



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSALAT DEKARBOKSİLAZ ENZİMİNİN
REKOMBİNANT DNA
TEKNOLOJİSİ ile ÜRETİMİ ve KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ersin KARATAŞ
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT

İSTANBUL – 2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMIALEM VAKIF UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

**CHARACTERIZATION and PRODUCTION via RECOMBINANT
DNA TECHNOLOGY of OXALATE DECARBOXYLASE
ENZYME**

MASTER THESIS

Ersin KARATAŞ
Department of Biotechnology

SUPERVISOR
Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT

ISTANBUL – 2015

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OKSALAT DEKARBOKSİLAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ
İLE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT

İstanbul, Haziran 2015

Tez Onay Formu

Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program Seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()

Anabilim Dalı : Biyoteknoloji

Tez Sahibi : Ersin KARATAŞ

Tez Başlığı : OKSALAT DEKARBOKSİLAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT DNA
TEKNOLOJİSİ İLE ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

İmza

Jüri Başkanı :

Üye :

Üye :

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıda belirtilen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa TAŞDEMİR

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Thesis Approval Form

Institute : Bezmialem Vakif University, Institute of Health Sciences

Level of Programme : Master (x) Doctorate ()

Department : Biotechnology

Student : Ersin KARATAŞ

Title of the Thesis : CHARECTERIZATION and PRODUCTION via RECOMBINANT
DNA TECHNOLOGY of OXALATE DECARBOXYLASE ENZYME

Signature

President of Jury :

Member :

Member :

This thesis was approved by the jury stated above in accordance with the related rules of the Postgraduate Education and Training Guide of Bezmialem Vakif University, and approved by Administrative Board with the decision dated -----/-----/----- and numbered -----/-----.

Assoc. Prof. Mustafa TAŞDEMİR.

Director of Institute of Health Sciences

Beyan Formu

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

İmza :

İsim ve Soyisim : Ersin KARATAŞ

Tarih :

TEŞEKKÜRLER

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e ve gerek maddi gerekse manevi her koşulda destek olan Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORI'ye sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca gerek deney aşamaları gerekse fikri yönden desteklerinden dolayı Doç. Dr. Şahbetin SELEK ve Yrd. Doç. İsmail KOYUNCU'ya ayrıca her konuda yardımcı olan aileme ve eşim Miray KARATAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.



ÖZET

KARATAŞ E. (2015) Oksalat Dekarboksilaz Enziminin Rekombinant Dna Teknolojisi İle Üretimi Ve Karakterizasyonu

Oksalat taşları üriner sistemde biriken kalsiyum ve oksalik asidin oluşturduğu yapılardır. Oksalat taşları ileri zamanlarda böbrek taşı oluşturur ve erken tanısı için idrar oksalat seviyelerinin ölçülmesi önemlidir. Ülkemizde ve dünyada oksalat seviyeleri oksalat oksidaz ve oksalat dekarboksilaz olmak üzere iki farklı yöntem ile ölçülmektedir. Oksalat oksidaz yönteminde Oksalattan H_2O_2 ve CO_2 açığa çıkarken, Oksalat dekarboksilaz yönteminde reaksiyon sonunda oluşan format'ın format dehidrogenaz enzimiyle parçalandığında açığa çıkan $NADH^+$ 'nın spektrofotometrik yöntemle ölçülmesiyle oksalat miktarı tayin edilebilmektedir. Bu çalışmada, oksalat dekarboksilaz enziminin rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi hedeflenmiştir. Böylece elde edilen rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi ticari olarak satılan format dehidrogenaz enzimi ile birlikte kullanılarak oksalat tayininde kullanılacak bir ölçüm metodunun geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bunun için *Basillus subtilis* M168 suşundan elde edilen yvrK geni pET SUMO TA Cloning® vektör sistemi ile One Shot® Mach1™-T1R *Escherichia coli* ve BL21(DE3) One Shot® *Escherichia coli* mikroorganizmalarına aktarılarak klonlama ve protein ifadesi işlemleri yapılmıştır. Böylelikle elde edilen 6xHis-SUMO-yvrK füzyon proteini başarılı bir şekilde üretilmiştir. Gerekli kofaktör, optimum pH ve sıcaklık sağlanıp karakterizasyonu ve enzim aktivitesi belirtilmiştir. Ayrıca ticari olarak temin edilen Format dehidrogenaz enzimi de kullanılarak idrarda oksalat miktarını ölçmekte kullanılabilecek enzimatik aktivitesi yüksek bir oksalat ölçüm metodu geliştirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER : Oksalat dekarboksilaz, Rekombinant DNA, pET-SUMO, yvrK

ABSTRACT

KARATAŞ E. (2015) Characterization and Production via Recombinant DNA Technology of Oxalate Decarboxylase Enzyme

Oxalate stones are calcium and oxalic acid formed structures that accumulate in urinary system which result in oxalate stone accumulate and kidney stones. Early diagnosis of kidney stones requires measurement of uriner oxalate stone level. Currently there are two different method for measuring oxalate level namely oxalate oxidase and oxalate decarboxylase assay. While, in oxalate method the H_2O_2 and CO_2 produced by oxalate is being measured, oxalate decarboxylase method reveals $NADH^+$ level released from digestion of formate by formate dehydrogenase enzyme so that the level of oxalate stones can be determine. In this study it has been aimed to produce oxalate decarboxylase enzyme by recombinant DNA technology. This produced recombinant oxalate decarboxylase enzyme can be used with commercially available formate dehydrogenase enzyme for measuring oxalate stones as a new method. For this purpose the *yvrK* gene from *Basillus subtilis* M168 strain cloned and expressed in One Shot® Mach1™-T1R *Escherichia coli* and BL21 (DE3) One Shot® *Escherichia coli* microorganism via pET-SUMO TA Cloning vector system. Thus 6xHis-SUMO-*yvrK* fussion protein was produced successfully. Requisite cofactor, optimum pH and temperature were provided and characterization was specified. In this way recombinant oxalate decarboxylase enzyme can easily produced and, a method by higher enzymatic activity has been developed to measure oxalate level.

KEY WORDS : Oxalate decarboxylase, Recombinant DNA, pET-SUMO, *yvrK*

İÇİNDEKİLER

KAPAK	I
İÇ KAPAK	II
ONAY SAYFASI	III
BEYAN SAYFASI	IV
TEŞEKKÜRLER	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	XI
İÇİNDEKİLER	1
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	4
ŞEKİLLER DİZİNİ	4
TABLolar DİZİNİ	5
1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Oksalat Metabolizması	6
2.1.1. Oksalik asit metabolizması	7
2.2. Oksalata Bağlı Hastalıklar	7
2.2.1. Besinsel hiperoksaluriler	7
2.2.2. Piridoksin eksikliğine bağlı hiperoksalüri	9
2.2.3. Primer hiperoksalüri ve oksalosis	10
2.3. Oksalat Ölçüm Yöntemleri	11
2.4. Oksalat Oksidaz	12
2.5. Oksalat Dekarboksilaz	12
2.6. Format Dehidrogenaz	12
2.7. Protein Saflaştırma Yöntemleri	12
2.7.1. Elektroforetik yöntemler	12
<i>Elektroforez</i>	12
<i>İzoelektrik fokuslama</i>	13
2.7.2. Diyaliz ve ultrafiltrasyon	13
2.7.3. Santrifügasyon yöntemleri	13
<i>Densiti zonal santrifügasyon</i>	13
<i>Differansiyel santrifügasyon</i>	14
2.7.4. Kromotografik yöntemler	14

<i>Jel filtrasyonu</i>	14
<i>İyon değiştirici kromatografisi</i>	14
<i>Affinite kromatografisi</i>	15
2.8. Rekombinant DNA Teknolojisi	16
2.8.1. Polimer zincir reaksiyonu (PZR)	16
2.8.2. Vektörler	17
2.8.3. Gen klonlama	18
<i>T/A klonlama</i>	19
<i>Yapışkan uç oluşturarak klonlama</i>	19
<i>Küt uç oluşturarak klonlama</i>	19
<i>Restrüksiyon kesim enzimleri</i>	20
<i>Ligasyon</i>	21
<i>Transformasyon</i>	22
<i>Kolonilerin seçimi</i>	22
2.8.4. Gen ifadesi ve protein biyosentezi	22
<i>Gen ifadesinin düzenlenmesi</i>	23
<i>Protein biyosentezi</i>	25
2.8.5. Rekombinant DNA teknolojisi ile enzim üretimi	27
2.9. Oksalat Dekarboksilaz Enzimi ile Yapılan Çalışmalar	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Cihazlar	30
3.1.2. Kimyasallar ve kitler	31
3.1.3. Enzimler	33
3.1.4. Primerler	33
3.1.5. Mikroorganizmalar	34
3.1.6. Vektör sistemi	36
3.1.7. DNA ve protein merker'ları	40
3.1.8. Tampon ve çözeltiler	40
<i>Jel elektroforezlerinde kullanılan tamponlar</i>	41
<i>PZR ve ligasyon işleminde kullanılan tamponlar</i>	42
<i>Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler</i>	43
<i>Ni-NTA spin kolon için kullanılan tamponlar</i>	43
<i>Protein miktar tayininde kullanılan çözeltiler</i>	45

<i>Sumoproteaz için kullanılan tampon ve çözeltiler</i>	46
<i>Enzim aktivitesini ölçmede kullanılan çözeltiler</i>	46
3.2. Yöntem	47
3.2.1. Gen kaynağı organizmayı belirleme	47
3.2.2. Genin belirlenmesi ve primer tasarlama	47
<i>Genomik DNA izolasyonu</i>	47
<i>Gen belirleme ve primer tasarlama</i>	49
<i>PZR ile gen bölgesinin çoğaltılması</i>	49
3.2.3. Vektör hazırlama	50
<i>Ligasyon ve TA klonlama</i>	51
<i>Çoğaltma konakçısına klonlama</i>	51
<i>Klonlamanın doğrulanması</i>	52
3.2.4. Protein ifadesi ve protein saflaştırma	54
<i>İfade konakçısına klonlama</i>	55
<i>İndükleme ile protein ifadesi</i>	56
<i>Protein ayırma ve saflaştırma</i>	57
<i>SDS-PAGE elektroforezi</i>	58
<i>Diyaliz</i>	60
<i>Sumo proteaz ile kesim işlemi</i>	61
<i>Protein miktarının belirlenmesi</i>	61
3.2.5. Enzim aktivitesinin belirlenmesi	62
<i>Spektrofotometrik yöntem ile enzim aktivitesi belirleme</i>	62
<i>Format dehidrogenaz enziminin optimizasyonu</i>	65
<i>Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin aktivite tayini</i>	66
4. BULGULAR	67
4.1. Gen Kaynağı Seçilen Organizmadan Genomik DNA İzolasyonu	68
4.2. Belirlenen Gen ve Tasarlanan Primerler	68
4.2.1. PZR ile çoğaltılan gen bölgesi bulgusu	69
4.3. Vektör Hazırlama	70
4.3.1. Ligasyon ve TA klonlama bulguları	70
4.3.2. Transformasyon ve klonlama bulguları	70
4.4. Doğru Klon ve Transformant Hücrelerin Tespiti	71
4.4.1. Koloni PZR sonucu	71
4.4.2. Çapraz PZR sonucu	72

4.4.3. Plazmid izolasyonu ve kontrol PZR	73
4.4.4. Dizileme sonucu	74
4.5. Protein İfade Bulguları	75
4.6. Protein Saflaştırma Bulguları	78
4.6.1. Ni-NTA spin kolon ile ayırma bulguları	78
4.6.2. Diyaliz membran sonucu	79
4.6.3. SUMO proteaz ile kesim sonucu	79
4.6.4. Protein miktarının belirlenmesi sonucu	80
4.7. Enzimatik Aktivite Bulguları	81
4.7.1. Format dehidrogenaz enziminin optimizasyon bulguları	81
4.7.2. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin aktivite bulguları	81
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	93
6.1. Sonuçlar	93
6.2. Öneriler	96
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	102

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

APS	:Amonyum peroksidisülfat
ATP	:Adenozin 3'-trifosfat
BSA	:Bovin serum albümün
CREB	:cAMP response element-binding protein
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik asit
EDTA	:Etilendiamin tetraasetik asit
HEPES	:Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid
IPTG	:Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	:Lizojen Brot
MW	:Molecular weight
MES	:2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
NADH	:Nikotinamid adenin dinükleotit
Ni-NTA	:Nikel Nitritriasetik asit
PBS	:Phosphate-buffered saline
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	:Ribonükleik asit
SDS	:Sodium dodecyl sulfate
SNP	:Single Nükleotid Polimorfizm
TAE	:Tris base, acetic acid ve EDTA.
TEMED	:N-N-N'-N'-Tetrametiletilendiamin
Tween-20	:Polietilen Sorbitan Monolaurat
TMB	:3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
S.O.C.	:Super Optimal broth with Catabolite repression

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Oksalat oksidaz enziminin tepkime şeması
- Şekil 2.** Format dehidrogenaz enziminin tepkime şeması
- Şekil 3.** Format dehidrogenaz enziminin yapısı
- Şekil 4.** Histidin ve Ni-NTA birleşimini
- Şekil 5.** pET-SUMO vektör haritası
- Şekil 6.** 100 bp DNA ladder
- Şekil 7.** Prestained protein ladder
- Şekil 8.** 1000 bp DNA ladder
- Şekil 9.** Yüzde transmitans (% T)
- Şekil 10.** Oksalat dekarboksilaz ve format dehidrogenaz enziminin tepkime şeması
- Şekil 11.** İzole edilen *Bacillus subtilis* 168 M suşundan elde edilen genomik DNA
- Şekil 12.** Gradient PZR sonucu.
- Şekil 13.** Transforme edilmiş bakterilerin büyüdüğü petri.
- Şekil 14.** Transforme edilmiş bakterilerden yapılan PZR bulgusu
- Şekil 15.** Kontrol amaçlı yapılmış çapraz PZR sonucu
- Şekil 16.** İzole edilen plazmidlerle yapılmış PZR bulgusu.
- Şekil 17.** Transformasyon sonucu izole edilen ifade konakçılarının kontrol PZR'ı
- Şekil 18.** IPTG ile indükleme sonucu elde edilen farklı saatlerdeki proteinlerle yapılmış SDS-Page bulgusu
- Şekil 19.** Spin kolon kullanılarak elde edilmiş protein saflaştırma işlemlerini gösteren SDS-PAGE görüntüsü.
- Şekil 20.** SUMO Proteaz ile yapılan enzimatik kesim işlemi sonrasında yapılan spin kolon ile saflaştırma görüntüsü.
- Şekil 21.** Bradford standart ölçüm grafiği
- Şekil 22.** Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin su kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü
- Şekil 23.** Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 1mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü

- Şekil 24.** Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 2mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü
- Şekil 25.** Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 3mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü
- Şekil 26.** Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 4mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü
- Şekil 27.** Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 5mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü.
- Şekil 28.** Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 10mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü.



