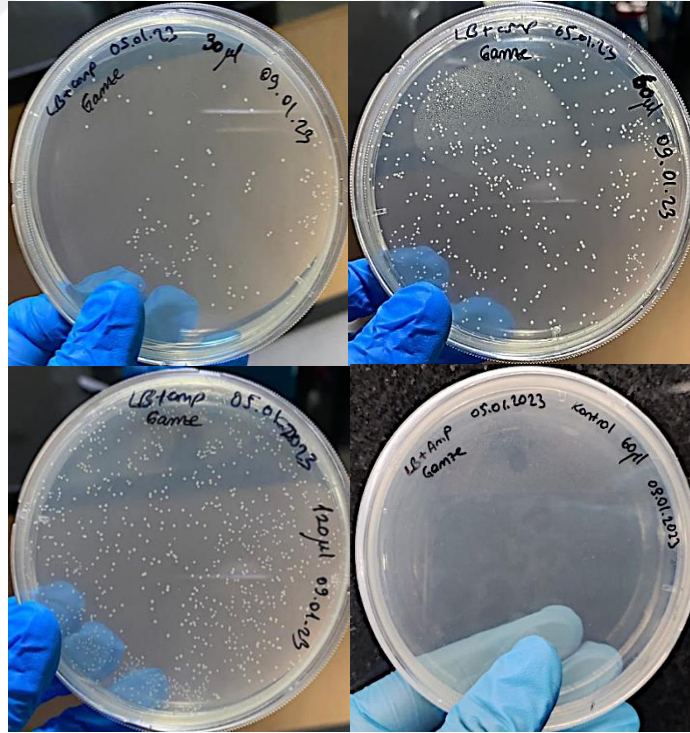


Şekil 20: Sysmex Automated Blood Coagulation Analyzer (CS-1600, Japan) cihazı ile protrombin testinin yapılması.

4.BULGULAR

4.1. Bakteriyel Transformasyon

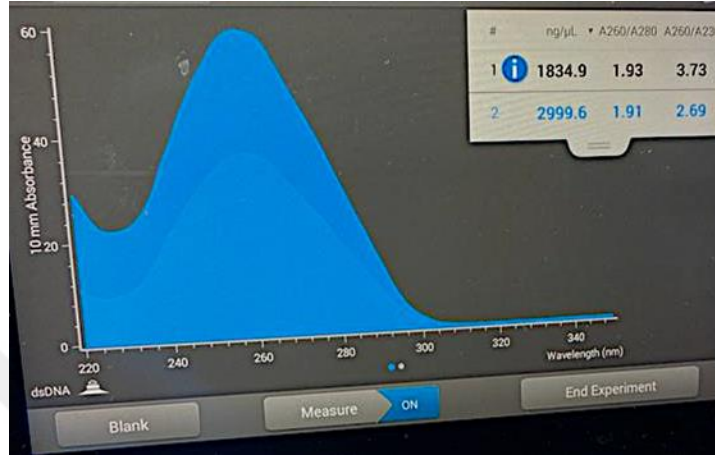
Bakteriyel transformasyon, plazmit üzerindeki genetik bilginin bakteri hücresine iletilmesi amacıyla uygulanan yabancı DNA'nın bakteri hücresine doğrudan dahil edilmesi işlemidir. Seleksiyon için Luria Broth (LB) Agar besiyerine Ampicillin antibiyotiği eklenir. Sadece ampisiline dirençli plasmid içeren bakteriler bu besiyerinde üreyebilmektedir. Ampisilin içeren LB Agar besiyerine transforme hücrelerden sırayla 30,60 ve 120 µL'lik eklendi ve yayıldı ve plakalar 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Transformasyon başarı ile tamamlandı ve büyüyen koloniler gözlemlendi. Pozitif kontrolde ise beklenildiği gibi üreme gözlemlenmedi (Şekil 21).



Şekil 21: Ampisilinli LB Agar plakalarında geceboyu büyümüş transforme koloniler ve pozitif kontrol grubu.

4.1.1 Midiprep plazmid DNA izolasyonu

Midiprep plazmid DNA izolasyonu sonucunda yüksek verimde plazmid DNA elde edilmiştir. Nanodrop cihazı kullanılarak izole edilen plazmid DNA konsantrasyonu 2999.6 ng/μL olarak ölçülmüştür (Şekil 22).

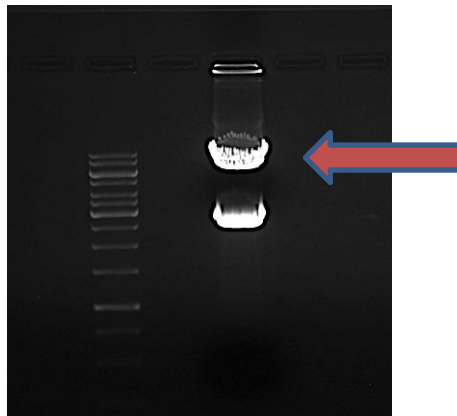


Şekil 22: Midiprep plazmid DNA izolasyonu sonrası elde edilen DNA miktarı.

4.1.2. Plazmid DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesilmesi

İzole edilen plazmid DNA, EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesildi. Kesilen plazmid DNA agaroz jelde yürütüldü ve üstteki hedef DNA parçası jelden uzaklaştırılarak bir mikrotüpe alındı (Şekil 23). Kesilen DNA parçasının hacmi 1,11 gr olarak tartıldı. Mikrotüpün boş ve dolu halinin farkı alındı.

$1,51 \text{ gr} - 1,11 \text{ gr} = 0,40 \text{ gr} = 400 \text{ mg} = 400 \mu\text{L}$ (100 mg jel parçası yaklaşık olarak 100 μL'ye denktir).



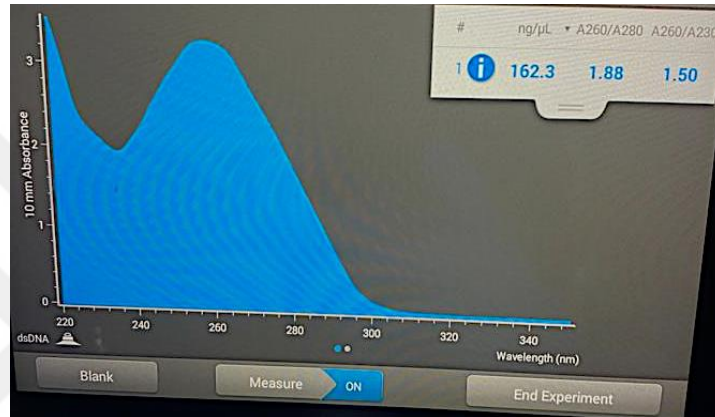
Şekil 23: EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilen plazmin DNA'nın agaroz jel görüntüsü.

4.1.3. Agaroz jel ekstraksiyonu

Agaroz jel ekstraksiyonu sonrası elde edilen DNA miktarı nanodrop cihazı ile 162.3 ng/μL olarak ölçülmüştür (Şekil 24). *Aspergillus oryzae*'ye transformasyon yapılabilmesi için DNA miktarının uygun konsantrasyonda olması gerekir. Transformasyona başlanabilmesi için total hacim 1500-2000 ng/μL arasında olmalıdır.

$$162.3 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 10 \text{ }\mu\text{L DNA} = 1623 \text{ ng/}\mu\text{L}$$

Transformasyon için elde edilen DNA konsantrasyonu şartlara uygundur. Dolayısıyla, 10 μL DNA ile transformasyona başlanmıştır.



Şekil 24: Agaroz jel ekstraksiyonu sonrası elde edilen DNA miktarı.

4.2. Aspergillus Protoplast Transformasyonu

CD+(5-FoA)+Uridine+Uracil besiyerinde 5-7 gün inkübe olmuş *Aspergillus oryzae* RIB40 pyrG(-)'den toplanan hücreler 1/10 şeklinde dilüe edildi. Spektrofotometre 600 nm'de hücrelerin OD değeri kontrol edildi ve absorbansı 0,66 olarak ölçüldü. Çıkan sonuca göre hesaplama yapıldı (50 ml besiyeri için 0,4 OD olmalı).

$$0,66 \times 10 = 6,6$$

$$6,6 : 0,4 = 16,5$$

$$50 : 16,5 = 3,03 \text{ ml hücre}$$

Bu hesaplama göre toplanılan hücreden 3,03 ml alınarak erlendeki steril 50 ml 1X DPY+Uridine+Uracil besiyeri üzerine eklendi ve hücreler 30°C, 180 rpm'de 1 gece inkübe edildi.