TABLULAR DİZİNİ

- Tablo 1.** yvrK geni için belirlenen primerlerin özellikleri
- Tablo 2.** pET-SUMO vektörü için kontrol amaçlı belirlenen primerlerin özellikleri
- Tablo 3.** pET-SUMO vektör sisteminin özellikleri
- Tablo 4.** PZR’da kullanılan madde miktarları
- Tablo 5.** PZR için kullanılacak olan sıcaklık ve döngü bilgileri.
- Tablo 6.** Ligasyon için kullanılan bileşenler
- Tablo 7.** Koloni PZR için kullanılan bileşenler
- Tablo 8.** SUMO Proteaz kesim için kullanılan kimyasallar
- Tablo 9.** yvrK geni için belirlenen primerlerin bulguları
- Tablo 10.** pET-SUMO vektörü için kontrol amaçlı belirlenen primerlerin bulguları
- Tablo 11.** Format dehidrogenaz enzimi ile yapılan optimizasyon çalışmaları.
- Tablo 12.** Format dehidrogenaz enzimi ile yapılan optimizasyon çalışmalarda kullanılan bileşen ve miktarları
- Tablo 13.** Rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi ile yapılan optimizasyon çalışmalarda kullanılan bileşen ve miktarları

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Böbrek taşı, tıp literatüründe "nephrolithiasis" veya "urolithiasis" olarak bilinen, böbreklerde birikmesi sonucunda oluşan sert madensel yapılardır. Ürik asit veya kalsiyum oksalat benzeri maddeler eğer idrar içinde normalde olması gereken yoğunluktan daha yüksek miktarda bulunursa böbrek taşı oluşumu gözlenir. Oluşan bu yapılar kristal yapısında böbrekte çökerek ve aynı zamanda büyüyerek böbrek taşlarını oluşturur. Böbrek taşları böbrekte hareket ederek ya da idrar yolu boyunca hareket etmesi sonucunda vücuttan atılabilir. Ama oluşan taşların hacmine ve yoğunluğuna bağlı olarak üretraya takılması sonucunda idrarın dışarı çıkışı engellenir ve aşırı ağrıya neden olur.

Böbrekler filtre görevine sahip olan organlarımızdır. Dolaşım sisteminden geçen kan böbreklere geldiğinde kan içerisinde bulunan yararlı maddeler süzülürken zararlı maddeler üriner sistemle dışarı atılır. Vücut yeterli miktarda su almazsa idrar yoğunluğu yükselir böylelikle böbreklerde biriken maddeler taş oluşturma riskini artırır. Bazı mineraller ve tuzlar zaman içerisinde birikir ve taşa dönüşecek olan kristalleri ortaya çıkarır. Kalsiyum, ürik asit ya da oksalat seviyeleri yükseldiğinde ya da sitratın azaldığı zamanlarda nefrolitiazis hastalığı ortaya çıkar. Bu hastalığın oluşmasının nedeni bu biriken maddelerin böbrek tübüllerinde taşa dönüşmesidir. Taşlar bazen mikron büyüklükte olmakla beraber çok daha büyük formları da bulunabilmektedir.

Taş hastalığı; Hipokrat zamanından beri bilinen ve toplum sağlığını oldukça yaygın bir şekilde etkileyen bir hastalıktır. Üriner taş hastalığı insanlığı yüzyıllarca etkilemiştir. En eski keşfedilen taş tarih öncesi el amaradaki bir mezarda bulunan genç bir çocuğun pelvik kemiklerindeki taştır. Bu taşın 7000 yıllık bir mesane taşı olduğu düşünülmektedir. Mesane taşları toplumda morbidite ve mortaliteye yol açan dünya çapında bir problemdir. Dünyada taş hastalığının görülme oranı %1-13 arasında değişmektedir. Ülkemizde ise %10 oranında taş hastalıkları görülmektedir. Tedavi edilmeyen hastalarda tekrarlama olasılığı yılda %7 iken, tedavi edilmiş, edilmemiş tüm hastaların %50'sinde 10 yıl içerisinde tekrarlayabilmektedir. Taşların yaklaşık %75 kadarını oksalat taşları, geri kalan %25'lik kısmı ise magnezyum amonyum fosfat, ürik asit, hidroksiapatit ve sistin taşları oluşturmaktadır. Diyetel faktörler

taşın yerleşim yerinde ve taşın tipinde önemli rol oynar. Fakat kapsamlı epidemiyolojik çalışmalar taş oluşumunda birçok etiyolojik faktörün rol oynadığını göstermektedir. Bunlar; yaş, cinsiyet, genetik faktörler ve ailesel yatkınlık, coğrafya ve iklim şartları, diyet, sosyoekonomik faktörler ve hiperparatiroidizmdir (paratitoid bezinin fazla çalışması). Erkeklerde kadınlara oranla 2-3 kez daha sık görülmektedir. Ülkemizde oksalat türü taş yapısının sık görülmesi beslenme alışkanlıkları ile ilgilidir. Ürik asit ve ürat taşlarının oluşumu ise sıcak iklim koşullarına ve az sıvı alma eğilimine bağlı olarak açıklanmaktadır. Üriner sistem taşlarının kristal yapıları ülkeden ülkeye hatta aynı ülke içinde bölgeler arasında farklılık göstermektedir.

Böbrek taşı türünü belirlemede idrar oksalat miktarı tayini yöntemi kullanılmaktadır. Oksalat miktarı tayininde ise iki yöntem bulunmaktadır. Birincisi oksalat kristallerinin okside edilmesi yöntemiyle ortaya çıkan oksijen radikallerinin ölçümü, diğeri ise oksalat kristallerinin dekarboksile edilmesiyle ortaya çıkan format miktarının ölçümünün format dehidrogenaz enzimi ile belirlenmesi ile yapılmaktadır.

Oksalat dekarboksilaz (E.C. 4.1.1.2) oksalat kristallerini format ve karbondioksite katalizleyen bir enzimdir. Liyaz enzimleri ailesine ait olan bu enzim karbon-karbon bağlarını açan karboksilaz enzimlerindedir. Ayrıca oksalat karboksilaz olarak adlandırılan bu enzim glioksilat ve dikarboksilat metabolizmasında yer almaktadır. Başta aspergillus türleri olmak üzere çeşitli fungi türleri olmak üzere birçok bitki türünde ve bazı mikroorganizmalarda oksalat dekarboksilaz enzimi üretilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi doğal olarak bir arada bulunmayan genlerin farklı organizmalardan elde edilerek yine farklı mikroorganizmalara aktarma teknolojisidir. Aktarılabacak olan genler gerek gen mühendisliği ile enzimler kullanılarak kesilmesi gerek başka tekniklerle saflaştırılması sonucunda gerekli taşıyıcılara aktararak başka organizmalara aktarılır. Elde edilen bu genlere rDNA olarak adlandırılır. Kopyalanan genler gerek kopyalama gerekse protein olarak ifade edilmesi amacıyla günümüzde mühendislik temel tıp bilimleri zirai bilimler gibi alanlarda çokça kullanılmaktadır. Günümüzde üretilen birçok aşı, tanı ve tedavi amaçlı birçok kit üretilmektedir. Bu teknoloji sayesinde birçok alandaki çalışmalarda hem maliyet açısından hem de verim açısından birçok avantaj sağlanmaktadır.

Çeşitli organizmalarda üretilen oksalat dekarboksilaz enzimi elde edilmesi ve saflaştırılması, birçok süreç gerektirdiğinden zor olmaktadır. Bu yüzden rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmesi ve saflaştırılması hem maliyet açısından hem de daha az sürece ihtiyaç duyduğundan daha avantajlı olmaktadır.

Bacillus subtilis (168); oksijenli solunum veya geçici oksijenli solunum yapan, 20-30 derecede üreyen bir bakteri cinsidir. Vejetatif şekilleri dayanıksız olup, sporları bazen kaynama derecelerinde birkaç saat dayanabilirler. Gram pozitifdir. Doğada çok yaygın olarak bulunur. Panoftalmi ve İridosiklit gibi göz enfeksiyonlarına neden olur. Bulaşma kaynağı olarak toz, toprak, su gibi temel alanlarda yerleştiklerinden besin maddelerine kolaylıkla bulaşır. Ekmeğin iç kısmı pişerken 100°C derece ölmezse bu bakteri, ekmekteki karbonhidratı kullanarak ekmeğin içinde lifli bir yapı oluştururlar. Özellikle sütte çoğaldıkları zaman kazeini parçalayarak zehirli maddeler açığa çıkarırlar. Diğer besin maddelerinde üredikleri zaman toksin oluştururlar. Kuluçka süresi 2-18 saattir ve ürfaktin sentezini yapar.

Oksalat dekarboksilaz enzimini üreten organizmalardan başında *Bacillus subtilis* gelmektedir. Bu mikroorganizmanın oksalat dekarboksilaz enzimini üretim koşullarının sağlanması zor olduğundan dolayı rekombinant DNA teknolojisi ile bu mikroorganizmadan alınacak genlerin üretim koşulları daha kolay sağlanabilen mikroorganizmalara aktararak enzim üretimi sağlanabilir.

Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* 168 suşundan elde edilen yvrK proteinini kodlayan genler rekombinant DNA teknolojisi ile bir vektör aracılığı ile konakçı bir mikroorganizmaya aktararak ve yüksek miktarda protein olarak elde edilmesi amaçlanmaktadır. Böylece enzimatik reaksiyonlar için gerekli ortam, tampon ve kofaktör optimizasyonu sağlandıktan sonra enzim aktivite tayini yapılacaktır.

Klinik olarak büyük önemi olan oksalatın ölçümünde enzimatik reaksiyonlar kullanılmaktadır. Ülkemizde oksalat ölçümü, oksalat oksidaz metodu ile çalışan ticari kitler kullanılarak yapılmaktadır. Oksalat oksidaz metoduyla çalışan tayin yöntemine alternatif olarak oksalat dekarboksilaz enzimiyle de yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada, rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilecek olan oksalat dekarboksilaz enzimi ile ticari olarak elde edilen format dehidrogenaz enzimi kullanılarak oksalat miktar tayininde kullanılabilecek yeni bir metot geliştirmesi hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksalat Metabolizması

Oksalik asit: Bitki kökenli en tanınmış organik asitlerden biridir. Oksalik asit ve karboksilik asitlerin molekül ağırlığı en ufak olanıdır. Kimyasal formülünde iki molekül kristal suyu kapsar.

Renksiz kristaller halindedir. Kristaller suyunu 100°C'ye kadar ısıtıldığında kaybeder ve erir. Bunun sonucunda kısmen süblimleşir, kısmen de CO₂ kaybederek formik asite dönüşür. Oksalik asit, sulu çözeltilerden, erime noktası 101,5°C olan renksiz, prizmatik, dihidrat (iki sulu) kristaller verecek şekilde kristallenir. Özellikle karbontetraklorür beraberliğinde, ısıtma ile susuz kristaller (erime noktası 189,5°C) elde edilir. Oksalik asit, su ve alkolde hızla, eterde ise yavaşça çözünür [1]. Oksalik asitin dihidrat molekül yapılandırması düzlemsel özelliktedir, antihidrat halde ise molekül dizilişi ve hidrojen bağlarının dağılımı bakımından iki farklı kristal yapı gösterir. Oksalat iyonu ise hiç değilse amonyum oksalat halinde düzlemsel yapıda değildir. Çünkü karboksil grupları birbirlerine doğru 30°C'lik bir açı oluşturacak durumda bulunurlar [1, 2]. Oksalik asit sentezi 1778 yılında Scheele tarafından nitrik asit ve sakkarozun vanadium pentoxide'in katalitik etkisi altında reaksiyon aşamasından elde edilmiştir. Vanadium pentoksit bu reaksiyonda oksijen taşıyıcı olarak görev yapar ve katalitik etkisini teroksit haline indirgenerek ve yeniden oksitlenerek sağlar. Reaksiyon ürünü olarak az miktarda da mesoksalik asit oluşur. Oksalik asit nispeten kuvvetli bir asittir. pKA= 1.23 pKA= 4.19. suda orta derecede çözünür(20°C' de 100 g suda 8.7g) [3-5]. Oksalik asit 3. değerli demir ve seryum tuzları ve potasyum permanganat gibi oksitleyici maddelerin etkisi ile aşağıdaki denkleme göre su ve CO₂ haline oksitlenir [6].

Oksalik asitin Li, Na, K gibi alkali metaller ile oluşturduğu tuzlar ve ferro tuzları suda çözüldüğü halde diğer oksalatlar suda pek az ve güçlükçe çözünürler. Kalsiyum tuzu ise nötral ve alkalik pH'larda hemen hemen hiç çözünmez (18°C'de 100 ml suda ancak 0.58 mg) [3, 7]. Kalsiyum oksalat sulu çözeltilerde monohidrat şeklinde çöker. Trihidrat şekli dayanıksızdır ve şimdiye kadar sadece bir böbrek taşının yapısında bulunduğu gösterilmiştir

[8]. İdrar ultrafiltratından kalsiyum oksalatın dihidrat şeklinde çöktüğü gözlemlenmiş, bunda magnezyumun başlıca stabilize edici faktör olduğu ve oksalatın çökmesini inhibe ettiği kanısına varılmıştır [8]. Oksalik asit bazı enzimler üzerine inhibe edici bir etki yapar. Nitekim oksalik asitin 10,4 M ve 10,5 M çözeltisi laktik dehidrogenaz ve transkarboksilaz enzimlerini kompetitif inhibisyona uğratar [9, 10].

Hidrojen iyon konsantrasyonunu artırdığımızda kalsiyum oksalatın suda çözünbilme yeteneği de artar. Fakat pH'nın fizyolojik sınırlar içinde asit tarafa kayması büyük bir etki sağlayamaz. Kalsiyum oksalatın çözünürlüğü ayrıca ortamda üre sitrat ve magnezyum gibi iyonların bulunması ile de artar. Bu bakımdan laktat, sülfat, Na ve K daha az etkilidir [11, 12]. Kalsiyum oksalatın çözünürlüğü EDTA varlığında da artmaktadır. Kalsiyum oksalatın ve Ca-EDTA'nın stabilite konsantantları 25°C'de 0,1 iyon kuvvetinde sırasıyla 3,0 ve 10,7' dir.