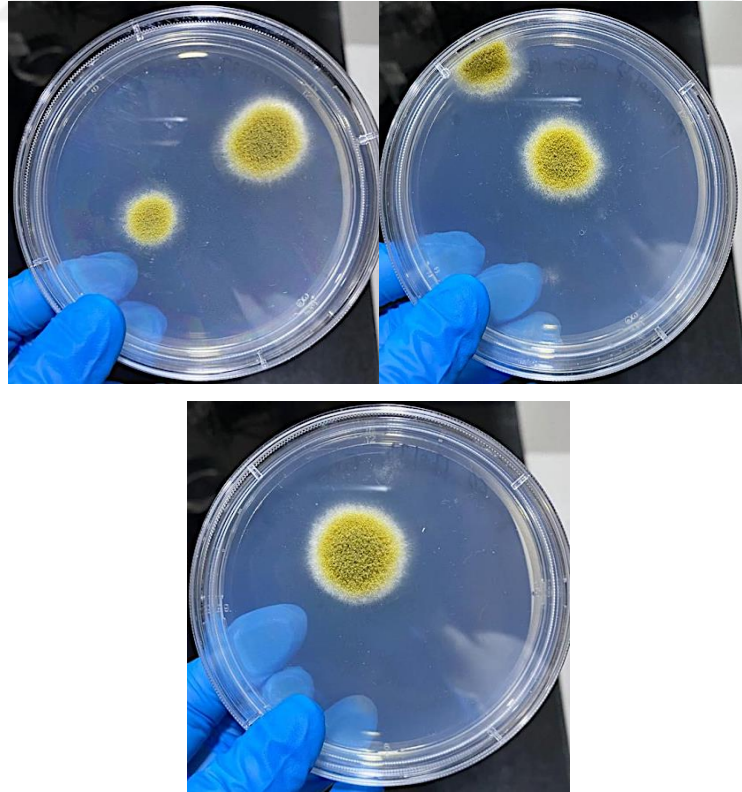
Transformasyonun ikinci gününde hazırlanan önkültür hücreden alınarak negatif ve pozitif kontrol için hazırlanan CD+5'FoA+Uridine+Uracil plakalarına eklenerek 30°C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılan hücreler başarılı bir şekilde büyümüştür (Şekil 25).



Şekil 25: Transformasyon negatif ve pozitif kontrol plakaları.

Transformasyon aşamasında, thoma lamı ile floresan mikroskopta (10X) protoplast hücrelerin sayımı yapıldı ve ortalama 25 tane protoplast hücre olduğu görülmüştür.

Transformasyonun ikinci günü, ılık %0,5'lik Top Agar DNA bulunan falkonlara eklenerek karıştırıldı. DNA içeren bu falkondaki karışımdan 4'er ml alınarak CD besiyeri içeren plakalara yayıldı. Plakalar 30°C'de 5-7 gün boyunca inkübe edildi. Transformasyondan 5-7 gün sonra, %0,5'lik Top Agar'da tekli koloni olarak büyümüş plakalardan (Şekil 26) koloniler seçilip toplanarak ayrı CD plakalara yayıldı ve 30°C'de 5-7 gün boyunca inkübe edildi (Şekil 27).



Şekil 26: Transformasyon sonrası oluşan %0,5'lik Top Agar'da büyümüş transformant koloniler.



Şekil 27: CD plakalarda 30°C’de 5-7 gün boyunca büyümüş transformant tekli koloniler.

4.3. Protein Ekspresyonu

CD plakalarda 30°C’de 5-7 gün boyunca büyümüş hücreler toplanarak mikroskopta (10X) sayım yapıldı. Sayım sonucu ortalaması 150 olarak bulundu ve Microsoft Excel’de yapılan hesaba göre hücreden ne kadar miktarda alınması gerektiği (800 µl) hesaplandı. Hücreler eklendikten sonra 1X DPY besiyerinde (pH=5.5) ekspresyon başlatıldı (Şekil 28).



Şekil 28: 1X DPY besiyerinde 1 gün boyunca eksprese olmuş protein örnekleri.

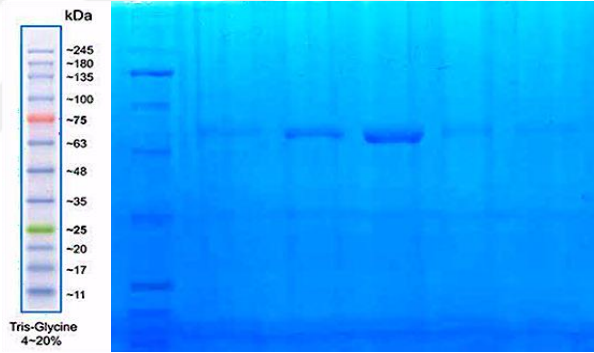
Ertesi gün, 1X DPY besiyerindeki hücreler 2X DPY besiyerine aktarılarak 180 rpm, 30°C’de 7 gün boyunca inkübe edildi (Şekil 29).



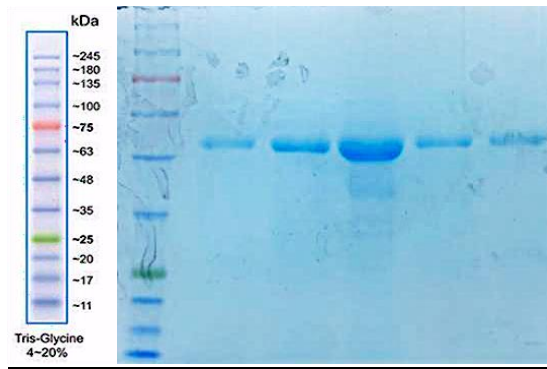
Şekil 29: 2X DPY besiyerinde 7 gün boyunca eksprese olmuş protein örnekleri.

4.3.1. SDS-PAGE

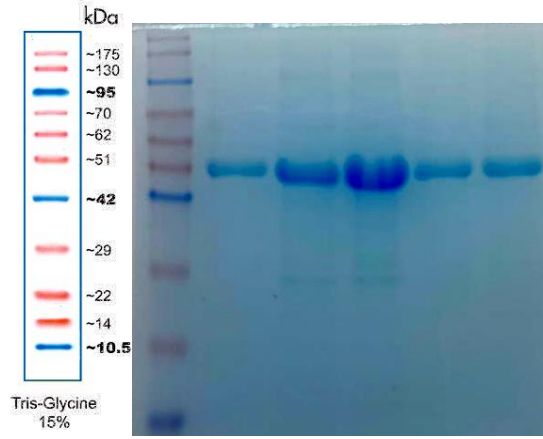
2X DPY besiyerinde eksprese olan protein örneklerinden 3.,6. ve 7. günlerde mikrotüplere örnekler alınarak SDS-PAGE yapılmıştır (Şekil 30-32).



Şekil 30: 2X DPY besiyerinde 3 gün boyunca eksprese olan protein örneklerinin SDS-PAGE sonrası coomassie blue boyası ile boyanarak görüntülenmesi.



Şekil 31: 2X DPY besiyerinde 6 gün boyunca eksprese olan protein örneklerinin SDS-PAGE sonrası coomassie blue boyası ile boyanarak görüntülenmesi.



Şekil 32: 2X DPY besiyerinde 7 gün boyunca eksprese olan protein örneklerinin SDS-PAGE sonrası coomassie blue boyası ile boyanarak görüntülenmesi.

4.3.2. En iyi koloninin büyük hacimli protein ekspresyonu ve saflaştırılması

SDS-PAGE jel analizi sonucunda en iyi koloni (GS-X7-3) seçilerek 1 litrelik büyük hacimli protein ekspresyonu başlatıldı (Şekil 33).

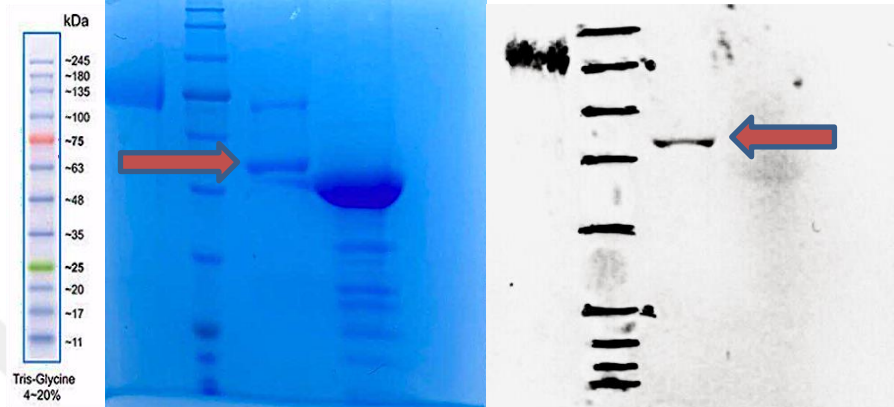


Şekil 33: GS-X7-3 kolonisi.

Ekspresyonun 7.gününde protein örnekleri membran filtrasyon sisteminden geçirildi. Daha sonra, ultrafiltrasyon ve amicon santrifüj filtre yöntemiyle total olarak 25 kat kadar konsantre edildi. Ardından, histidin etiketli bu protein IMAC yöntemi kullanılarak başarıyla saflaştırılmıştır.

4.5. Saflaştırılan histidin etiketli rekombinant füzyon proteinin SDS-PAGE ve Western Blot analizi

SDS ve Western Blot sonucu, saflaştırılan histidin etiketli TAKA-Amilaz ile füzyon olan GS-X7-3 proteininin yaklaşık 55 kDa olduğunu göstermiştir. Burada kullanılan pozitif kontrol histidin işaretli bir protein ve negatif kontrol ise TAKA-Amilaz'dır. Pozitif kontrol yaklaşık 75 kDa ve negatif kontrol yaklaşık 48 kDa'dır (Şekil 34).



Şekil 34: Saflaştırılan histidin etiketli GS-X7-3 proteininin SDS-PAGE ve Western Blot görüntüsü.

4.6. Saflaştırılan protein konsantrasyonunun Bradford yöntemi ile analizi

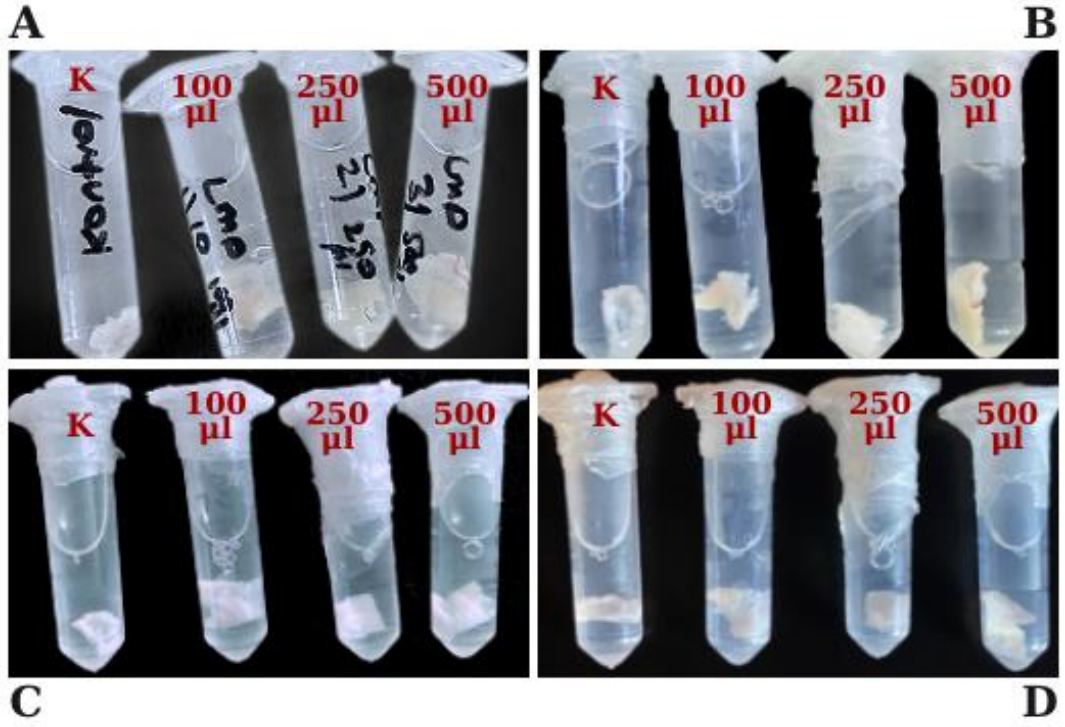
Bradford yöntemi kullanılarak saflaştırılmış ve imidazolden arındırılmış proteinin konsantrasyonu 87 µg /mL olarak saptandı.

4.7. Fibrinolitik lumbrokinaz enziminin pıhtıları çözme analizi

Mikrosantrifüj tüplerine sırayla 100 µl, 250 µl ve 500 µl konsantrasyonlarında eklenen fibrinolitik enzimin pıhtıları çözmesi oda sıcaklığında 7 gün boyunca izlendi.

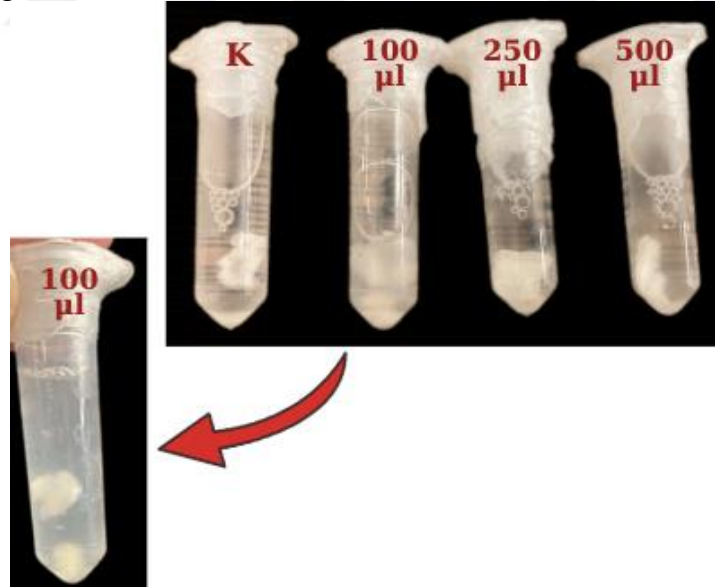
0, 6, 12, 24, 42, 66, 130 ve 150. saatlerdeki gelişim aşamaları takip edildi ve fotoğraf çekilerek kaydedildi.

İlk 24 saatte pıhtıda herhangi bir parçalanma gerçekleşmedi (Şekil 35). Ancak 42.saatte 100 µl enzim içeren tüpteki pıhtıda gözle görülebilen bir parçalanma meydana geldi (Şekil 36). Bu durumu takiben sırayla tüplerdeki değişimler incelendiğinde ilk olarak 66. saatte 100 µl enzim içeren, daha sonra 130. saatte 250 µl enzim içeren ve son olarak 150.saatte 500 µl enzim içeren tüpteki pıhtı tamamen çözüldü. Sonuç olarak 150. saatte tüm pıhtılar çözülmüş oldu. Kontrolde ise enzim olmadığı için beklendiği gibi pıhtı çözünmedi (Şekil 37-39).



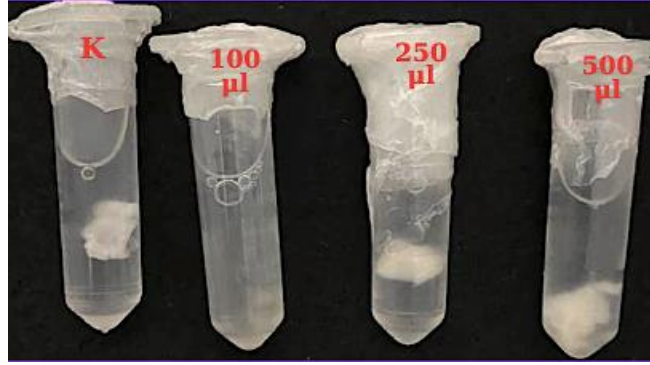
Şekil 35: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların ilk 24 saatteki sonuçları.

A. Başlangıç zamanındaki görüntüsü, **B.** İlk 6.saat görüntüsü, **C.** İlk 12.saat görüntüsü, **D.** İlk 24.saat görüntüsü.



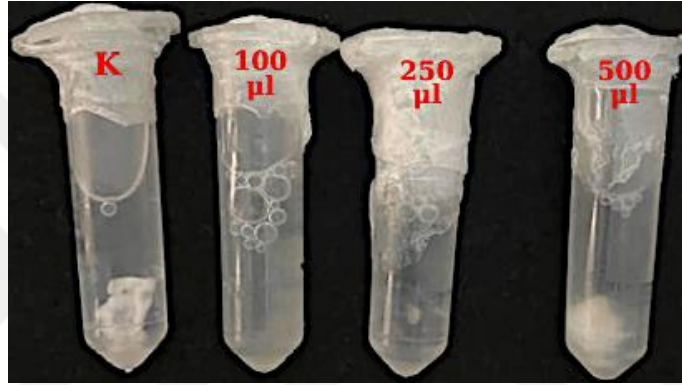
Şekil 36: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların 42. saatteki sonuçları.

100 µl enzim konulan tüpte fibrin pıhtıda parçalanma gözlemlenmiştir.



Şekil 37: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların 66. saatteki sonuçları.

100 µl enzim konulan tüpte fibrin pıhtı tamamen çözülmüştür.



Şekil 38: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların 130. saatteki sonuçları.

250 µl enzim konulan tüpte fibrin pıhtı tamamen çözülmüştür.



Şekil 39: Lumbrokinaz enzimi ile muamele edilen fibrin pıhtıların 150. saatteki sonuçları.

500 µl enzim konulan tüpte fibrin pıhtı tamamen çözülmüştür.

Sonuç olarak kontrol grubu hariç enzim eklenen tüm tüplerdeki pıhtılar başarılı bir şekilde çözülmüştür.

4.8. Lumbrokinaz enzimi aktivitesinin ölçülmesi

Protrombin Zamanı (PT) testine göre insanda normalde kontrol grubundaki sonuçta da görüldüğü üzere 10 sn'de pıhtılaşma görülmektedir. Bu deneyde lumbrokinaz enziminin kontrol grubuna kıyasla protrombin süresini uzatması beklenmiştir. Dolayısıyla enzim aktivitesi testinin sonucuna göre, lumbrokinaz enzimi sayesinde pıhtılaşma süresi kontrol grubuna kıyasla 5 sn daha geç gerçekleşmiştir (Tablo 3).