Birçok bileşikler kalsiyum oksalatın çökmesini ve kristalizasyonunu inhibe ederler. Bu gibi bileşiklere heparin [13] ve inorganik pirofosfat [14] gibi polielektrolitler ve çeşitli doğal sentetik boyalar [15] örnek gösterilebilir.

2.1.1. Oksalik asid metabolizması

Oksalik asitin memeliler tarafından kullanılabilirliğine dair henüz herhangi bir bulgu elde edilememiştir. Sıçanlara enjekte edilen izotopla işaretlenmiş oksalatın, hiçbir değişime uğramadan, idrar ile atıldığı saptanmıştır. Bu sırada solunumla çıkarılan CO₂' in ve idrarla atılan hipüratın bileşimlerinde anlamlı oranda, işaretli C atomuna rastlanamamıştır [16].

Normal insanlarda intra venöz olarak verilen C atomu işaretlenmiş oksalik asitin %88-99' unun 26 saat içinde idrarla çıkarıldığı tespit edilmiştir [17].

Geriye kalan az bir kısım oksalatın ise safra ve barsak sıvısı ile salgılandığı ve barsaklarda bakterilerin etkisi ile parçalandığı düşünülmektedir. Normal insanlarda endojen oksalatın başlıca kaynağı glisin ve askorbik asittir. Bunlardan türeyen oksalatın total endojen oksalatın aşağı yukarı yarısını oluşturduğu saptanmıştır. Böylece L-askorbik asitin idrarla çıkarılan oksalatın bir kısmının ön maddesi olduğu hem insanlarda hem de deney hayvanlarında yapılan araştırmalarla açıkça ortaya konmuştur [18-21].

2.2. Oksalat'a Bağlı Hastalıklar

İnsanlarda idrardaki oksalat miktarının arttığı durumlar 3 grupta incelemek mümkündür. Bunlar;

- Besinsel hiperoksalüriler
- Piridoksin eksikliğine bağlı hiperoksalüri
- Primer hiperoksalüri oksalosis

2.2.1. Besinsel hiperoksalüriler

Bileşimlerinde fazla miktarda oksalat bulunan besinler yenildiğinde, bu besinler eksojen kaynaklı oksalat alımını artırarak hiperoksalüriye sebep olur. Aynı zamanda eksojen kaynaklı oksalatın ön maddelerini aşırı miktarda kapsayan besinlerin veya maddelerin alımı da oksalat miktarını artırır. Bu gibi maddeler arasında glisin, askorbik asit, glikolat, hidroksprolin, triptofan, etilen glikol sayılabilir [18-24].

2.2.2. Piridoksin eksikliğine bağlı hiperoksalüri

Yapılan araştırmalarda kedilerde ve sıçanlarda B6 vitamini eksikliğinin, idrarla çıkarılan oksalat miktarını büyük ölçüde artırdığı tespit edilmiştir [14, 25]. Rhesus ve Cebus maymunlarında yapılan deneyler de kedi ve sıçanlardan elde edilen sonuçlara yakın bulgular vermiştir [26]. İnsanlara da B6 vitamini verildiğinde idrarla oksalik asit çıkışının azaldığı tesbit edilmiştir [25, 27].

B6 vitamini eksikliği dolayısıyla kalsiyum oksalat taşı oluşan sıçanlarda kontrol grubu sıçanlara oranla idrarla atılan sitrik asit miktarında önemli bir azalma olmaktadır. B6 vitamini verildiğinde bu azalma yeniden normale dönmektedir [27].

Daha sonraki araştırmalarda B6 vitamini eksikliği sebebiyle taş oluşumunda cinsiyetin de önemli rolü olduğu, erkek sıçanlarda dişilere ve kastre edilenlere oranla daha fazla taş meydana geldiği saptanmıştır. Bu durum B6 vitamini ihtiyacının erkek sıçanlarda dişi ve kastre olanlara oranla daha fazla olduğu fikrini uyandırmaktadır. Nitekim deneyler sırasında erkek sıçanlardaki ölüm oranı da diğer iki gruba kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur [28].

B6 vitamini eksikliğinin hangi yolla taş oluşumuna yol açtığını anlamak üzere yapılan araştırmalarda 30–50 gün süre boyunca B6 vitamininden yoksun bir diyet altına konulan sıçanların böbrekleri elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Sıçanların bir kısmına da ek olarak Mg bakımından fakir besinler verilmiştir. Sadece B6 eksikliği olan sıçanlarda proksimal tubuluslarda vaküollerin ve lizozomal cisimciklerin sayısının hafifçe artmış olduğu, tubulus lümeninde hücre parçacıklarının fazlalığı göze çarpmıştır. Buna karşılık B6 eksikliği

ile birlikte Mg'dan yana da fakir bir diyet tabii tutulan sıçanlarda proksimal tubulus hücrelerinin sitoplazmalarında fazla miktarda, büyük lizozomal cisimcikler görülmüştür. Ayrıca B6 eksikliği olan sıçanlarda tubulus lümeninde fazla miktarda hücre parçacıklarına rastlanmıştır. Taş oluşumunun ilk basamağında Mg eksikliğine bağlı olarak proksimal tubuluslarda apatit oluştuğu, B6 vitamini eksikliğine bağlı olarak artan oksalat birikimi sonucunda da bu apatit üzerine oksalat kristallerinin çöktüğü sonucuna varılmıştır [14, 27, 28].

Yine sıçanlar üzerinde yapılan deneyler sonucunda pridoksin eksikliğinin idrarla atılan oksalat miktarını artırdığı belirlenirken, tiamin eksikliğinin böyle bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Glioksilat ve etilen glikol verilen sıçanlarda da B6 eksikliğinde olduğu gibi oksalat atılımı artar. İçme sularına glioksilat veya etilen glikol katılmış sıçanlarda B6 eksikliği olsun veya olmasın oksalat taşı oluşumu artar [27].

2.2.3. Primer hiperoksaluri veya oksalosis

Oksalosis, Böbrek ve böbrek dışındaki dokularda, yaygın olarak kalsiyum oksalat kristallerinin birikmesi ile birlikte seyrek görülen primer bir metabolizma bozukluğudur. Hastalık ilk çocukluk çağlarında hiperoksalüri, böbreklerde kalsiyum-oksaldan ibaret devamlı taş oluşumu ve nefrokalsinosis belirtiler ile göze çarpar [29-31].

2.3. Oksalat Ölçüm Yöntemleri

İdrar ve kandaki oksalat miktarını belirlemek için kolorimetrik ve enzimatik yollarla uygulanan ölçüm yöntemleri bulunmaktadır. Son zamanlarda kolorimetrik yöntemlerde yapılan çalışmaların birinde, tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) kullanılarak yapılan ölçüm metodunda kandaki oksalat miktarı 0,2-10 µmol/L aralığında ölçülmüştür [32].

S. Gilman yaptığı çalışmada; ortamda bulunan oksalik asit miktarı platinyum elektrot kullanılmasıyla oluşan potansiyel farkı kullanılarak ölçülmüştür. S. Gilman'a göre; oksalik asit içeren bir solüsyonda perklorik asit kaplı platin elektrot kullanılarak oksalat/bioksalat anyonları difüzyon kontrollü oksijen adsorbsiyonunda çok hızlı bir şekilde ölçüm yapılabilmektedir [33].

A. Hudgkinson ve Ann Williams'ın yaptığı bir tekniğe göre; 0,5 ml idrar içindeki oksalik asit miktarı kalsiyum sülfat ile presipitasyon ön işlemine tabii tutularak glikolik asit ile redükte edildiğinde oluşan peletin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Hazırlanan örneklerin daha sonra hidrojen peroksit ile yavaş bir şekilde karıştırılıp 30 dakika boyunca kaynatılıp spektrofotometrik yöntemle 570 nm'de ölçümü yapılır [9, 34].

İyon-Değiştirici kromotografiden sağlanan oksalat glikolik asit ile redüklenir ve kromotropik asit ile renklendirilir. Önceki çalışmada bahsedildiği gibi daha sonra sülfirik asit ile reaksiyon durdurulur ve 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü yapılır. Bu çalışmaya göre ölçülmek istenen oksalat miktarının %98 kadar miktarı ölçülebilmektedir [35].

Oksalat miktarı kolorimetrik ölçümlerle belirlenebildiği gibi ayrıca bir veya birden fazla enzimin bir arada kullanılmasıyla da yapılabilmektedir [36]. Oksalik asitin okside ya da dekarboksile olmasıyla oluşan ürünlerin daha sonra yine başka tepkimelerle son ürün eldesi sonrasında oluşan ürünlerin ölçülmesiyle doğrudan kantitatif olarak ölçümü mümkün olmaktadır. Teorik olarak oksalik asitin okside olması ile birlikte ortaya çıkan hidrojen peroksit at turpu peroksidaz enzimi parçalanıp elde edilen son ürünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi sonucunda oksalat miktarının ölçülmesi mümkün olmaktadır. Bir diğer enzimatik ölçüm tekniğindeki dekarboksilasyon işleminde oksalik asitin parçalanması sonucunda ortaya çıkan format miktarı; format dehidrogenaz enziminin format'ı karbondioksit ve formik asit'e parçalaması sonucunda oluşan $NADH^{+}$ 'yı 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümüyle oksalat miktarı belirlenebilmektedir [37].

M.F. Laker ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bir yosun türünden elde ettiği oksalat oksidaz (EC 1.2.3.4) enzimi kullanarak idrarda oksalat miktarı tayini yapılmıştır. Bu metotta oksalat oksidaz (EC 1.2.3.4) tarafından parçalanan oksalik asit reaksiyon sonucundan hidrojen peroksit ve karbondioksit meydana gelmektedir. Kullanılacak olan ikinci bir enzim olan at turpu peroksidaz (EC 1.11.1.7) ile ortaya çıkan 3,metil-2,benzothiozolinon hidrozon bileşiği N,N-dimetilanilin ile boyanarak indamin rengi açığa çıkarır ve bu 595nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi sonucundan oksalik asit miktarı tayin edilir [38].

Oksalik asidi karbondioksit ve formik aside dönüştüren oksalat dekarboksilaz (EC 4.1.1.2) enziminin kullanıldığı bir yöntemde, oluşan karbondioksit bir tampon içinde tutulmakta, pH'da meydana gelen değişim ise ya direkt olarak ya da bir indikatörün renk değişiminden yararlanılarak tesbit edilmektedir. Böylece kantitatif olarak tayin edilen karbondioksitin miktarından oksalik asit miktarına geçilmektedir [38].

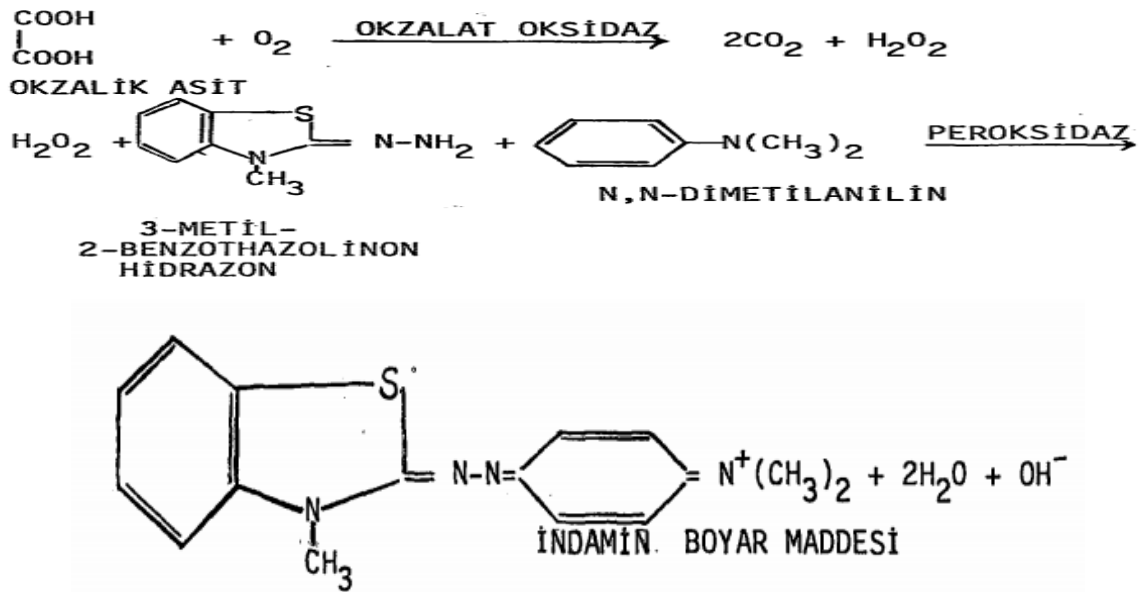
Oksalik asidin tayinine uygun diğer bir enzimatik yöntemde oksalat dekarboksilaz (EC 4.1.1.2) ile format dehidrogenazın (EC 1.2.1.2) birlikte kullanılmasıdır. Bu yolla oksalik

asit, oksalat dekarboksilaz ile karbondioksit ve formik aside dönüştürülür ve oluşan formik asit de format dehidrogenaz tarafından tayin edilir. Ancak bu yöntem kofaktör olarak NAD'e ihtiyaç duymaktadır. Bu enzimleri kullanarak hazırlanan yarı otomatik ve tam otomatik sistemler de bulunmaktadır [39].

Dekarboksilasyon reaksiyonu ile yapılan oksalat miktarı ölçüm yönteminde kullanılan örnekler önceden asidifikasyon işlemine tabi tutulmalıdır. Ayrıca bicoupin ailesinden olan oksalat dekarboksilasyon enziminin çalışması için manganez iyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Oksalat dekarboksilasyon enziminin kofaktörü olarak görev yapan manganez enzimin aktivasyonunda önemli yer tutmaktadır [40-42].

2.4. Oksalat Oksidaz

Oksalat oksidaz (EC 1.2.3.4) (Sistemik adı: oksalat; oksijen oksidoredüktaz) ilk olarak 1927'lerde yosunlarda tebit edilmiştir. Birbirini izleyen pekçok çalışma sonucu söz konusu enzimin yosunların yanısıra ıspanak, arpa çimleri, mantarlar, muz kabukları ve pancar gibi değişik kaynaklarda bulunduğu kanıtlanmıştır [38, 43-46].