Tablo 3: Protrombin Zamanı (PT) testi sonuçları.

	<i>PT-SEC</i>	<i>PT-%</i>	<i>PT-INR</i>
<i>Kontrol</i>	10.9	96.3	0.95
<i>Örnek 1</i>	15.1	50.6	1.35
<i>Örnek 2</i>	15.2	49.9	1.36
	14.8	52.6	1.32

PT-SEC: Saniye cinsinden protrombin zamanı.

PT-%: Yüzde cinsinden protrombin zamanı.

PT-INR: Kan pıhtılaşma hızı=protrombin zamanı / uluslararası normalize edilmiş oran.

5. TARTIŞMA

Uzun yıllardır artan kalp ve damar hastalıkları ve ayrıca, COVID-19 hastalığı geçirdikten sonra oluşan trombotik hastalıklardan dolayı bilim insanları güçlü, etkili ve güvenilir anti-trombotik ajanların arayışı içerisinde. Streptokinaz, doku plazminojen aktivatörü (t-PA), ürokinaz (u-PA), APSAC ve pro-ürokinaz (scu-PA) olmak üzere en çok kullanılan 5 adet anti-trombotik ajan bulunmaktadır. Ancak APSAC ve pro-ürokinazın preparatları Türkiye’de bulunmamaktadır. Bu trombolitik ajanlar pahalıdır ve şiddetli kanama, alerji ve hipotansiyon gibi ciddi yan etkilerinin olması ve dolaşımda uzun süreli etki sağlayamaması gibi çok fazla dezavantajı bulunmaktadır. Lumbrokinaz PI239, solucan *Lumbricus bimastus*’tan üretilen ve genellikle Asya’da uzun yıllardır gıda takviyesi olarak kullanılan fibrinolitik bir enzimdir. Uzun yıllardır güvenle kullanılan lumbrokinaz takviyelerinin güvenilirliği fazladır ve neredeyse hiç yan etkisi görülmemiştir. İnhibisyonu ve substrat seçiciliği üzerine yapılan araştırmalara göre, lumbrokinaz serin proteaz ailesine aittir. Bu, solucanlardan türetilen ekstraktın, 4-6 farklı protein içeren birkaç elementin bir karışımını içerdiğini gösterir. Çoğunun insanlar üzerinde aynı toksik olmayan fibrinolitik etkiye sahip olduğu düşünülse de, yan etkiye neden olan olası safsızlıkları ortadan kaldırmak için tek bileşenli lumbrokinaz ilaçlarını belirleme ve üretme çabaları zor ve zaman alıcı olmuştur (87). Lumbrokinazın her ne kadar homolog üretimi zor, zaman alıcı ve düşük verimde olsa da, rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak heterolog üretim yapılabilir ve sonuç olarak fibrinolitik aktiviteye sahip tek bir bileşen elde edilebilir. Lumbrokinazın şuana kadar sadece bakteri *E.coli* (9-14), maya *P. pastoris* (15-20), keçi sütü (21), ayçiçeği (22) ve tütün (23) bitkisinde heterolog üretimi yapılmıştır. Ancak literatürde şuanki varolan çalışmalar incelendiğinde, hem homolog hem de heterolog enzim üretimi için önemli bir kaynak olan *A.oryzae*’nin daha önce lumbrokinazın heterolog üretiminde hiç konakçı olarak kullanılmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla fibrinolitik ve trombolitik etkilere sahip

olan lumbrokinaz PI239, ilk defa bu çalışmada filamentli bir mantar türü olan *A. oryzae*'de başarıyla üretilmiş ve saflaştırılmıştır.

Bir çalışmada lumbrokinaz PI239'in olgun peptidi, araştırmacılar tarafından, *E. coli* BL21 (DE3) bakteri hücresinde klonlanmış ve inklüzyon cisimciği olarak ifade edilmiştir. Inklüzyon cisimciklerinin %90'ı çözülerek daha sonra saflaştırılmış ve diyaliz yoluyla renatürasyon yapılmıştır. Sonuç olarak, saf rLK'nın fibrinolitik aktivitesi 1500 IU/mg olarak belirlenmiştir (10). Başka bir çalışmada, CST1 lumbrokinaz da lumbrokinaz PI239'da olduğu gibi *E. coli* BL21 (DE3) bakteri hücresinde inklüzyon cisimciği olarak ifade edilmiştir. SDS-PAGE ve Western Blot analizi sonucunda, rekombinant CST1'in moleküler kütesinin 25 kDa olduğu belirlenmiştir. Proteinin sadece %50'si geri kazanılmıştır. Nikel resin kullanılarak histidin etiketli rekombinant CST1 %95 oranında saflaştırılmıştır. Ayrıca fibrinolitik aktivite testlerinde rCST1, fibrini başarıyla çözebilmiştir. Bir lumbrokinaz standardının aktivitesi ile yapılan bir karşılaştırmaya dayanarak, rCST1'in antitrombotik aktivitesinin 912 IU/mg olduğu belirlenmiştir (88). Bu sonuçlar, rCST1'in etkili bir fibrinolitik ajan olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. *E. coli* ekspresyon sisteminin kullanım kolaylığı, hızlı büyüme, düşük maliyet ve yüksek verimde protein üretimi gibi avantajları olsa da sentez sonrası glikolizasyon, katlanma gibi post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştiremediği için, ökaryotik proteinler *E. coli*'de hücre içinde suda çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri olarak üretilirler. Bu yüzden bu tarz gereksinime sahip ökaryotik proteinlerin gerekli post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilen uygun ökaryotik organizmalarda sentezletirilmesi gerekmektedir. *E. coli*'nin bir diğer büyük dezavantajı, özellikle yüksek hücre yoğunluğunda; asetat birikimi toksik etki oluşturmaktadır. Ayrıca, *E. coli*'de üretilen rekombinant proteinlerin saflaştırılması ve yeniden katlanması için uygun bir renatürasyon sistemine ihtiyaç vardır.

Bir çalışmada *P. pastoris* X-33 maya hücresinde rekombinant lumbrokinaz EFE PM246'nın üretimi ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma prosedürü, *P. pastoris* X-33 tarafından salgılanan ürünleri saflaştırmak için kullanılan tekniklerin tipik özelliği olan üç aşamadan oluşmaktadır. Öncelikle rekombinant EFE PM246, başlangıçta (NH₄)₂SO₄ kullanılarak çöktürüldü ve ardından iki aşamalı kromatografi ile saflaştırıldı. Saflaştırılmış rekombinant EFE PM246'nın fibrinolitik aktivitesinin yaklaşık 2,4x10⁵ U/mg olduğu belirlenmiştir. SDS-PAGE ve Western Blot analizi sonucunda, rekombinant füzyon EFE PM246'nın moleküler kütesinin yaklaşık 38.61

kDa olduğu belirlenmiştir. Proteinin sadece %20'si geri kazanılmıştır (14). Başka bir çalışmada *P. pastoris* KM71 maya hücresinde rekombinant lumbrokinaz PI239'un üretimi ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış rekombinant PI239'un fibrinolitik aktivitesinin 200 mm² /10 ug protein olduğu belirlenmiştir. SDS-PAGE ve Western Blot analizi sonucunda, rekombinant PI239'un moleküler kütesinin yaklaşık 29 kDa olduğu belirlenmiştir. Üretilen rekombinant PI239'un moleküler kütesi, PI239 lumbrokinaz olgun peptidinin kendi moleküler kütesinden (239 amino asit) daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu farkın, rekombinant proteininin üretiminden sonraki translasyon sonrası meydana gelen glikozilasyondan kaynaklandığı düşünülmüştür (15). Yine başka bir çalışmada da *P. pastoris* GS115 maya hücresinde rekombinant lumbrokinaz F238'in klonlanması ve üretilmesi gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE ve Western Blot analizi sonucunda, rekombinant F238'in moleküler kütesinin yaklaşık 28 kDa olduğu belirlenmiştir. Süpernatantın fibrinolitik aktivitesi ise ekspresyonun indüklenmesinin ardından değerlendirildi. Ardından, yüksek aktiviteli bir mühendislik suşu keşfedildi ve fibrinolitik aktivitesi 100 U/mL'ye ulaştı (17). *P. pastoris* sistemi güçlü ve düzenlenebilir promotorları olması, yüksek seviyeli ekspresyon yeteneği, hücre dışına protein salgılama ve post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilir. Ancak, metanolü karbon ve enerji kaynağı olarak kullanması bu ekspresyon sisteminin gen ekspresyonunun aktivasyonu için metanol kullanılması güvenlik endişesi teşkil etmektedir. Ayrıca protein üretiminin verimi kullanılan promotora göre değişebilmektedir. Bu ekspresyon sisteminin en önemli dezavantajı da GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) dışı statüsünde olmasıdır.

Güçlü bir proteaz olan lumbrokinazı ne gastrointestinal sistemdeki enzimler ne de hücrel enzimler parçalayamaz ve bu da lumbrokinazın ekzositoz yoluyla hücre zarını sağlam bir şekilde geçerek bağırsak epiteli aracılığıyla kan dolaşımına girmesini sağlar (89). Dolayısıyla lumbrokinaz bağırsak sisteminde emilebildiği için, araştırmacılar oral yoldan uygulanabilmesi için lumbrokinazı keçi sütünde üretmiştir (20). Ancak verim sınırlıdır ve sütün işlenmesi lumbrokinazın aktivitesini yok edebilir.

Helianthus annuus bitkisinde yapılan bir çalışmada, transgenik ayçiçeği tohumunda rekombinant lumbrokinaz üretilmiştir. ELISA yöntemi ile protein miktarı tayini yapılmıştır. Pozitif lumbrokinaz kontrolünün (150 ng/100 µL) miktarına göre rekombinant lumbrokinaz miktarı yaklaşık 127,5 ng/100 µL ve rekombinant lumbrokinaz verimi ise yaklaşık 5.1 g/kg ayçekirdeği olarak hesaplanmıştır. Lumbrokinazın fibrinolitik aktivitesi de yaklaşık 4,150 ürokinaz U/mg protein olarak

belirlenmiştir. *In vivo* çalışmada, tohum taneleri ile oral yoldan beslenen farelerde anti-trombotik etki gözlemlenmiştir (21). *Nicotiana tabacum* bitkisinde yapılan bir çalışmada, tütün bitkisinin yapraklarında agroinfiltrasyon yöntemi ile rekombinant lumbrokinaz PI239 proteini çok yüksek düzeyde üretilmiştir. Ancak ekspresyondan üç gün sonra yapraklar dokularında nekroz oluşmaya başlamıştır. Kalan lumbrokinaz pI239 proteinleri Ni-NTA agaroz afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Rekombinant lumbrokinaz PI239'un çoğu, yaprakta oluşan nekrotik dokudan üretilen proteolitik elementler tarafından bozulmuştur. SDS-PAGE ve Western Blot analizi sonucunda, üretilen rekombinant PI239'un moleküler kütlesi yaklaşık 37 kDa olarak belirlenmiştir. Lumrokinaz PI239'un kendi moleküler kütlesinden (32 kDa) daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu farkın N-bağlı glikozilasyondan kaynaklandığı düşünülmüştür (22). Bitki ekspresyon sistemlerini protein üretimi için hızlı, ucuz ve yüksek verimliliğe sahip olmasının yanı sıra, genom entegrasyonu da kararlıdır. Ancak bitki ekspresyon sisteminin genetik mühendisliğinde kullanılması çeşitli dezavantajlara sahiptir. En önemli sınırlamalardan biri, yorucu ve steril protokoller gerektiren yavaş sürecidir. Ayrıca sistem, bitkide bilinmeyen genetik ifadelerle neden olabilecek gereksiz vektörler kullanır. Transformasyon verimliliği düşüktür ve sistem, DNA ve hücre hasarıyla sonuçlanabilecek sürekli optimizasyon gerektirir. Ayrıca, bazı hücre türleri, bazı *Agrobacterium* suşlarının neden olduğu enfeksiyona duyarlı değildir ve bu da önemli bir risk oluşturur. Son olarak, genin birden fazla kopyasının eklenmesi olasılığı vardır, bu da genetik mühendisliği sürecinin doğruluğunu tehlikeye atabilir. Bu ekspresyon sistemlerinin dezavantajlarından dolayı bu çalışmada, rekombinant proteinlerin endüstriyel olarak üretilmesinde sıklıkla kullanılan ve ayrıca GRAS statüsünde olduğu için daha güvenilir olan *A. oryzae* filamentli mantarı tercih edilmiştir. *Aspergillus* ekspresyon sistemlerinin farklı endüstrilerde yaygın olarak kullanılan çeşitli ticari enzimler ürettiği bilinmektedir. Yaygın olarak üretilen enzimlerden bazıları amilazlar, kimozen, glukoz oksidazlar, katalazlar, selülazlar, pektinazlar, lipazlar, proteazlar, fitazlar ve ksilanazlardır. Bu enzimler, diğerlerinin yanı sıra gıda, deterjan, tekstil, kağıt hamuru ve kağıt endüstrilerinde geniş bir uygulama alanına sahiptir (88). *Aspergillus* tarafından üretilen ticari enzimlerin kapsamlı listesi Enzim Ürünleri Üreticileri ve Formülatörleri Birliği (AMFEP) web sitesinde yer almaktadır.

Ökaryotik proteinler gibi antikorlara da yönelik yüksek talebin olması, maliyetleri düşürme ihtiyacıyla birleştiğinde, rekombinant antikorların üretimi için uygun bir

ifade platformunun belirlenmesi için önemli bir çabaya yol açmıştır. Yakın tarihli bir çalışmada araştırmacılar, *A. oryzae*'yi, spesifik olarak enflamatuvar sitokin olan insan TNF α 'ya bağlanan bir antikor (IgG) olan adalimumab üretmek için başarıyla kullanmışlardır (89). Adalimumab, romatoid artrit gibi kronik enflamatuvar hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır. Adalimumab üretimi, *A. oryzae* transformantlarının kültür süpernatantında başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve ticari muadili ile karşılaştırılabilir afiniteler ve biyoaktiviteler sağlamıştır.

A. oryzae'nin *glikolizasyon* ve katlanma gibi posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirebilmesi, kolay optimize edilebilmesi, hızlı büyümesi, GRAS statüsünde olduğu için güvenilir olması ve güçlü protein salgılama yeteneğine sahip olması onu homolog ve heterolog enzim üretimi için önemli bir kaynak yapmaktadır. Özellikle güçlü glikolizasyon yeteneği *Aspergillus* mantarlarını ökaryotik proteinlerin üretimi için uygun bir konakçı haline getirmektedir. Bu avantajları sayesinde de kısa sürede, güvenli ve yüksek verimde üretilebilmektedir. Ek olarak *Aspergillus*, çeşitli düşük maliyetli biyokütle hammaddeleri kullanarak hızla büyüyebilir ve çoğalabilir, bu da endüstriyel üretimin maliyetini önemli ölçüde azaltabilir.

Aspergillus sisteminin ökaryotik proteinlerin üretilmesindeki avantajlarının yanı sıra dezavantajları da bulunmaktadır. *Aspergillus*'ta heterolog ökaryotik proteinlerin üretimi tipik olarak endojen proteinlerinkinden daha az verimlidir. Buna rağmen, araştırmacılar, heterolog protein üretimi ile ilgili birçok engelin üstesinden gelmişlerdir. Etkili seleksiyon markörleri ve *A. oryzae* transformasyon stratejileri bu süreçteki en önemli faktörler arasındadır (90). Ek olarak, kültür ortamında salgılanan proteazların varlığı, proteolitik bozunmaya yol açabilir ve heterolog protein üretimini engelleyebilir. Bu sorunu ele almak için bilim insanları, heterolog proteinlerin verimini artıran çoklu proteaz gen bozucuları geliştirmişlerdir (91, 92). Otofaji genlerini bastırmanın ve vakuolar protein sıralamasının da *A. oryzae*'de heterolog protein üretimini önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir. Bir hedef proteinin endojen taşıyıcı proteinlerle genetik füzyonu, verimi artırmaya yönelik bir başka başarılı yaklaşım olmuştur (93). Transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası işlemlerde, verimi artırmak için heterolog füzyon protein tekniği kullanılabilir. Son zamanlarda araştırmacılar, füzyon proteinleri kullanarak endoplazmik retikulum-golgi kargo reseptörlerini modüle ederek heterolog protein ekspresyonunu artırmak için yeni bir yaklaşım geliştirmişlerdir (94). Taşıyıcı ile kaynaşmış heterolog proteinlerin sekresyonu, lektin tipi kargo reseptörlerinden etkilenebilir ve böylece heterolog