Şekil 1. Oksalat oksidaz enziminin tepkime şeması

Bu konu üzerindeki ilk araştırmalar, biyolojik indirgenme mekanizması, askorbik asidin radyololizi ve 2,3-diketogulonik asidin oksalik aside dönüşümü olaylarının bilinmediği dönemlerde, farklı sistemlerdeki bu substratlardan kaynaklanan oksalik asit miktarını duyarlı bir şekilde belirleyebilmek üzere oksalik aside spesifik bir enzimin bulunması gereksiniminden kaynaklanmıştır. Bu düşüncelyi izleyen ve pekçok bitkinin incelendiği bir

seri araştırma sonucunda arpa (*Hordeum vulgare*) çimlerinin ve özellikle de bu çimlerin kök kısımlarının, çözümlenir oksalat oksidaz enzimini içerdiği bulunmuştur [47]. 1930'lu yıllarda yapılmış olan bir çalışmada arpa tohumlarından elde edilen ham ekstraktın ancak bir mayanın varlığında (Kochsaft) oksalik asidi oksitleyebildiği rapor edilmişse de daha sonraki çalışmalar saf enzimin oksalik asidi karboksidiokside metabolize edebilmek için herhangi bir kofaktöre gereksinim duymadığı ortaya koymuştur [46].

Bitkilerdeki oksalik asit metabolizması tam olarak anlaşılacak kadarla beraber oksalik asidin belirli esansiyel katyonlarla şelat yaparak çözümlenmez tuzlara dönüşme yeteneğinde olduğu kabul edilmektedir.

Oksalat oksidaz üzerine yapılan çalışmalarda arpa çimlerinden elde edilen enzimin molekül kütlesinin 150kDa dolayında olduğu enzimin identik iki alt ünitelerden oluştuğu ve bu iki alt ünitenin herbirinin molekül kütlesinin 75kDa olduğu bulunmuştur [20]. Pancar yumrularından elde edilen enzim ile yapılan diğer bir çalışmada oksalat oksidazın tetramerik bir yapıya sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu tetramerik yapıyı oluşturan dört alt ünitenin kenar aralarında ikişer ikişer özdeş olduğu, iki özdeş alt ünitenin molekül kütlelerinin 24kDa diğer iki özdeş alt ünitenin de 28kDa olarak bulunduğu verilen bilgiler arasındadır [43].

2.5. Oksalat Dekarboksilaz

Oksalat tayininde kullanılan başka bir enzim de oksalat dekarboksilaz (E.C. 4.1.1.2. enzimidir. Bulunduğu ortamdaki oksalik asidi formik asit ve karbondiokside parçalar. Enzim içerdiği iki cupin domaininden oluşmaktadır. Her domainde kofaktör olarak Mn^{+2} kullanılmaktadır.

Oksalat dekarboksilaz enzimi birçok organizmada bulunmaktadır bunlar;

Agaricus bisporus

Agrobacterium tumefaciens

Aspergillus niger

Aspergillus phoenicis

Aspergillus sp.

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis 168

Bacillus subtilis CU1065

Cavia porcellus

Dichomitus squalens

Dichomitus squalens sp.

Dichomitus squalens PO114

Flammulina sp.

Flammulina sp. IJF 140502

Flammulina velutipes

Mus musculus

Pandorea sp.

Pandorea sp. OXJ-11a

Phanerochaete chrysosporium

Phanerochaete sanguinea

Phanerochaete sanguinea sp.

Phanerochaete sanguinea T51

Sclerotinia sclerotiorum

Thermotoga maritima

Trametes ochracea

Trametes ochracea T7

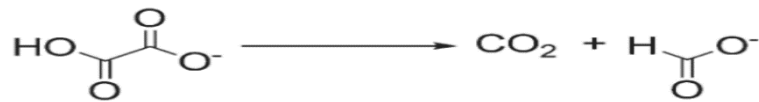
Trametes versicolor

Trametes versicolor PRL572

Bu enzim liyazlar ailesine aittir ve karboksilazlara özgülük göstermektedir. Karbon-karbon bağlarına olan ilgisi ile bu bağları kopararak tepkime oluşturur. Enzimin sistematik adı oksalat karboksi-lizaz (format şekillendirici). Enzim gliksilat ve dikarboksilat metabolizmasında görev almaktadır.

2.6. Format Dehidrogenaz

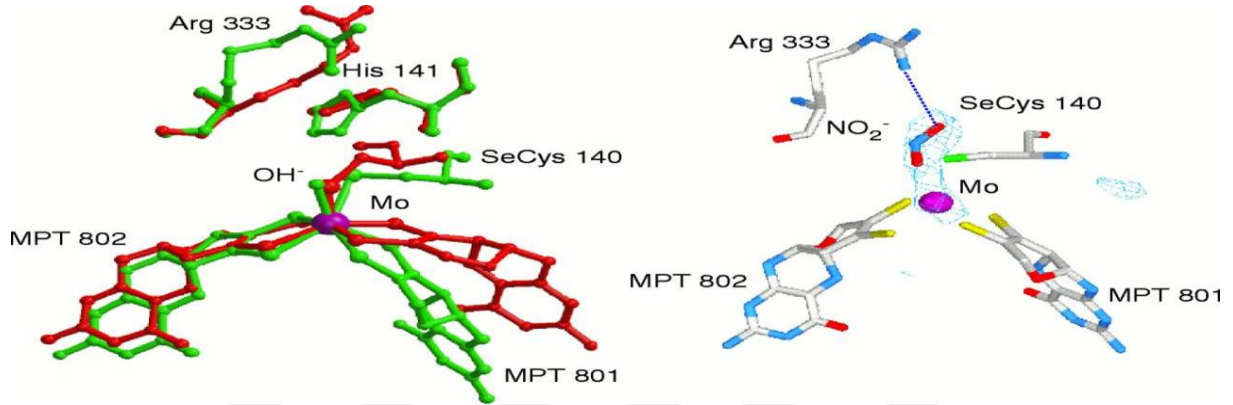
Format dehidrogenazlar, format bileşiğinin oksidasyonunu katalizleyen bir dizi enzimlerdir. NAD gibi ikinci substrata format'tan gelen elektronları bağlar. Format



Şekil 2. Format dehidrogenaz enziminin tepkime şeması

dehidrogenaz format bileşiginden NAD kofaktörü varlığında karbondioksit ve NADH oluşturmaktadır.

NAD-bağımlı format dehidrogenazlar metalotropik maya ve bakteriler için önemli bir rol oynamaktadır. Metanol gibi temel organik asit bileşiklerinin katabolizmasında hayati önem taşımaktadır [48]. Sitokrom bağımlı enzimler ise prokaryotik anaerobik metabolizmasında daha fazla öneme sahiptir [49]. Örneğin *Escherichia coli*'de bulunan format ferritokrom b1 oksidoredüktaz iki alt üniteye sahip olan ve anaerobik nitrat solunumunda görev alan asıl membran proteinlerindedir [50].



Şekil 3. Format dehidrogenaz enziminin yapısı

2.7. Protein Saflaştırma Yöntemleri

Hücre ya da dokudan istenilen belli bir proteini saflaştırmak zor bir olaydır. Özellikle konsantrasyonu düşük olan proteinlerin diğer binlerce prtein arasındaki ayırmak ve saf bir hale getirmek için farklı saflaştırma tekniklerini bir arada kullanmak gerekmektedir. Günümüzde birçok protein saf halde elde edilebilmiştir.

Saflaştırma işlemine başlamadan önce öncelikle proteinin en çok bulunduğu hücre ya da doku grubu seçilmelidir. Daha sonra proteinin karakterine bağlı olarak bulunabildiği tampon ortamı sağlanmalı ve homojenizaasyon yapılmalıdır. Bu aşamadan sonra gerekirse birden fazla saflaştırma tekniğiyle protein saf olarak elde edilir.

2.7.1. Elektroforetik yöntemler

Elektroforez

Oluşturulan bir elektrik alanında protein parçalarının iyonik kuvvetle ayırma prensibine dayanmaktadır. Temelde bu yöntemde bir hareketli bir de sabit faz vardır. Hareketli olan faz için poliakrilamid, agaroz ya da selüloz gibi dolgu maddeleri

kullanılmaktadır. Bu dolgu maddelerinin en önemli özelliği sahip olduğu porlar ile ayırım sağlamalarıdır.

İzoelektrik fokuslama

Elektroforetik yöntemlerden elektroforezden farklı olarak bu teknikten önce proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayırımı yapılmasıdır. Bu işlem için yüksek mobilitelere sahip olan sentetik asiterin karışımı olan bileşikler içeren jel kullanılarak proteinlerin pH gradienti içinde hareket etmeleri sağlanır daha sonra elektroforez ile bu proteinler ayrıca moleküler büyüklüklerine göre ayrılırlar.

2.7.2. Diyaliz ve ultrafiltrasyon

Temel olarak proteinleri daha küçük olan diğer moleküllerden ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Sahip olduğu porlar sayesinde geçirgenliği sağlayan bir membran içine konulan protein çözeltisi konsantrasyon farkı ile içerdiği küçük moleküllerin membran dışarı çıkması sağlanır.

Glukoz ve NaCl gibi küçük moleküller membrandan geçerken büyük protein molekülleri diyaliz porlarından geçemediği için içeride kalır. Ortam suyunun birkaç kez değiştirilmesi ile küçük moleküllerin protein çözeltisi içerisinde uzaklaştırılması mümkün hale gelmektedir.

Ultrafiltrasyon yöntemi de diyaliz tekniğine göre çalışır. Aradaki fark, diyaliz tüpünden küçük moleküllerin çıkması için hidrostatik basınç veya santrifüj gibi transmembran kuvvetlerinin etkisiyle proteinleri molekül büyüklüklerine göre diyalize göre daha hızlı ve daha yüksek verimlilikte ayrılmasını sağlar. Bu basınç sayesinde küçük moleküllerle birlikte bir miktar sıvı kaybedildiği için protein daha konsantre bir şekilde elde edilir.

2.7.3. Santrifügasyon yöntemleri

Densite zonal santrifügasyon

Bir protein karışımını santrifügasyon yöntemi ile ayırmak için tüp içerisinde sükröz gibi bileşiklerle bir konsantrasyon gradienti yaratılır. Bunun için plastik tüp içerisinde en yoğunundan en az yoğununa doğru bir sükröz gradienti meydana getirildikten sonra tüpün en üzerine protein karışımı ilave edilir. Bu şekilde hazırlanmış olan tüp yüksek devirde santrifüj edilecek olursa her bir protein kendi dansitesi ile aynı olan sükröz bölgesine toplanacaktır.

Tüp içerisinde farklı bantlar halinde ayrılmış olan proteinler daha sonra tüpün altı iğne ile delinip toplanarak veya tüp dondurulduktan sonra bu bantlar buz halinde kesilerek çözündürülür ve bu şekilde proteinler birbirlerinden ayrılmış olur.

Differansiyel santrifügasyon

Differansiyel santrifügasyon ile bir karışımda bulunan partiküller boyutlarındaki farklılıklara bağlı olarak ayrılmaktadır. Homojenat relatif santrifügal kuvvet (RCF) arttırıldıkça fraksiyonlarına ayrılmaktadır.

2.7.4. Kromotografik yöntemler

Jel filtrasyonu

Jel filtrasyonu proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlar. Bu yöntemde proteinlerin birbirinden ayrılması, sabit fazdaki jelin oluşturduğu porların çapına göre moleküllerin belirli derecede engellenmesine dayanır. Sabit faz olarak kullanılan sefadeks, biojel, agaroz gibi dolgu maddeleri kolona doldurulduktan sonra uygun bir tampon ile yıkanır ve kararlı hale geçirilir daha sonra protein çözeltisi tampon ile birlikte kolonun üzerinden yavaş yavaş ilave edilir. Yer çekimine göre aşağı doğru hareket eden protein çözeltisi içerisinde bulunan küçük protein molekülleri kolon dolgu maddesinin küçük oyuklarına girerken, büyük proteinler bu oyuklara hiç girmeden kolondan ilk çıkan moleküller halinde ayrılırlar.

İyon değiştirici kromatografisi

Proteinleri asit ve baz özelliklerine göre ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kolon içine pH= 7 de pozitif yük taşıyan bir selüloz türevi olan DEAE- selüloz (dietil aminoetil selüloz) konur. Bu bileşiğe negatif yük taşıyan proteinler bağlanırken diğer proteinler kolondan çıkar. Kolonun içerisine konan diğer bir bileşik ise pH= 7 de negatif yük taşıyan CM-selüloz (karboksimetil selüloz) dur. Bu bileşiğe de pozitif yük taşıyan proteinler bağlanır. Diğer proteinler ise kolon dolgu maddesine bağlanmadan kolondan çıkar. Daha sonra kullanılan tamponların iyonik kuvveti değiştirilerek kolon materyaline geçici olarak bağlanmış olan bu proteinler kolonun dolgu maddesinden ayrılarak kolondan çıkmaya başlarlar. Fraksiyon toplayıcısı ile küçük miktarlar halinde tüplerde toplanan proteinler asidik ya da bazik özelliğine göre diğer proteinlerden ayrılmış olur. İyon değiştirici kromatografi aynı zamanda aminoasitlerin ve peptitlerin de birbirinden ayrılmasını sağlar. Bu tip

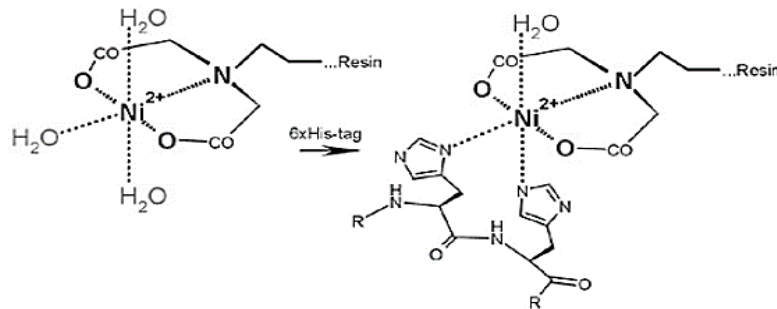
kromatografi özellikle molekül ağırlıkları birbirine çok yakın olan molekülleri ayırmak için kullanılmaktadır.