protein üretimini geliştirebilir. Son araştırmalar, çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılan bir mantar olan *A. oryzae*'nin endojen protein genlerine eksojen protein genlerinin dahil edilmesinin, *A. oryzae*'nin proteazı tarafından heterolog proteinlerin bozunmasını sınırlayabileceğini göstermektedir (95). Bir alışmada, CHY olarak adlandırılan bir raportör heterolog protein, nişasta kaynaklı kùltür koşulları altında *A. oryzae*'de en fazla eksprese edilen proteinlerden biri olan kaynaşmış a-amilaz (AmyB) ile eksprese edildiğinde, üretim seviyesi, taşıyıcı olmayana kıyasla yaklaşık iki kat artmıştır (95). Başka bir çalışma, taşıyıcı protein olarak *A. oryzae* glukoamilaz geninin (*glaA*) kullanılmasının, taşıyıcıyla kaynaşmış rekombinant kimozinin yüksek seviyede salgılandığını ve tek başına *glaA* promotörünü kullanan kontrole kıyasla beş kat daha yüksek kimozin üretim seviyesi gösterdiğini kanıtlamıştır (96). Ayrıca, bir kene alerjisi olan Der f 7 geni, *A. oryzae* glukoamilaz taşıyıcı protein ile füzyon yoluyla yüksek oranda eksprese edilmiştir ve ekspresyon seviyesi, aynı zamanda heterolog proteinlerin üretim seviyelerini iyileştirmek için etkili bir yöntem olan kodon optimizasyonu ile daha da geliştirilmiştir (97, 98). Dolayısıyla bu tez çalışmasında rekombinant ökaryotik protein üretiminin ve veriminin artırılması için *A. oryzae* RIB40'a kodon optimizasyonu sağlanmış ve TAKA-Amilaz ile füzyon yapılmış fibrinolitik enzim lumbrokinaz PI239'un *A. oryzae*'de üretimi ve saflaştırılması başarıyla gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan proteinin varlığı SDS-PAGE ve Western Blot yöntemi ile ispatlandıktan sonra, tampon değişim yöntemi uygulanarak imidazolden arındırılmıştır. Bradford yöntemi kullanılarak proteinin konsantrasyonu 87 µg/mL olarak saptanmıştır. Titanyumla hazırlanmış T-PRF ve L-PRF pıhtıları ile farklı konsantrasyonlarda muamele edilen enzimin, 150.saatte tüm tüplerdeki pıhtıları tamamen çözerek biyoaktif özellikte bir enzim olduğu kanıtlanmıştır. Bu deneyin en çarpıcı sonucu ise en düşük konsantrasyonda eklenen enzimin fibrin pıhtısını diğer yüksek konsantrasyondakilere oranla daha hızlı çözmüş olmasıdır. Bu sonuç, enzimin daha az kullanılarak maliyetleri düşürebileceğini kanıtlamaktadır. Ek olarak, Protrombin Testi (PT) yapılarak enzimin pıhtılaşma süresindeki etkisine bakılmıştır ve pıhtılaşma süresi kontrol grubuna kıyasla 5 sn daha geç gerçekleşmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akut tromboembolik hastalıkların tedavisinde fibrinolitik ilaçların kullanımı, uzun yıllardır bir hayat kurtarıcı tedavi seçeneği olarak görülmektedir. Ancak, mevcut fibrinolitik ilaçlar kanama yan etkileri ile ilişkilendirildiği için pıhtı erimesini sağlamada sınırlamaları vardır ve bu da yüksek oranda morbidite ve mortalite riski taşır. Bu nedenle, terapötik pencere ve hasta seçimi gibi dar uygunluk kriterleri içeren kısıtlamalar, bu ilaçların uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, araştırmalar yeni fibrinolitik ilaçların geliştirilmesine ve bunların inme, miyokard enfarktüsü ve pulmoner emboli gibi tromboembolik olaylar ile ilişkili komplikasyonları tedavi etmek için en verimli kullanımına odaklanmıştır. Son araştırmalar, trombolitik enzimlerin mikrobiyal kaynaklardan daha fazla keşfedildiğini göstermektedir. Bu gelişmelere rağmen, kanama gibi ciddi yan etkileri olmayan, bolus şeklinde uygulanabilen ve düşük üretim maliyetine sahip trombolitik enzimler hala araştırılmaya devam edilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi, genetik manipülasyonda, trombolitik enzimlerin dolaşım süresini iyileştirmek ve sistemik kanama olmaksızın geliştirmek için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Klonlama ve ekspresyon yapılarak, iyileştirilmiş özelliklere sahip kimerik enzimler (füzyon proteinleri) elde edilebilir. *A. oryzae*, gıda, veterinerlik ve ilaç endüstrilerindeki çeşitli uygulamaları nedeniyle büyük ilgi gören güçlü bir biyoteknolojik araç olarak kabul edilir. *A. oryzae*'nin fonksiyonel genomu için kullanılan yeni stratejilerin keşfedilmesi ve mevcut stratejilerin optimize edilmesi, endüstriyel üretim için *A. oryzae*'den maksimum fayda sağlayabilir.

Lumbrokinaz PI239, solucan *Lumbricus bimastus*'tan izole edilen ve Asya'da uzun yıllardır gıda takviyesi olarak kullanılan fibrinolitik bir enzimdir ve neredeyse hiç yan etkisi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, rekombinant ökaryotik protein üretiminin veriminin artırılması için öncelikle *A. oryzae* RIB40'a kodon optimizasyon yapıldı ve sonra, TAKA-Amilaz ile füzyon yapılan lumbrokinaz PI239 proteininin üretimi gerçekleştirildi. Üretimden sonra IMAC metodu ile saflaştırılan proteinin varlığı SDS-

PAGE ve Western Blot yöntemi ile ispatlandı. Saflaştırılan protein tampon değişim yöntemi uygulanarak imidazolden arındırıldı ve proteinin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile 87 µg/mL olarak saptandı. Daha sonra titanyumla hazırlanmış trombosit zengin fibrin (T-PRF) ve lökosit zengin fibrin (L-PRF) pıhtıları fibrinolitik lumbrokinaz enzimi ile muamele edilerek oda sıcaklığında 7 gün boyunca gelişim süreci takip edildi. İlk olarak 100 µl, ardından sırayla 250 µl ve 500 µl enzim bulunan tüpteki fibrin pıhtısı çözüldü. Sonuç olarak 150. saatte kontrol grubu hariç tüm fibrin pıhtıları tamamen çözünerek enzimin pıhtı çözme potansiyeli başarıyla kanıtlanmış oldu. Bu deneyin en çarpıcı sonucu ise en düşük konsantrasyonda eklenen enzimin fibrin pıhtısını diğer konsantrasyondakilere oranla daha hızlı çözmüş olmasıdır. Ek olarak, Protrombin Testi (PT) yapılarak enzimin pıhtılaşma süresine etkisine bakıldı ve pıhtılaşma süresi kontrol grubuna kıyasla 5 sn daha geç gerçekleşti.

Yapılan çalışmalar sonucunda proteinin moleküler ağırlığı beklenenden düşük seviyede saptanmıştır. Lumbrokinaz PI239 enzimi, 18 tane asparagin ve 11 tane sistein içermektedir. Bundan dolayı ileriki çalışmalarda, Edman degradasyon yöntemi ile protein dizilemesi yapılarak enzimin aktivitesine bakılabilir. Ek olarak, bu füzyon proteini TEV proteaz ile kesim yapılabilir. Ayrıca üretim seviyesini ve verimini daha fazla arttırmak için de ileriki çalışmalarda fermentör de kullanılabilir.

Bu rekombinant fibrinolitik proteinin terapötik özelliklerinden yararlanarak, GRAS statüsünde olan ve endüstriyel üretimde kullanılan *A.oryzae*'nin rekombinant protein üretim çalışmalarındaki kullanımını artırılabilir ve araştırmacıların in vivo ve in vitro çalışmalara yönelimi artabilir. Ayrıca, bu ürün piyasasındaki talebi karşılayabilir ve rekombinant protein üretim maliyetini azaltabilir. Aspergillus türleri, rekombinant proteinler için en verimli üretim sistemi yarışına dahil olabilir ve biyoaktif bileşikler, organik asitler, peptitler ve enzimler için büyük ölçekli bir üretim platformu oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Ueshima, S., & Matsuo, O. (2006). Development of new fibrinolytic agents. *Current pharmaceutical design*, 12(7), 849-857.
- [2] Vulliamy, P., Jacob, S., & Davenport, R. A. (2020). Acute aorto-iliac and mesenteric arterial thromboses as presenting features of COVID-19. *British journal of haematology*, 189(6), 1053.
- [3] Xu, X., Chang, X. N., Pan, H. X., Su, H., Huang, B., Yang, M., ... & Nie, X. (2020). Pathological changes of the spleen in ten patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) by postmortem needle autopsy. *Zhonghua bing li xue za zhi= Chinese journal of pathology*, 49(6), 576-582.
- [4] Klok, F. A., Kruip, M. J. H. A., Van der Meer, N. J. M., Arbous, M. S., Gommers, D. A. M. P. J., Kant, K. M., ... & Endeman, H. (2020). Confirmation of the high cumulative incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19: an updated analysis. *Thrombosis research*, 191, 148-150.
- [5] ZOGHİ, M. (2000). Akut Miyokard İnfarktüsü ve Trombolitik Tedavi. *Yoğun Bakım Hemşireliği Dergisi*, 4(1), 29-34.
- [6] Mihara, H., Sumi, H., Akazawa, K., Yoneda, T., & Mizumoto, H. (1983, January). Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm. *In Thrombosis and Haemostasis* (Vol. 50, No. 1, pp. 258-258).
- [7] Zhou, Y. C., Zhou, H., & Chen, Y. C. (1988). Purification and biochemical characterization of the fibrinolytic enzymes from the earthworm *Eisenia fetida*. *Acta Biochem. Biophys. Sinica (in Chinese)*, 20, 35-42.
- [8] Pan, R., Zhang, Z. J., & He, R. Q. (2010). Earthworm protease. *Applied and Environmental Soil Science*, 2010. Nakajima, N., Mihara, H., & Sumi, H. (1993). Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(10), 1726-1730.
- [9] Yihui, X., Guodong, L., Zhaojun, S., Fei, C., Shihong, F., Yubo, C., & Yunde, H. (2002). Cloning and expression of the novel gene--PV_ (242) of earthworm fibrinolytic enzyme. *Sheng wu hua xue yu Sheng wu wu li jin Zhan*, 29(4), 610-614.
- [10] Xu, Z. R., Yang, Y. M., Gui, Q. F., Zhang, L. N., & Hu, L. (2010). Expression, purification, and characterization of recombinant lumbrokinase PI239 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 69(2), 198-203.
- [11] Li, D. H., Tong, W., & Yang, Y. F. (2008). Functional expression of an earthworm fibrinolytic enzyme in *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 613-618.
- [12] Cho, I. H., Choi, E. S., & Lee, H. H. (2004). Molecular cloning, sequencing, and expression of a fibrinolytic serine-protease gene from the earthworm *Lumbricus rubellus*. *BMB Reports*, 37(5), 574-581.
- [13] Dong, G. Q., Yuan, X. L., Shan, Y. J., Zhao, Z. H., Chen, J. P., & Cong, Y. W. (2004). Molecular cloning and characterization of cDNA encoding fibrinolytic

enzyme-3 from earthworm *Eisenia foetida*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 36(4), 303-308.

[14] **Hu, Y., Meng, X. L., Xu, J. P., Lu, W., & Wang, J.** (2005). Cloning and expression of earthworm fibrinolytic enzyme PM246 in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 43(1), 18-25.

[15] **Ge, T., Sun, Z. J., Fu, S. H., & Liang, G. D.** (2005). Cloning of thrombolytic enzyme (lumbrokinase) from earthworm and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 42(1), 20-28.

[16] **Sugimoto, M., & Nakajima, N.** (2001). Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA encoding serine protease with fibrinolytic activity from earthworm. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(7), 1575-1580.

[17] **Zhao, M. M., Li, M., Han, Z. L., Wang, M., & Du, L. X.** (2006). Cloning and expression of lumbrokinase gene in *Pichia pastoris*. *Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica*, 46(4), 581-585.

[18] **Yuan, X., Cao, C., Shan, Y., Zhao, Z., Chen, J., & Cong, Y.** (2006). Expression and characterization of earthworm *Eisenia foetida* Lumbrokinase-3 in *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 36(03), 273-279.

[19] **Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M.** (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 22(4), 249-270.

[20] **Hu, R., Zhang, S., Liang, H., Li, N., & Tu, C.** (2004). Codon optimization, expression, and characterization of recombinant lumbrokinase in goat milk. *Protein expression and purification*, 37(1), 83-88.

[21] **Guan, C., Du, X., Wang, G., Ji, J., Jin, C., & Li, X.** (2014). Expression of biologically active anti-thrombosis protein lumbrokinase in edible sunflower seed kernel. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23, 257-265.

[22] **Dickey, A., Wang, N., Cooper, E., Tull, L., Breedlove, D., Mason, H., ... & Wang, K. Y.** (2017). Transient expression of lumbrokinase (PI239) in tobacco (*Nicotiana tabacum*) using a geminivirus-based single replicon system dissolves fibrin and blood clots. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.

[23] **Maras, M., Die, I. V., Contreras, R., & van den Hondel, C. A.** (1999). Filamentous fungi as production organisms for glycoproteins of bio-medical interest. *Glycotechnology*, 19-27.

[24] **Kitagaki, H.** (2021). Medical application of substances derived from non-pathogenic fungi *Aspergillus oryzae* and *A. luchuensis*-containing Koji. *Journal of Fungi*, 7(4), 243.

[25] **Tanaka, M., & Gomi, K.** (2021). Induction and repression of hydrolase genes in *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in microbiology*, 12, 1237.

[26] **Chakraborty, B. N., Patterson, N. A., & Kapoor, M.** (1991). An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. *Canadian journal of microbiology*, 37(11), 858-863.

[27] **Sun, Y., Niu, Y., He, B., Ma, L., Li, G., Tran, V. T., ... & Hu, Z.** (2019). A dual selection marker transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* for the industrial *Aspergillus oryzae* 3.042. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 29:230-234.

[28] **Chang, J. C.** (2022). Novel Classification of Thrombotic Disorders Based on Molecular Hemostasis and Thrombogenesis Producing Primary and Secondary Phenotypes of Thrombosis. *Biomedicines*, 10(11), 2706.

[29] **Koupenova, M., Kehrel, B. E., Corkrey, H. A., & Freedman, J. E.** (2017). Thrombosis and platelets: an update. *European heart journal*, 38(11), 785-791.

- [30] **Mackman, N.** (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451(7181), 914-918.
- [31] **Wolberg, A. S., Rosendaal, F. R., Weitz, J. I., Jaffer, I. H., Agnelli, G., Baglin, T., & Mackman, N.** (2015). Venous thrombosis. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-17.
- [32] **Previtali, E., Bucciarelli, P., Passamonti, S. M., & Martinelli, I.** (2011). Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood transfusion*, 9(2), 120.
- [33] **Chang, J. C.** (2022). Novel Classification of Thrombotic Disorders Based on Molecular Hemostasis and Thrombogenesis Producing Primary and Secondary Phenotypes of Thrombosis. *Biomedicines*, 10(11), 2706.
- [34] **Robetorye, R. S., & Rodgers, G. M.** (2001). Update on selected inherited venous thrombotic disorders. *American journal of hematology*, 68(4), 256-268.
- [35] **Beyan C.** (2005). Trombofilili hastada tanısal yaklaşım. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 1:71–81.
- [36] **Press, R., & DeLoughery, T.** (2000). Thrombotic Risk Assessment. *Clinical Laboratory News*, 8-12.
- [37] **Meinardi, J. R., Middeldorp, S., de Kam, P. J., Koopman, M. M., van Pampus, E. C., Hamulyák, K., ... & van der Meer, J.** (1999). Increased risk for fetal loss in carriers of the factor V Leiden mutation. *Annals of internal medicine*, 130(9), 736-739.
- [38] **Campello, E., Spiezia, L., & Simioni, P.** (2016). Diagnosis and management of factor V Leiden. *Expert review of hematology*, 9(12), 1139-1149.
- [39] **Atahan, E.** (2009). Venous thromboembolism and inherited thrombophilia. *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 17(4).
- [40] **Perry, D. J.** (1994). Antithrombin and its inherited deficiencies. *Blood reviews*, 8(1), 37-55.
- [41] **Cinemre, H., & Yıldız, Ö.** (2004). Antifosfolipid Antikor Sendromu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 39-47.
- [42] **Saidi, R. F., Leduc, M., Lee, H., Anwar, N., Shah, S., Jabbour, N., & Bozorgzadeh, A.** (2012). A Case of Idiopathic Non-Cirrhotic Portal Hypertension. *J Liver*, 1(104), 2167-0889.
- [43] **Ross, R.** (1990). Mechanisms of atherosclerosis--a review. *Advances in nephrology from the Necker Hospital*, 19, 79-86.
- [44] **Libby, P.** (1998). The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms. *Vascular medicine*, 3(3), 225-229.
- [45] **Feske, S. K.** (2021). Ischemic stroke. *The American journal of medicine*, 134(12), 1457-1464.
- [46] **Agnelli, G., & Becattini, C.** (2010). Acute pulmonary embolism. *New England Journal of Medicine*, 363(3), 266-274.
- [47] **Scarvelis, D., & Wells, P. S.** (2006). Diagnosis and treatment of deep-vein thrombosis. *Cmaj*, 175(9), 1087-1092.
- [48] **Kyrle, P. A., & Eichinger, S.** (2005). Deep vein thrombosis. *The Lancet*, 365(9465), 1163-1174.
- [49] **Wolberg, A. S., Rosendaal, F. R., Weitz, J. I., Jaffer, I. H., Agnelli, G., Baglin, T., & Mackman, N.** (2015). Venous thrombosis. *Nature reviews Disease primers*, 1(1), 1-17.
- [50] **e Silva, P. E. D. C., Bezerra, R. P., & Porto, A. L. F.** (2016). An overview about fibrinolytic enzymes from microorganisms and algae: production and characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4(1), 1.