Affinite kromatografisi

Çok kompleks bir karışım içinde bulunan bazı proteinler affinite kromatografisi sayesinde tek basamakta oldukça saf halde elde edilirler. Affinite kromatografisi için polisakkarit yapısındaki agaroz taneciklerine kimyasal bir reaksiyon ile bir enzimin koenzimi bağlanır. Üzerine koenzim bağlanmış olan agaroz tanecikleri kolon dolgu maddesi olarak kullanılır. Protein karışımı bu kolona uygulandığı zaman yalnız ilgilendiğimiz enzim proteinleri koenzimin serbest ucuna spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma kovalent bir bağlanma değildir. Diğer proteinler koenzimin serbest ucuna bağlanma özelliğine sahip olmadıkları için kolondan ayrılırlar. Daha sonra serbest koenzim içeren çözelti kolona ilave edildiğinde, agaroz taneciklerine bağlı koenzime bağlanmış olan enzim molekülleri bu defa rekabetten dolayı çözelti ile birlikte gelen serbest koenzime bağlanarak kolondan çıkar. Böylece koenzime spesifik olarak enzim proteini diğer yüzlerce proteinden affinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmış olmaktadır.

Ni-NTA spin kolon kromatografisi tekniği kullanılarak 6-histidinli uç taşıyan rekombinant proteinlerle doğal veya denatüre şartlar altında çalışılabilir. İnklüzyon cisimciklerindeki birçok protein deterjanlar, denatüre edici ajanlar (8M üre, 6M GuHCl gibi), diyaliz, ısı, pH gibi gibi parametreler kullanılarak çözünür hale getirilebilirler. Ni-NTA affinite kromatografisi tekniğinde rekombinant proteine bağlı 6-histidin molekülünden ikisi nikel-nitrilotriasetik asit molekülleriyle kaplı katı faza tutunurlar. Histidin moleküllerinin fazlalığı hem afiniteyi artırmakta hemde protein molekülünde olabilecek sayıca daha az olan histidin molekülleriyle yarışarak kontaminant protein bağlanmasını önlemektedir.

Yüksek pH'da bağlanan rekombinant protein, yıkama ve elüsyon adımlarına doğru pH'sı giderek düşürülen tamponlarla veya artan imidazole konsantrasyonu ile, protein



Şekil 4. Histidin ve Ni-NTA birleşimini

matriksi bırakarak elüe olur. Kontaminant proteinlerin bağlanmasını engellemek için gerekirse belirli miktarlarda imidazol tamponlara ilave edilebilir. Histidin analogu olan bu molekül sondaki yıkama adımları ile kolayca uzaklaştırılabilir.

2.8. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, bir canlıdan herhangi bir yolla yalıtılan bir genin uygun bir konağın içerisine sokularak orada çoğaltılmasını ve bazen de ifade edilmesini amaçlayan çalışmalara ait tekniklerin toplamıdır. Belirli bir amaç için doğrudan genetik materyal üzerinde yapılan bu teknolojiyle, *in vitro* şartlarda genetik materyalde planlı değişiklikler yapılabilmekte, istenilen genlerin istenilen canlıya sokularak, doğal biçimde bulunmadığı bu konakta çoğaltılması ve istenilen ürünü vermesi için nakledilen genin ifadesi sağlanabilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi özellikle 1960'lı yılların sonlarına doğru DNA ile ilgili bazı enzimlerin etki mekanizmalarının anlaşılması sayesinde gerçekleştirilen bir dizi yöntemleri kapsamaktadır. Bununla birlikte bu süreç 1940'lardan 70'lere kadar moleküler biyolojinin gelişmesini sağlayan bilgi birikimi de rekombinant DNA teknolojisinin temelini oluşturmuştur. Genetik çeşitlenme olaylarının yapay olarak gerçekleştirilmesi esasına dayanan rekombinant DNA teknolojisine (rDNA) ilişkin ilk çalışmalar, 1973 yılında başta Cohen olmak üzere bir araştırma grubunun önderliğinde *in vitro* koşullarda gerçekleşmiştir. Buna göre doğada eldesi imkânsız olan yeni gen düzenlemelerinin yapılması bu teknolojiyle sağlanabilmekte, bir canlının genotipi önceden belirlenebilmekte ve yönlendirilebilmektedir [51].

Rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretimi şu aşamalardan oluşmaktadır.

- Protein gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması
- Ligasyon
- Transformasyon
- Protein ekspresyonu
- Protein saflaştırılması.

2.8.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR: Polymerase Chain Reaction) spesifik bir DNA'nın belirli uzunluktaki bir hedef bölgesinin dizinini (kalıp) hücre-dışında yüksek derişimde

çoğaltmak için etkili bir yöntemdir. Hedef DNA dizininin derişimi, PZR tepkimesi ile her döngüsü üç basamaktan oluşan çok sayıda (30-60 döngü) ardışık döngü ile artırılır. PZR tepkimesi ile gen derişiminin artırılmasının temeli DNA polimeraz enzimi ile ssDNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla DNA parçasının derişiminin artırılmasıdır. PZR ile hedef genin derişiminin artırılabilmesi için hedef genin her iki ucundaki DNA dizininin tamamlayıcısı olan, uygun koşullarda hedef ssDNA'nın uçlarına bağlanabilen, 3'-hidroksil uçlarından sentezin başlamasını ve devam etmesini sağlayan primerler tasarlanır. Ayrıca bu primerler klonlama için uygun restriksiyon enzim konumlarını da gerekirse içermektedir. Birbirinden sıcaklık etkisiyle ayrılmış iki DNA zinciri de primerler yardımıyla çoğaltılması sırasında kalıp olarak kullanılabilir. Bir PZR işlemindeki her döngü üç önemli basamaktan oluşmaktadır. Bunlar:

1. **dsDNA'dan ssDNA oluşması:** PZR sisteminde ilk basamak, tepkime karışımının sıcaklığının 94°C'ye çıkarılmasıyla dsDNA'dan ssDNA oluştuğu basamaktır. Hedef DNA'ya ek olarak tepkime kabında primerler, dört dNTP ve Taq DNA polimeraz enzimi de bulunmaktadır. Sıcaklık 94°C'ye çıkarıldıktan sonra tepkime kabı 1dk bu sıcaklıkta bekletilir.
2. **Primerin bağlanması:** İkinci basamakta, sıcaklık 94°C'den primerlerin yapışma sıcaklığına (50-60°C) düşürülür. Böylece primerler hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelerine bağlanırlar.
3. **DNA sentezi (dsDNA'nın oluşması):** Son basamak olan üçüncü basamakta, sıcaklık Taq DNA polimerazın katalitik fonksiyonu için optimum olan 72°C'ye çıkartılır ve böylece herbir primerin 3'-hidroksil grubundan DNA sentezi başlar. DNA sentezinin tamamlanması için gerekli süre hedef DNA'nın büyüklüğüne (1dk/kb) bağlı olarak değişir [52].

2.8.2. Vektörler

Bakterilerdeki temel genetik bilgiler kromozomda bulunur. Bakterilerin çoğu büyük DNA kromozomuna ek olarak, bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, sitoplazma içinde serbest olarak bulunan, kendi kendilerini replike edebilen 1-100 kb büyüklüğünde plasmid adı verilen dairesel DNA molekülleri içerir. Plasmidler, içinde buldukları konakçı hücre ile uyum içinde yaşarlar. Plasmidlerin en önemli özelliği, bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olabilmeleri ve kendi replikasyonlarını kontrol edebilmeleridir [53]. Plasmidlerin büyüklüğü idealde 10 kb'ı geçmemelidir. Çünkü büyük DNA moleküllerinin saflaştırma sırasında kırılma olasılığı vardır, ayrıca büyük plasmid molekülleri çok zor

manipüle olurlar. Plasmidler genellikle bir veya bir kaç gen taşırlar ve bu genler konakçı bakterinin belirli karakteristik özellikleri göstermesine neden olurlar. Örneğin; Kanamisin veya ampisilin gibi antibiyotiklerin toksik derişimlerinde bakterilerin yaşamlarını sürdürebilme kabiliyetleri genellikle bakterilerde bulunan plasmidlerin taşıdığı antibiyotik direnç genleri ile sağlanmaktadır. Plasmidler hücrede sabit ve karakteristik bir kopyalama sayısında muhafaza edilirler. Yani bu sayı nesilden nesile sabit olarak kalır. Kopyalama sayısı plasmidlerde bulunan genler tarafından belirlenir fakat konakçı hücre ve çoğalma koşullarından etkilenir [53].

Genellikle bakteriyel plasmidler hücre-içinde dairesel DNA molekülleri olarak bulunurlar. Plasmidler kopyalama sayısına göre düşük (low) ve yüksek (high) kopyalama sayılı olarak iki gruba ayrılır. Bu sınıflandırma oldukça geniştir. Plasmidlerin transfer şekli, sıklığı, antibiyotik dirençliliği gibi bazı özelliklerine göre daha detaylı bir sınıflandırma yapmak mümkündür.

2.8.3. Gen klonlama

Gen klonlama işlemi bir genetik bilginin tam bir eşinin aseksüel üretilmesidir. PZR ile genetik bilginin çoğaltılmasını takiben gen klonlama deneyindeki temel adımlar şunlardır;

- Rekombinant DNA molekülü oluşturmak için klonlanacak geni içeren DNA'nın 'vektör' olarak adlandırılan sirküler DNA molekülünün içine yerleştirilmesi
- Vektörün konak hücre içine aktarılması (Transfeksiyon veya transformasyon)
- Konak hücrede rekombinant DNA molekülünün çoğaltılması (hem vektör hemde taşıdığı gen)
- Hücre bölündükçe rekombinant DNA molekülü kopyalarını yeni hücrelere aktarılması
- Konak hücrelerin büyük miktarlarda üretimi (koloni veya klon)

PZR ürünleri bir veya iki restriksiyon enzimi ile yapışkan ya da küt uçlar oluşturacak şekilde kesilir. Kesilmiş PZR ürünleri ve vektör uygun şartlar ve oranlarda DNA ligaz enzimi aracılığıyla bir araya getirilerek rekombinant DNA molekülü oluşturulur. İçinde bizim istediğimiz DNA molekülü olan vektör konak hücreye aktarılır ve seçici bir ortamda konak hücrelerle beraber çoğaltılır.

Moleküler klonlama işlemleri 3 yöntemle yapılmaktadır. Bunlar klonlanacak olan genin bağlanılacak olan vektöre göre farklılık göstermektedir.

- T/A klonlama
- Yapışkan uç oluşturarak klonlama
- Küt uç oluşturarak klonlama yöntemleriyle yapılmaktadır.

T/A klonlama

T/A klonlamada restriksiyon endonükleaz enzimlerine gerek yoktur. Bu klonlama 3'-A uzantısına sahip çift iplikli PZR ürünleri oluşturan ve 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmayan DNA polimeraz kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Yapışkan uç oluşturarak klonlama

Klonlamada yararlanılan bazı restriksiyon endonükleazlar bakteri genomunda kesme yaptıktan sonra oluşan segmentlerin uçları bir birinin komplementeri olup yapışkan bir özellik taşırlar (yapışkan uçlar, cohesive ends). Oluşan bu serbest uçlar tekrar birleşebilir ve sirküler bir durum alabilirler (resirkularizasyon). Bu özelliğe, vektör DNA'sında da rastlanır. Her RE'nin kesiş yeri farklı olduğu gibi oluşturduğu yapışkan uçların baz sıraları ve sayıları da değişiktir.

Gerek bakteriye ait DNA segmentlerinin ve gerekse vektör DNA'sının kendi aralarında tekrar birleşmesi, rekombinant DNA molekülü elde etmede güçlükler yaratmakta ve gen segmentinin vektörle birleşmesini önlemektedir. Bu olumsuz duruma mani olmak için bazı metotlardan yararlanılır.

Eğer genomik DNA (bakteri kromozomu veya konakçı organizmanın kromozomu), bir kesim enzimi ile kesilmişse, kesik yerlerin uçlarında birbirinin komplementeri olan ve kolayca birleşen iki yapışkan uç meydana gelir. Bu yapışkan uçlar kendine komplementer olan başka gen parçalarına bağlanma eğilimi göstermektedir. Böylece vektörde bulunan aynı uç kısımlara komplementer olan yerler birleşecektir. Birleşen bu uçlar daha sonra halkasal yapıya dönüşerek kendini tamamlar.

Küt uç oluşturarak klonlama

Tip II enzimlerden, EcoRV, HaeIII ve PvuII gibi enzimler ise; DNA'da küt uç oluşturacak şekilde kesim yaparlar. Bu tür uçların ligasyon etkinlikleri düşüktür. Ayrıca belirli bir enzimle kesilmiş bu uçların başka enzimle şekillenen küt uçlarla da yapışmaları mümkündür. Bu tür uçlar genellikle klonlama çalışmalarında önerilmemektedir. Ancak,

bunlar özellikle DNA parçalarının ucuna bir ya da birden fazla RE tanıma bölgesi bağlamak için kullanılmaktadırlar

Restriksiyon kesim enzimleri

Restriksiyon enzimleri; metilaz aktiviteleri, alt ünite yapıları, kesim özgüllükleri ve kofaktör ihtiyaçlarına göre; tip I, tipII, tip III ve homing endonükleazlar olarak incelenirler, klonlama için en az bir restriksiyon enzimine ihtiyaç vardır.

a- Tip I enzimler: Hem metilasyon hemde modifikasyon yapan enzimlerdir. Bu enzimler aktiviteleri için 5- adenzimetionin, ATP ve Mg^{++} 'a gereksinim duyarlar. Hedef dizideki adenin rezidülerini metilasyona uğrattırır ve kesimleri rastgele olmaktadır. Kesim olayında belirleyici faktör enzimin metilasyon aktivitesidir.

b- Tip II enzimler: Tam hedef nükleotidden kesim yapma özellikleri nedeni ile klonlama ve moleküler biyoloji araştırmaları için ideal enzimlerdir. Tip II RE Mg^{+2} iyonlarının varlığında çift iplikli DNA üzerindeki palindromik dizileri tanıyan ve bu diziyi içindeki özel bir bölgeden kesen enzimlerdir. Tip II RE'ler kesim sonucunda DNA'da oluşturdukları uçların motiflerine göre iki alt gruba ayrılmaktadır:

Yapışkan uç (sticky end): Bu enzimlerin oluşturduğu uçların ligasyon etkinlikleri yüksektir. Bu nedenle klonlama çalışmalarında tercih edilmektedirler.