- [51] **Karaalp, A.** (2005). Thrombolytic (Fibrinolytic) Drugs. *Turkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 1;(26), 35-41.
- [52] **Wang, K. Y., Tull, L., Cooper, E., Wang, N., & Liu, D.** (2013). Recombinant protein production of earthworm lumbrokinase for potential antithrombotic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- [53] **Vernooij, M. W., Haag, M. D., van der Lugt, A., Hofman, A., Krestin, G. P., Stricker, B. H., & Breteler, M. M.** (2009). Use of antithrombotic drugs and the presence of cerebral microbleeds: the Rotterdam Scan Study. *Archives of neurology*, 66(6), 714-720.
- [54] **Delaney, J. A., Opatrny, L., Brophy, J. M., & Suissa, S.** (2007). Drug–drug interactions between antithrombotic medications and the risk of gastrointestinal bleeding. *Cmaj*, 177(4), 347-351.
- [55] **Ge, T., Fu, S. H., Xu, L. H., Tang, Q., Wang, H. Y., Guan, K. P., & Liang, G. D.** (2007). High density fermentation and activity of a recombinant lumbrokinase (PI239) from *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 52(1), 1-7.
- [56] **Kotb, E., & Kotb, E.** (2012). *Fibrinolytic bacterial enzymes with thrombolytic activity* (pp. 1-74). Springer Berlin Heidelberg.
- [57] **Pan, R., Zhang, Z. J., & He, R. Q.** (2010). Earthworm protease. *Applied and Environmental Soil Science*, 2010.
- [58] **Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M., & Maruyama, M.** (1991). A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *The Japanese journal of physiology*, 41(3), 461-472.
- [59] **Jin, L., Jin, H., Zhang, G., & Xu, G.** (2000). Changes in coagulation and tissue plasminogen activator after the treatment of cerebral infarction with lumbrokinase. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 23(4), 213-218.
- [60] **Tanaka, M., & Gomi, K.** (2021). Induction and repression of hydrolase genes in *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in microbiology*, 12, 1237
- [61] **Meyer, V., Andersen, M. R., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Caddick, M. X., Cairns, T. C., ... & Head, R. M.** (2016). Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal biology and biotechnology*, 3(1), 1-17.
- [62] **Fleißner, A., & Dersch, P.** (2010). Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(4), 1255-1270.
- [63] **Ntana, F., Mortensen, U. H., Sarazin, C., & Figge, R.** (2020). *Aspergillus*: A powerful protein production platform. *Catalysts*, 10(9), 1064.
- [64] **Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., ... & Kikuchi, H.** (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1157-1161.
- [65] **Watarai, N., Yamamoto, N., Sawada, K., & Yamada, T.** (2019). Evolution of *Aspergillus oryzae* before and after domestication inferred by large-scale comparative genomic analysis. *DNA Research*, 26(6), 465-472.
- [66] **Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H. P., & Diderichsen, B.** (1992). On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 36, 569-572.
- [67] **Gomi, K.** (2019). Regulatory mechanisms for amylolytic gene expression in the koji mold *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(8), 1385-1401.
- [68] **He, B., Tu, Y., Jiang, C., Zhang, Z., Li, Y., & Zeng, B.** (2019). Functional genomics of *Aspergillus oryzae*: Strategies and progress. *Microorganisms*, 7(4), 103.

- [69] Lee, K., Lee, S. K., & Lee, B. D. (2006). *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry-A review. *International Journal of Poultry Science*, 5(1), 1-3.
- [70] Kim, S. H., Yu, D. J., Lee, S. J., Park, S. Y., Ryu, K. S., & Lee, D. G. (2003). Effects of feeding *Aspergillus oryzae* ferments on performance, intestinal microflora, blood serum components and environmental factors in broiler. *Korean Journal of Poultry Science*.
- [71] Dawood, M. A., Eweedah, N. M., Khalafalla, M. M., & Khalid, A. (2020). Evaluation of fermented date palm seed meal with *Aspergillus oryzae* on the growth, digestion capacity and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Nutrition*, 26(3), 828-841.
- [72] Hajjaj, H., Duboc, P., Fay, L. B., Zbinden, I., Macé, K., & Niederberger, P. (2005). *Aspergillus oryzae* produces compounds inhibiting cholesterol biosynthesis downstream of dihydrolanosterol. *FEMS Microbiology Letters*, 242(1), 155-159.
- [73] Ogawa, M., Tokuoka, M., Jin, F. J., Takahashi, T., & Koyama, Y. (2010). Genetic analysis of conidiation regulatory pathways in koji-mold *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(1), 10-18.
- [74] Gomi, K. (2014). *Aspergillus oryzae*. *Encyclopedia of food microbiology*, 92-96.
- [75] Nguyen, C. H., Tsurumizu, R., Sato, T., & Takeuchi, M. (2005). Takamylase A in the conidia of *Aspergillus oryzae* RIB40. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 69(11), 2035-2041.
- [76] Zhu, L., Maruyama, J. I., & Kitamoto, K. (2013). Further enhanced production of heterologous proteins by double-gene disruption (Δ AosedD Δ Aovps10) in a hyper-producing mutant of *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 6347-6357.
- [77] Yoon, J., Maruyama, J. I., & Kitamoto, K. (2011). Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 747-759.
- [78] Jiang, D., Zhu, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K. Q., & Yang, J. (2013). Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. *Biotechnology advances*, 31(8), 1562-1574.
- [79] Wang, S., Chen, H., Tang, X., Zhang, H., Chen, W., & Chen, Y. Q. (2017). Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 8063-8075.
- [80] Kück, U., & Hoff, B. (2010). New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 51-62.
- [81] Nguyen, K. T., Ho, Q. N., Pham, T. H., Phan, T. N., & Tran, V. T. (2016). The construction and use of versatile binary vectors carrying pyrG auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-9.
- [82] Hane, J. K., Williams, A. H., Taranto, A. P., Solomon, P. S., Oliver, R. P., van den Berg, M. A., & Maruthachalam, K. (2015). Genetic transformation systems in fungi. *Fungal Biol*, 2, 55-68.
- [83] Singh, R. K., & Prasad, M. (2016). Advances in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of graminaceous crops. *Protoplasma*, 253, 691-707.
- [84] Wang, D., He, D., Li, G., Gao, S., Lv, H., Shan, Q., & Wang, L. (2014). An efficient tool for random insertional mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*. *Journal of Microbiological Methods*, 98, 114-118.

- [85] Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Meglič, S. H., Peterka, M., & Miklavčič, D. (2015). Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 33(8), 480-488.
- [86] Zhong, Y., Lu, X., Xing, L., Ho, S. W. A., & Kwan, H. S. (2018). Genomic and transcriptomic comparison of *Aspergillus oryzae* strains: a case study in soy sauce koji fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 45(9), 839-853.
- [87] Park, Y., Ryu, E., Kim, H., Jeong, J., Kim, J., Shim, J., ... & Min, B. (1999). Characterization of antithrombotic activity of lumbrokinase-immobilized polyurethane valves in the total artificial heart. *Artificial organs*, 23(2), 210-214.
- [88] Fan, Q., Wu, C., Li, L., Fan, R., Wu, C., Hou, Q., & He, R. (2001). Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1526(3), 286-292.
- [89] Nguyen, K. T., Ho, Q. N., Do, L. T. B. X., Mai, L. T. D., Pham, D. N., Tran, H. T. T., ... & Tran, V. T. (2017). A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-11.
- [90] Huynh, H. H., Morita, N., Sakamoto, T., Katayama, T., Miyakawa, T., Tanokura, M., ... & Maruyama, J. I. (2020). Functional production of human antibody by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 7(1), 1-15.
- [91] Yokota, J. I., Shiro, D., Tanaka, M., Onozaki, Y., Mizutani, O., Kakizono, D., ... & Shintani, T. (2017). Cellular responses to the expression of unstable secretory proteins in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 2437-2446.
- [92] Yoon, J., Maruyama, J. I., & Kitamoto, K. (2011). Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves production of heterologous proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 747-759.
- [93] Hoang, H. D., Maruyama, J. I., & Kitamoto, K. (2015). Modulating endoplasmic reticulum-Golgi cargo receptors for improving secretion of carrier-fused heterologous proteins in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 533-543.
- [94] Yoon, J., Aishan, T., Maruyama, J. I., & Kitamoto, K. (2010). Enhanced production and secretion of heterologous proteins by the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* via disruption of vacuolar protein sorting receptor gene *Aovps10*. *Applied and environmental microbiology*, 76(17), 5718-5727.
- [95] Ohno, A., Maruyama, J. I., Nemoto, T., Arioka, M., & Kitamoto, K. (2011). A carrier fusion significantly induces unfolded protein response in heterologous protein production by *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 92, 1197-1206.
- [96] Tsuchiya, K., Nagashima, T., Yamamoto, Y., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., & Tamura, G. (1994). High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase-prochymosin fusion gene in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(5), 895-899.
- [97] Tanaka, M., Tokuoka, M., Shintani, T., & Gomi, K. (2012). Transcripts of a heterologous gene encoding mite allergen Der f 7 are stabilized by codon optimization in *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 1275-1282.

[98] Tokuoka, M., Tanaka, M., Ono, K., Takagi, S., Shintani, T., & Gomi, K. (2008). Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Applied and environmental microbiology*, 74(21), 6538-6546.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gamze BEK

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2020, Üsküdar Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
- **Yüksek lisans** : 2023, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2021-2023 TÜBİTAK 1004 Proje Araştırmacı Bursiyeri / Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü / Biyoteknoloji Anabilim Dalı

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

- 9.Uluslararası 19 MAYIS Yenilikçi Bilimsel Yaklaşımlar Kongresi (17-19 Mayıs 2023) / Sözlü bildiri sunumu / Fibrinolitik Lumbrokinaz Enziminin Filamentli Mantar *Aspergillus oryzae*'de Üretimi ve Saflaştırılması