Küt uç (blunt end): Bu tür uçların ligasyon etkinlikleri düşüktür. Bu tür uçlar genellikle klonlama çalışmalarında önerilmemektedir. Ancak, bunlar özellikle DNA parçalarının ucuna bir ya da birden fazla RE tanıma bölgesi bağlamak için kullanılmaktadırlar

Gerek yapışkan uç gerekse küt uç oluşturan RE'lerinden bazıları DNA üzerinde aynı dizileri tanıyabilmektedirler.

c-Tip III enzimler: Tip I'ler gibi bunlar da metilasyon ve modifikasyon yapabilen çok fonksiyonlu enzimlerdir ve ATP'ye bağlı kesim gerçekleştirmektedirler. Bu enzimler DNA'ya tanıma bölgelerinden bağlanmalarına rağmen kesimi farklı bölgeden ve rastgele yapmaktadır. Kesim tanıma bölgesine yakın bir konumda gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle tip III enzimler klonlamada kullanılmamaktadır.

d-Homing endonükleazlar: Diğer restriksiyon enzimlere kıyasla iyi derecede korunmuş ve benzerlik gösteren protein yapılarına (LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H, Ile-Cys) sahip, uzun (12-40 baz çifti) ve asimetrik bölgeleri tanıyıp kesen, aktivitesi için protein ve RNA'ya

ihtiyaç duyan enzim grubudur. Tüm biyolojik sistemlerde (bakteri, ökaryot, alg) bulunmaktadır.

Restriksiyon enzimlerinin star aktivitesi: Restriksiyon endonükleazların karaktersitik özelliklerinden biri, bu enzimlerin optimum koşullarda özgül DNA'yı en yakın dizilimden ayırt edebilme güçleridir, optimal olmayan koşullarda oldukça değişmesidir. Örneğin, EcoRI enziminin tanıma bölgesi (5'-GAATTC-3')'ne bağlanma oranı en yakın tanıma bölgesi (5'TAATTC)'ne göre 105 kat daha fazladır. Fakat, enzim için optimum olmayan koşullar altında bu oran oldukça değişmekte ve pek çok enzim için bu durum söz konusu olmaktadır. Benzer bölgeleri kesme işlemine, bir enzimin star aktivitesi denilmektedir. Bu durum moleküler biyoloji çalışmalarında oldukça önemli olmaktadır. Bu nedenle kullanılan enzimlerin star aktiviteye sahip olup olmadıkları bilinmelidir. Restriksiyon enzimlerinin içinde klonlanacak DNA dizisini istenmeyen bir noktadan kesen enzimler kullanılmamalıdır. Çoğaltılacak gen bölgesi için kullanılacak primerlerin uçlarında restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri bulunmalıdır. Hem klonlama vektörü hem de klonlanacak gene ait PZR ürünleri restriksiyon enzimleriyle, uygun şartlarda kesilirler.

Ligasyon

Rekombinant DNA molekülünün oluşumundaki son adım kesilmiş vektör ve kopyalanacak DNA'nın uygun şartlarda bir araya getirilmesidir. Sonrasında ligaz enzimi nükleotidler arasında fosfodiester bağları (çift iplikli DNA'nın 5' ucunda yer alan fosfat grubunun ATP ile 3'-OH grubuna bağlaması) kurarak açık uçları kapatır. Yapışkan uçlar ligasyon etkinliğini arttırmaktadır. Bağlamadaki sorunlardan biri vektörün yabancı DNA'ya bağlanması yerine kendi uçlarının birleşip halka şeklini kazanmasıdır, bunu engellemek için yapılan uygulamalardan biri, vektörün 5' uçlarındaki fosfat gruplarının yok edilerek fosfodiester bağ oluşumunu önlemektir.

Ligasyon tepkimesinin gerçekleşmesi için ortamda ng mertebesinde makromolekül DNA bulunur. Makromoleküllerin klonlanması için klonlanması gereken iki makromolekülün klonlanması gereken uçlarının karşı karşıya gelmesi gerekmektedir. Bu olasılığın düşük olması klonlama tepkimelerinin gerçekleşme olasılığını da azaltmaktadır. Ligasyon tepkimesinde ortamda bulunan vektörün ve genin derişimi çok önemlidir. Vektör ve gen derişimleri DNA parçalarının büyüklüğüne göre değiştiğinden bunların uygun derişimleri optimize edilmelidir [54].

Transformasyon

Rekombinant DNA molekülünü içine alabilmesi için uygun hale getirilmiş konak hücrelere (kompetan hücre) ligasyon ürününün aktarılmasıdır. Hücrelerin kompetan hale getirilmesi için temel olarak 2 yöntem vardır. Elektroporasyon (düşük voltajlı elektrik akımı) ve CaCl_2 . Ligasyon ürünü ve kompetan hücreler uygun şartlarda inkübe edilir. Bu yöntem ile ilgili birçok yöntem (protokol) bulunmaktadır. Bunlardan en uygunu ve en çok kullanılanı, *Escherichia coli* hücrelerinin CaCl_2 ile yıkanması ve $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildikten sonra plasmid DNA ile aynı ortama konulup, 42°C 'de 1-2 dakika bekletilerek ısı şokuyla plasmid DNA'nın hücreye transferidir.

Transfer yapıldıktan sonra hücreler katı ortamda uygun bir işaretleyici antibiyotik kullanılarak çoğaltılırlar. Bu yöntemde hücrenin, istenen DNA molekülünü hangi mekanizma ile içine aldığı halen bilinmemektedir. Protoplast transformasyon yönteminde bakterilerin hücre duvarı kısmen lizozim enzimi ile- enzimatik olarak hidroliz edilir. Ortamda osmotik stabilizatörlerin sakkaroz gibi bulunması durumunda, hücrelerin parçalanmaları önlenir. Transformasyon için diğer bir teknik de elektroporasyondur. Bu yöntemde pulse etkiyle yüksek voltaj uygulanarak DNA istenen hücreye transfer edilir. Bu yöntemde de hücrenin hangi mekanizma ile DNA'yı aldığı henüz bilinmemekle birlikte hücre zarında bulunan porların elektrik akımından dolayı büyüdüğü düşünülmektedir [55].

Kolonilerin seçimi

Ligasyon ürününün aktarıldığı konak hücrelerinin seçilimi için bu hücreler uygun besiyeri ve inkübasyon şartlarında tutulur. Çoğu plazmid klonlama vektörü konak hücreye antibiyotik direnci veren en az bir gen taşımaktadır. Bu antibiyotikleri içeren seçici ortamlar da inkübe edilirler fakat bu konak hücreler zamanla antibiyotik etkisini önleyen enzimler salgılayabilir. Bu yüzden transformasyonu takiben seçici ortama alınmalıdırlar. Bu seçici ortam istenilen konakçı hücreler için en ideal şartlara sahip olmalı ve diğer hücreler için durdurucu veya öldürücü etkiye sahip olmalıdır. Ayrıca bu ortamlara eklenen farklı antibiyotikler de ortamın seciciliğini arttırmaktadır.

2.8.4. Gen ifadesi ve protein biyosentezi

Gen ifadesi ya da Gen ekspresyonu, DNA dizisi olan genlerin, fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesi süreci için kullanılan bir terimdir. Basitçe, bu durum genlerin açık (aktif) olup olmadıkları olarak da tanımlanabilir. DNA'nın farklı genlere karşılık gelen

bölgelerindeki baz dizilişleri, o gen tarafından şifrelenen proteinin aminoasit dizisini belirler. DNA'daki baz dizilişlerinin proteinin amino asit dizisini nasıl şifrelediği genetik ve biyokimyasal yöntemlerin birlikte kullanılması ile ortaya konulmuştur. İnsanda bulunan yaklaşık 30 bin genin hepsi, aynı anda aktif olarak bulunmayabilir. Gen ifadesinin her adımı, transkripsiyondan post-translasyonel modifikasyona kadar adımlarda değişebilir. Gen düzenlenmesi, hücreye; hücre farklılaşması, morfogenezis ve canlıdaki çok yönlü adaptasyonun temellerini oluşturan, yapı ve fonksiyonların kontrolünü verir [56].

Gen ifadesinin düzenlenmesi

Gen ifadesinin düzenlenmesi ya da gen ifadesinin denetimi, hücrelerin ve virüslerin genlerindeki bilgiyi gen ürünlerine çevirmesini kapsayan süreçler için kullanılan bir terimdir. İşlevsel bir genin ürünleri RNA veya protein olabilir; bilinen mekanizmaların en temeli protein kodlayan genlerin düzenlenmesidir. Gen ifadesinin, DNA-RNA transkripsiyonundan, proteinin translasyon sonrası değişimlerine kadar olan herhangi bir adımı değiştirilip, ayarlanabilmektedir.

Gen düzenlenmesi, hücrenin ihtiyacı olduğunda proteinlerin sentezlenmesine izin vererek bir canlının değişkenliğini ve uyumunu artırabildiği için; virüsler, prokaryotlar ve ökaryotlar için gerekli bir işleyiştir. Dahası; gen düzenlenmesi, hücresel farklılaşma ve morfogenezin işleyişlerini, çok hücreli canlılarda hücrelerin farklı tiplerinin hepsi temelde aynı genom dizisine sahip olmalarına karşın, farklı gen ifadelerini sergiledikleri farklı hücre tiplerinin oluşumuna öncülük ederek kontrol etmektedir.

Gen denetimi sisteminin Jacques Monod tarafından ilk keşfedilen örneği, sadece laktozun varlığı ve glukozun yokluğunda *Escherichia coli* tarafından ifade edilen proteinlerle ve laktoz metabolizmasıyla ilişkili olan lac operonudur.

Gen ifadesinin, DNA RNA transkripsiyonundan, proteinin translasyon sonrası değişimlerine kadar olan herhangi bir adımı değiştirilip, ayarlanabilir. Gen düzenlemesinin yapıldığı basamakların listesi şu şekildedir:

- Kromatin bölgeleri
- Transkripsiyon
- Transkripsiyon sonrası değişimler
- RNA taşınımı

- Translasyon
- mRNA bozulumu
- Translasyon sonrası değişimler

Ökaryotlarda, DNA'nın geniş bölgelerine erişim, DNA metilasyonu, ncRNA ya da DNA'ya bağlanan proteinler tarafından yönlendirilen, histon modifikasyonlarının sonucu olarak değiştirilebilen kromatin yapısına bağlıdır.

DNA metillenmesi gen susturmanın yaygın bir yöntemidir. DNA sıklıkla, CpG dinükleotid dizisindeki (kümelendiklerinde "CpG adacıkları" olarak da bilinir) sitozin nükleotidlerinde bulunan metiltransferaz enzimleri tarafından metillenir. Metillenmiş sitozin kalıntıları bu işlemlle değiştirilemezken, metillenmemiş olanlar urasile dönüştürülebilir. Normal olmayan metilasyon kalıpları karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir.

DNA'nın metilasyona verilen (bir promotor olabilen) bölgesinin örnek analizi, bisülfid haritalaması olarak bilinen yöntemle yapılabilir. DNA dizilemesi ya da miktarı belirleyen SNP'lerle geliştirilmiş Pyro-dizileme (Biyotaj), MassArray (Sequenom) gibi metotların analizleri arasındaki farklılıklar, CG dinükleotidindeki C/T miktarlarını yaklaşık olarak ölçmelerinden kaynaklanmaktadır.

DNA'nın yazılımı (transkripsiyonu), kendi yapısı tarafından belirlenmektedir. Genelde, DNA paketinin yoğunluğu, yazılımın sıklığını belirleyen etkidir. Oktamerik protein kompleksleri "nükleozom" olarak isimlendirilir ve DNA'nın süper-kıvrımlarının bir miktarından sorumludur ve bu kompleksler fosforilasyon ya da daimi olan değiştirme yapan metilasyon olarak bilinen süreçlerle düzenli olarak değiştirilebilmektedir. Böyle değişimlerin genin ifadesinin seviyelerindeki az veya çok kalıcı değişimlerden sorumlu olduğu düşünölmektedir.

Histon asetilasyonu da transkripsiyondaki önemli başka bir süreçtir. CREB bağlayan protein gibi histon asetiltransferaz enzimleri de (HATlar), transkripsiyonun devam etmesine izin vererek DNA'yı histon kompleksinden ayırır.

Çoęunlukla DNA metilasyonu ve histon deasetilasyonu gen susturmada birlikte çalışırlar. Bu ikilinin birlikte çalışması, gen ifadesini zayıflatarak, DNA'nın daha yoğun paketlenmesinin sinyali gibi görünmektedir.

Transkripsiyonun düzenlenmesi transkripsiyonun gerçekleşme zamanını ve oluşacak RNA miktarını kontrol eder. Bir genin RNA polimeraz tarafından transkripsiyon en az beş mekanizma tarafından düzenlenebilir. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir.

Özgül faktörler: Bağlanma uygunluğunu artırarak ya da azaltarak RNA polimerazın belli bir promotor ya da promotor grubuna özgülüğünü değiştirir(örn. prokaryotik transkripsiyon da kullanılan sigma faktör).

Baskılayıcılar: DNA ipliğinde promotor yakınında ya da promotor bölgesinde bulunan kodlanmayan dizilere bağlanarak RNA polimerazın iplik boyunca ilerleyişini ve böylece genin ekspresyonunu engellerler.

Genel transkripsiyon faktörleri: Bu transkripsiyon faktörleri RNA polimerazı protein kodlayan bir dizinin başlangıcına yerleştirir ve sonra mRNA'yı transkribe etmesi için polimerazı serbest bırakır.

Aktivatörler: RNA polimeraz ve belli bir promotor arasındaki etkileşimi artırır, genin ekspresyonunu teşvik eder. Aktivatörler bunu RNA polimerazın promotora cazibesini artırarak (direkt RNA polimerazın alt birimleri ile etkileşime girerek ya da indirekt olarak DNA'nın yapısını değiştirerek) yaparlar.

Protein biyosentezi

Protein biyosentezi, hücrenin protein sentezlenmesi için gereken bir biyokimyasal süreçtir. Bu terim bazen sadece protein translasyonu anlamında kullanılsa da transkripsiyon ile başlayıp translasyonla biten çok aşamalı bir süreçtir. Prokaryotlarda ve ökaryotlarda ribozom yapısı ve yardımcı proteinler bakımından farklılık göstermesine karşın, temel mekanizma korunmuştur. Protein biyosentezi için aminoasit-tRNA'ların hazırlanmasında ya da sentez süresince ATP ve GTP hidrolizi ile yüksek miktarda enerji harcanır. Ayrıca, hücreler ürettikleri enerjinin büyük kısmını protein sentezinde görev alan yapıları oluşturmakta kullanırlar. Bu sürecin genel hata oranı 10⁻⁴ civarındadır (her 10000 amino asitten bir hatalı yerleştirilir). Bazı antibiyotikler protein sentezine müdahale ederek etki gösterirler.

Genetik bilgi akışında sıra protein sentezine geldiğinde mesajcı RNA (mRNA)'dan başka taşıyıcı RNA (tRNA) da devreye girerek ribozomlarda protein sentezi gerçekleşir. mRNA da yer alan kodonların taşıdığı genetik mesaj ribozomlarda adım adım deşifre edilerek

uygun amino asitler tRNA vasıtasıyla ribozoma getirilir. Hücre sitoplazmasında 20 çeşit aminoasil-tRNA ların ribozomda bağlanabilecekleri çeşitli bölgeler bulunur ve amino asitlerini bırakan tRNA'lar ribozomlardan ayrılırken polipeptid zinciri de sentezlenmiş olurlar. tRNA'lar üzerinde yer alan nükleotitlere antikodon adı verilir. Örneğin, UUU şeklinde olan bir mRNA zincirine uyan tRNA antikodonunun nükleotid sırası AAA şeklindedir. UUU şeklinde bir kodon da fenilalanin adlı aminoasitin şifresidir.

Taşıyıcı RNA (tRNA), translasyon sırasında büyüyen polipeptid zincirine özel amino asitlerin eklenmesini sağlayan küçük bir RNA zinciridir (74-93 nükleotid). Yapısında amino asit bağlanması için bir bölgesi ve mRNA üzerindeki kodon alanına bağlanmasını sağlayan antikodon alanı vardır. Her tRNA molekülü sadece bir amino aside bağlanabilir fakat genetik kodun dejenere olması (yani genetik kodun aynı amino asidi belirten birden çok kodon içermesi) yüzünden farklı antikodonları oluşturan birçok tRNA tipi aynı amino asidi taşıyabilir.

Taşıyıcı RNA, mRNA'daki kodon dizisini tanımaya aracılık eden, kodonun uygun amino aside translasyonuna izin veren ve Francis Crick tarafından hipotezi kurulan "adaptör" molekülüdür. Yaklaşık 80 nükleotid uzunluğunda tek zincirli bir yapıdadır. Farklı tRNA bölgeleri, hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlanmış haldedirler. tRNA'nın 3' ucu CCA nükleotid dizisine sahiptir ve burası amino asitlerin bağlandığı bölgedir. Antikodonlar 3'->5' yönünde, mRNA'da kodonlar 5'->3' yönünde okunur. Örneğin, antikodon baz sırası 3'-AAG-5' ise, mRNA'daki kodon 5'-UUC-3' biçimindedir. mRNA'daki her bir amino asit kodonuna özgü bir tRNA olsaydı, 61 çeşit tRNA olması gerekirdi. Oysa tRNA çeşidi yaklaşık 45'tir. Bunun sebebinin, aynı antikodon bölgesine sahip olarak hazırlan tRNA'ların, verilen amino asitlere uyumlu olarak birden çok kodonu tanıma yeteneğinde olduğu gösterilmiştir. Kodonların 3. pozisyonundaki baz ile onun antikodonundaki eşi olan 1. baz arasında standart olmayan bir baz eşleşmesi veya "oynaklık" özelliği nedeniyle bir tRNA çok sayıda kodonu tanıyabilir. Bu konuda en değişken tRNA, oynak pozisyonunda inosin (I) bulunduran tRNA'lardır. İnosin, 2. karbon atomunda amino grubu taşımayan bir guanin analogudur. tRNA antikodonunun oynak pozisyonundaki inosin ile adenin, sitozin veya urasil ile eşleşebilir. Örneğin, tRNA antikodonu CCI olan bir tRNA, GGU, GGC ve GGA şeklindeki mRNA kodonlarına uyup, glisin amino asidini büyümekte olan protein zincirine katabilir.

2.8.5. Rekombinant DNA teknolojisi ile enzim üretimi

Enzim üretimi biyoteknolojinin büyüyen bir alanıdır. Dünyada yapılan patent başvuruları ve bu konunun araştırılması ile ilgili yayınlar yıldan yıla artmaktadır. Enzim üreticilerinin çoğu farklı fermantasyon teknikleri ile üretimlerini gerçekleştirmektedirler [57].

Mikrobiyel enzimler, doğal ya da rekombinant olsalar da kontrol altında tutulan koşullardaki fermantasyon işlemi ile üretilirler. Enzim üretimini en üst seviyeye çıkarmak için, sıcaklık, pH, havalandırma gibi parametreler kontrol altında tutulurken, fermantasyon ortamının içeriğindeki bileşenler de çok iyi seçilmiş olmalıdır. Dekstroz, nişasta, yeast ekstrakt, amonyum, üre ve mineraller bir fermantasyon ortamında en sık kullanılan bileşenlerdir. Köpük kırıcı ajanlar, pH düzenleyiciler de bir fermantasyon ortamında bulunurlar. Tüm bu bileşenler enzim üretimini etkilemektedir [58].

Natarajan ve Rajendran'ın 2009'da yaptıkları çalışmada fermantasyon koşullarının *Lactobacillus plantarum*'dan tannaz üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır ve kültürün kompozisyonu, substrat konsantrasyonu ve kültür koşullarının (pH, sıcaklık, havalandırma vs.) enzim üretimini etkilediğini belirtmişlerdir [59]. Yine Sanchez ve ark. 1999'da *Candida rugosa*'dan lipaz üretimi üzerine fermantasyon koşullarının etkisini araştırmışlar ve farklı koşullar altında enzimin farklı aktivitelere sahip olduğunu belirtmişlerdir [57]. Günümüzde üretilen rekombinant enzimlerin çoğu ekstraselülerdir ve fermantasyon ortamına bırakılırlar. Enzim, hücresel kütleden ayrılır, çözdürülür ve konsantre hale getirilir. Son ürün, organizmanın ürettiği metabolitleri veya fermantasyon veya 5 proste kullanılan bileşenleri de içerebilir [58]. Bu sebeple üretimin ardından enzimlerin içeriği test edilmektedir [60].

2.9. Oksalat Dekarboksilaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Oksalat dekarboksilaz enzimi birçok canlıda izole edilmiş bazısında da bu enzimi kodlayan genler izole edilip çeşitli vektörlere aktarılıp yine çeşitli konakçılara aktarılıp ifade ettirilmiştir. Her canlıda izole edilen veya ifade ettirilen enzim karakteristik olarak farklılıklar içerebilir.

Bir mantar türü olan *Collybia velutipes*'den izole edilen Oksalat dekarboksilaz enzimini kodlayan genler maya türü olan *Schizosaccharomyces pombe* pETZ18U vektörü kullanılarak aktarılmıştır. Elde edilen enzim yaklaşık 55 kDa büyüklüğünde olup aktitesinin en optimum olan pH noktası 3.0 olarak bulunmuştur [61].

Türkiye'de en çok bilinen ve kültür mantarı olarak da adlandırılan bir mantar türü olan *Agaricus bisporus* ile yapılan bir çalışmada miselleri toplanmış ve sıvı kültür ortamında büyütülmüştür. Daha sonra 2 hafta boyunca aralıklarla örnek alınmış ve 7 gün sonraki ortamda oksalat dekarboksilaz aktivitesine sahip enzim tespit edilmiştir. SDS-PAGE ve Western Blot teknikleriyle karakterize edilen enzim *Collybia velutipes*'den elde edilen antikor ile 64kDa olduğu belirlenmiştir. Ayrıca meyve yapısında ve şapka kısmında da bu enzimin varlığı tespit edilmiştir. Optimum pH 3.6 ve sıcaklık ise 35°C olarak belirlenmiştir [62]

Jessi A. Micales tarafından yapılan bir çalışmada kahverengi odun kök çürüğü mantarlarından olan *Postia placenta*'nın yüksek ve düşük miktardaki çürüklerinden elde edilen izolatlarından oksalat dekarboksilaz enzimi izole edilmiştir. Enzim oksalik asit varlığında artmış ve büyümeyi engellemiştir. Bu enzimin varlığı hipal yüzey ve hipal korumayla ilişkilendirilmiştir [63].

1993 yılında birinde oksalat oksidaz değerinde ise oksalat dekarboksilaz enzimi içeren iki ticari kit karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışmaya göre substrat içeren solüsyonlardaki aktivite esnasında oksalat dekarboksilaz enzimi içeren kitde verim %94 bulunmuştur. Oksalat oksidaz içeren kit %68'lik bir verim ile daha düşük bulunmuştur. 2224µmol/L'lik lineariteye sahip olan oksalat dekarboksilaz içeren kit yine 890µmol/L'lik bir lineariteye sahip olan oksalat oksidaz enzimi içeren kitten daha yüksek lineariteye sahip olmuştur. Çalışmada ayrıca kitlerin askorbik asit ile o interferans ilişkisi çalışılmıştır. Oksalat oksidaz enzimi içeren kit pozitif yatkinlik göstermesine rağmen oksalat dekarboksilaz enzimi içeren kit negetaif yatkinlik göstermiştir [64].

Bir başka çalışmada *Oxalobacter formigenes* bakterisinden alınan oksalat dekarboksilaz enzimini kodlayan genler memeli hücrelerine aktararak fonksiyonelliğini çalışılmıştır. Omurgalı hayvanlarda oksalatı parçalayacak bir enzim doğal olarak bulunmadığından dolayı böbrekte biriken oksalat taşları birikerek böbrek taşlarını oluştururlar. Araştırmada bitkisel oksalatı parçalayabilecek olan oksalat dekarboksilaz enzimini kodlayan genleri *Oxalobacter formigenes* bakterisinden alarak memeli hücrelerine aktarılmıştır. Böylece gen terapisi yaklaşımında bir adım olarak memeli hayvanlarda oksalat miktarını düşürücü bir etki sağlanabilirliği gösterilmiştir [65].

Qi-Zhi Chen ve Feng Hong 2008 yılında yaptığı çalışmada farklı mantar türlerinden oksalat dekarboksilaz elde etmişlerdir. Kök çürükçül mantarlarında bulunan hücre çeperi

nedeniyle enzim elde etmek oldukça zordur. Bu yüzden çalışmada farklı deterjanlar ve pH noktaları kullanılarak enzimin verimi artırılmıştır. Kullanılan ilk asetat tamponunda pH 4,0'da %30 verimle elde edilen enzim miktarı daha sonra sitrat tamponu pH 3.0'da %60'a çıkmıştır [66].

pDEST14 vektörü ile yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* M168 bakterisinden alınan yvrK proteinlerini kodlayan genler daha sonra *Escherichia coli* BL21 konakçı hücrelerine aktarılmış ve daha protein ifadesi yapılmıştır. Arabinoz ile indüklenen konakçı hücrelerden elde edilen yvrK proteini oksalat dekarboksilaz enzimi aktivitesi göstermiş ve ileride çalışılması düşünülen hiperoksalaria hastası farelerle yapılacak çalışmalara yol göstermiştir [67].



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Cihaz	Marka	Model
Santrifüj	Hermle	Z326R
Derin Dondurucu	Arçelik	2354 A+D
Dikey Jel Elektroforez Sistemi	Bio-rad	Mini Protean Tetracell
Isıtma Tablası	IKA	C-MAG HS 7
İnkübatörlü Çalkalayıcı	Stuart	SI500
Steril kabin	Biosafety Cabinet	Class II
Çeker ocak	Assist Lab	Standart çekerocak
Jel Görüntüleme Sistemi	Vilber Lourmat	Fx 7
Otoklav	Nüve	OT 40L/90L
PZR Cihazı	Applied Biosystems®	Veriti® Thermal Cyclers
Su Banyosu	Nüve	BM 15/30
Şırınga Filtreleri	Santa Cruz	UltraCruz® Syringe Filter, MCE
Ultrasonikatör	EngineerLive	UIP1000
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-1800
Yatay Jel Elektroforez Sistemi	Bio-Rad	The Mini-Sub® cell GT
Otomatik Pipetler	Axygen	
Buz Makinası	Scotsman	AF80
Distile Su Cihazı	Nüve	ND 12
Deiyonize Su Cihazı	Merck Millipore	Milli-Q Integral
Isıtıcı Blok	Stuart	SBH130
pH Metre	Hanna	HI 2209

Hassas Tartı	NHB	
Liyofilizatör	Labconco	Freeze Dryer
Otoanalizer	Abbott	c8000

3.1.2. Kimyasallar ve kitler

Tez çalışmasında kullanılan katı ve sıvı kimyasal maddeler aşağıda belirtilmiştir.

Kimyasal Adı	Marka
Affinite Kolonu	Thermo His-Pure Ni-NTA Chromotography Cartrige
100 bp DNA Ladder	Thermo
1000 bp DNA Ladder	Thermo
Protein Ladder	Thermo
10 mM dNTP Mix	BiotechRabbit
10x Taq DNA Polymerase Buffer	BiotechRabbit
2-Merkapto Ethanole	Sigma
β -Merkaptop Etanol	Sigma
APS (Amonyum Peroksidisülfit)	Sigma
Tryptone	Merck
Yeast Extract Granule	Merck
Bromofenol Blue	Santa Cruz
BSA (Bovine Serum Albumine)	Santa Cruz
D-Glukoz	AppliedBiochem
DMSO	AppliedBiochem
EDTA	AppliedBiochem
Etidyum Bromür	Santa Cruz
Glisin	Santa Cruz
Imidazole	Santa Cruz
IPTG Diaxone Free	Santa Cruz
Commasie Brilliant Blue	Santa Cruz
Isopropanol	Sigma

Gliserol	Sigma
Commasie Brilliant Blue R-250	Santa Cruz
Commasie Brilliant Blue G-250	Santa Cruz
K ₂ HPO	Merck
LB Agar	Merck
Kanamisin Sulfat	Merck
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Lizozim	Vivantis
MnCl ₂	Merck
Acrylamide	Sigma
BisAcrylamide	Sigma
NaAc	Merck
NaCl	Merck
Proteinaz K	Life
SDS (Sodium Dotesil Sulfate)	Sigma
T4 DNA Ligaz Tampon	Life
TEMED	Sigma
Trisma Base	Sigma
Trisma HCl	Sigma
H ₂ SO ₄	Sigma
HCl	Sigma
Triton X 100	Sigma
Tween – 20	Sigma
NaOH	Merck
Asetik asit	Merck
Champion pET-SUMO Protein Expression System	Invitrogen K300-01
GenElute HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma, NA0150
GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit	Vivantis GF-BA-100

3.1.3. Enzimler

Tez çalışmasında çeşitli enzimler kullanıldı. Bunlar;

Format dehidrogenaz: Tez çalışmasında kullanılan ticari bir enzimdir. Reaksiyon sonucunda oluşan format'ı karbondioksit ve H⁺ iyonlarına ayırır. Böylece ortamdaki NAD'ların NADH'a indirilmesi sonucunda 340 nm'de spektrofotometrik ölçümle ortamdaki formate miktarı ölçülebilir. Enzim ticari olarak Sigma firmasından 250U olarak satın alınmıştır. Enzim *Candida bounidi* mikroorganizmasından rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilmiştir.

Taq DNA Polimeraz: DNA replikasyonu sırasında ortamdaki nükleotidleri kullanarak polimerizasyonu sağlayan enzimdir. Ticari olarak Intron Bio firmasından satın alınmıştır. Enzim 5U/μl olarak kullanılmıştır. PZR uygulamalarında kullanıldı.

Lizozim: Bakterilerden protein ve DNA izolasyon sırasında kullanılan bir enzimdir. Ticari olarak liyofilize halde Vivantis firmasından satın alınmıştır. Toplamda 20 gram olarak temin edildi.

3.1.4. Primerler

Klonlanacak olan genin gen kaynağından temin edilmesi için kullanıldı. Primerler Sentromer DNA firması tarafından sentezletirilmiştir. Çeşitli yazılımlar kullanılarak tasarlanan primerler çift halinde Forward (İleri) ve Reverse (Geri) olarak sentezletirilir. Kullanılan primerler aşağıdaki gibidir.

Oligo Adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz Sayısı	Skala	MW (g/mol)	Tm (°C)	GC (%)	nmol
yvrK-Forward	ATG AAA AAA CAA AAT GAC ATT CCG	24	50 nmol	7371	54.2	29.2	62.1
yvrK-Reverse	TTA TTT ACT GCA TTT CTT TTT CAC TAC T	28	50 nmol	8436	56.3	25.0	53.1

Tablo 1. yvrK geni için belirlenen primerlerin özellikleri

Oligo Adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz Sayısı	Skala	MW (g/mol)	Tm (°C)	GC (%)	nmol
SUMO Forward	AGA TTC TTG TAC GAC GGT ATT AG	23	200 nmol	7094	57.1	39.1	54.4
T7 Reverse	TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG	20	200 nmol	6179	57.3	50	60.4

Tablo 2. pET-SUMO vektörü için kontrol amaçlı belirlenen primerlerin özellikleri

3.1.5. Mikroorganizmalar

Hem gen kaynağı hem de klonlama ve protein ifadesi için farklı mikroorganizmalar kullanıldı. Bunlar;

- *Bacillus subtilis* 168

Kirpikli bir basil olduğu için hareketli, sporları oval ve subterminaldir. Kapsülsüz, gram pozitif, aerob, oda sıcaklığı ve zenginleşmemiş besiyerinde kolaylıkla üreyebilen R tipi koloniler yapan saprofit yani doğada yaygın bulunan bir basildir. Oksijenli solunum veya geçici oksijenli solunum yapan, 20-30 derecede üreyen bir bakteri cinsidir. Vejetatif şekilleri dayanıksız olup, sporları bazen kaynama derecelerinde birkaç saat dayanabilirler. Doğada çok yaygın olarak bulunur. Panoftalmi ve İridosiklit gibi göz enfeksiyonlarına neden olur.

Bacillus subtilis 168 mikroorganizması The Ohio State Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümü Bacillus Genetik Stok Merkezinden satın alınmıştır.

- One Shot® Mach1™-T1R Chemically Competent *Escherichia coli*

Genotipi; F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 hsdR(rK- mK+) Δ recA1398 endA1 tonA şeklinde olan, Mach1™-T1R *Escherichia coli* suşu yabanıl W strain (ATCC #9637, S. A. Waksman) nin modifiye edilmesi ile sağlanmıştır. Bu hücreler klonlama amacıyla kullanılmaktadır. Protein ekspresyonu için kullanılmaz. *Escherichia coli*'nin bu suşu T7 RNA polimeraz içermez, fakat rekombinant plasmidin çoğalması ve stabil bir yapıda kalmasını sağlar. Ekspresyon vektörüne aktarım yapıncaya kadar rekombinant plasmid bu hücrede çoğaltılabilir ve muhafaza edilebilir. Bu *Escherichia coli* suşu rekombinant plasmidin kontrolü için gereklidir. Mach1™-T1R *Escherichia coli* hücrelerinde aşağıda verilen mutasyonlar sağlanarak çeşitli özelliklerin ortaya çıkması sağlanmıştır.

- lacZ Δ M15 gen bölgesi rekombinant plasmidin mavi /beyaz görüntülenmesini sağlayarak ayırımını sağlar.
- hsdR mutation; metillenmemiş PZR ürünlerinin etkili bir şekilde transformasyonunu sağlar.
- Δ recA1398 mutation; rekombinant klonda homolog rekombinasyonun oluşumunu azaltır.
- endA1 mutation; plazmidin ürün miktarını ve kalitesinin artışı sağlar.
- tonA mutation; T1 ve T5 fajlarına karşı direnç kazandırır.

- *Escherichia coli* One Shot® BL21(DE3) hücreleri

Genotipi F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3) şeklinde olan *Escherichia coli* BL21 (DE3) protein ifade konakçısı olarak kullanılmıştır. Bu hücreler yalnızca protein ekspresyonu için kullanılır. Klonlama için kullanılmaz. Bu rekombinant ırkta, protein ifadesi vektördeki T7 promotorunun kontrolü altındaki, T7 RNA polimerazı tarafından yapılır. Bakteri genomu ise; IPTG ile kontrol edilebilen yani uyarılabilen transkripsiyonu gerçekleştirilebilen T7 RNA polimeraz genini rekombinant olarak bulundurmaktadır. Burada kontrol edilebilen promotorun kullanılması rekombinant proteinin istenildiği anda üretilmesini sağlar. Vektörün üzerindeki bölgenin baskılanması ise lac repressör proteini tarafından yapılır. Vektörde ve *Escherichia coli* genomunda bulunan her iki T7 promotorunun kontrolü lac repressör proteinine bağlanarak onu inhibe eden yapay laktoz analogu olan IPTG (izopropil- β -D tiogalaktopirinosidaz) ile yapılabilir. *Escherichia coli* laktoz bulunmayan ortamda büyütüldüğünden lac repressör proteini laktoz ile inhibe edilemediğinden sürekli olarak her iki promotora bağlanarak hedef protein ile T7 RNA polimeraz genlerinin transkripsiyonunu engeller. Ortama IPTG eklendiğinde, lac repressör proteini IPTG'ye bağlanarak transkripsiyonel baskılamayı kaldırır ve T7 RNA polimeraz proteini üretilbildiğinden hedef rekombinant proteininin üretimi gerçekleştirilmiş olur [68].

DE3 lambda; DE3 lysogen genini içermesi anlamına gelmektedir. Bu gen lacUV5 promoter kontrolündeki T7 RNA polimerazın bağlanması için gereken gen bölgesini içerir. T7 RNA polimerazın aktifleşmesi için IPTG gerekmektedir. Bu *Escherichia coli* B/r suşu ion protease içermez. Ayrıca dış membran proteazında (OmpT) bir mutasyona sahiptir. Bu iki anahtar proteazın eksikliği, bu suş içerisinde üretilen heterolog proteinlerin yıkımını azaltır.

BL21(DE3) *Escherichia coli* içerisindeki heterolog genleri tarafından kontrol edilen bakteriyofaj T7'yi kullanır. pET SUMO vektöründe istenilen gen bölgesinin ekspresyonu T7 promatörü tarafından kontrol edilmektedir. T7 promatörü ise lac operator bölgesinin modifiye edilmesiyle sağlanmıştır. Bakteriyofaj T7 ve T7 promatör bölgelerinin ekspresyonu gen 10 (ϕ 10) tarafından kontrol edilmektedir. T7 RNA polimeraz promotörü özellikle bu bölgeyi tanır. İstenilen gen bölgesinin ekprese edilmesi için gerekli olan T7 RNA polimerazın sağlanması için hücrelerin polimeraz ekspresyonunun indüklenmesi ya da faj polimeraz ekspresyonu ile enfekte olması gerekmektedir. pET SUMO Sisteminde T7 polimeraz ihtiyacı

BL21(DE3) *Escherichia coli* suşunda düzenlenmiş bir şekilde sağlanmaktadır. Yeterli miktarda T7 RNA polimeraz imal edildiğinde, T7 promatör bölgesine bağlanarak istenilen genin transkripsiyonunu sağlar.

BL21(DE3) *Escherichia coli* suşu T7 gen bölgesinin düzenlenmesi için özellikle kullanılmıştır. Bu suş DE3 bacteriophage lambda lysogen taşıyıcıdır. Bu λ DE3 lysogen aşağıdaki unsurları içeren lac bölgesini içerir. lac represörünü içeren lacI geni, lacUV5 promoter kontrolünde bulunan T7 RNA polimeraz gen bölgesi ve lacZ genin küçük bir bölümü.

lacI geni; lac yapısı int geninin içerisine konulur. Bu tür lac yapıları int genini inaktive eder. Int geninin bozulması yardımcı faj yokluğunda faj eksizyonu (lisisini) önler. Lac I tarafından sentezlenen lac represör T7 RNA polimerazın ekspresyonunu baskılar. Karşılıksız indükleyici eklenmesi örneğin isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) eklenmesi lacUV5 promotör tarafından T7 RNA polimerazın eksprese edilmesini sağlar.

T7 lac Promoter: Yapılan çalışmalar λ DE3 lysogenindeki lacUV5 promotörünün indükleyici madde yokluğunda dahi T7 RNA polimerazı daima bazal olarak sentezlediği gösterilmiştir [68]. Genel olarak, bu bir sorun değildir, fakat ilgilendiğimiz gen ürünü *Escherichia coli* için toksik ise, bu genin bazal ekspresyonu plazmidin kararsızlığına ve hücre ölümüne neden olabilir. Bu problemi gidermek için pETSUMO vektörüne ilgili genin ekspresyon kontrolü için, T7 lac promoter bölgesini yerleştirmiştir. T7lac promatörü T7 promatörü içerisine yerleştirilmiş lac operatör sekansından oluşmaktadır. Lac operatör, lac I geni tarafından sentezlenen lac represörünün bağlanabileceği bölgeyi içerir. Bu şekilde BL21(DE3) hücrelerine aktarılmış olan genin bazal transkripsiyonunu başlatan T7 RNA polimerazın baskılanmasını sağlar.

3.1.6. Vektör sistemi

pET-SUMO plazmidini rekombinant olarak üretilmek istenen proteinin N terminal bölgesine, 13 kDa büyüklüğündeki His-SUMO proteinini rekombinant olarak bağlanması (füzyonu) ile üretilmesini sağlayan bir protein ifade vektörüdür. Vektör üzerinde protein ifadesi tac promotörü altında sıkı (sızıntısız transkripsiyon) bir şekilde kontrol edilmektedir. Bu promotör bölge laktoz analogu olan izopropil- β -D-tiogalaktosidaz (IPTG) ile indüklenerek protein ifadesi başlatılır. Üretilen protein His-SUMO proteinine bağlı olarak üretilir ve saflaştırılması adımı sadece His (histidine) proteinine bağlanabilen Ni-NTA agarose partikülleri kullanılır. Bu sayede füzyon proteininin His-SUMO kısmı bu partiküller

tarafından tutularak ifadesi yapılmış olan proteinin saflaştırılması sağlanır. Eğer istenirse füzyon proteini sumo proteaz enzimi ile kesilerek His-SUMO proteininin üretilen proteinden ayrılması da sağlanabilir.

pET-SUMO plazmidi PZR ile üretilen genlerin klonlanması amaçlanarak üretilmiştir. Plazmidin klonlama bölgesinin 3' uçlarına bir adet ekstra timin bazı yerleştirilmiş ve plazmid üzerinde bulunan 5' uçların fosfat grupları çıkarılmıştır. Bu sayede plazmidin ligasyon esnasında halkasal yapı oluşturması engellenerek klonlama etkinliği artırılmıştır. Bu tür plazmidlere yapılacak olan klonlamanın gerçekleşebilmesi için klonlanacak parçanın 3' kısmında sarkan adenin bazı (karşı iplikte tamamlayıcısı olmayan) olmalıdır. Böylelikle klonlanacak parçada bulunan sarkan A bazı ile plazmidte bulunan sarkan T bazı ligasyon ile hibridize olur. Fosfat eksikliğinden dolayı birleşmeyen diğer uçlar ise transformasyondan sonra konağın DNA onarım mekanizmaları tarafından onarılır, böylelikle tam bir halkasal DNA molekülü oluşmuş olur. Klonlama bölgesi vektör üzerinde β -galatosidaz enzimini üreten lac-Z geni içerisine yerleştirilmiştir. Bu sayede pozitif klonların taranması kolonilerdeki renk farklılığına göre yapılabilmektedir.

pET-SUMO vektörü hem klonlama hem de ekspresyon vektör özelliğine sahiptir. İstenilen gen bölgesi vektöre yerleştirildikten sonra, restriksiyon endonükleazları kullanıp insert edilen geni tekrardan çıkarıp başka bir vektöre klonlamaya gerek kalmaz. Ayrıca Sumo vektör sistemi, yüksek aktivite ve spesivitede protein ekspresyonu sağlayan, *Escherichia coli*'nin T7 promatör bölgesinin heteroluğu olan bakteriyofaj T7 RNA polimeraz sistemine sahiptir.

SUMO proteini *Saccharomyces cerevisiae*' dan elde edilen Smt3 türü proteindir. Smt3 proteini 11 kDa ağırlığında olup memelilerdeki SUMO-1 proteinin homologudur. Bu vektördeki smt3 proteini SUMO olarak adlandırılır. SUMO proteini apoptosis, nuclear transport ve hücre döngüsü gibi çeşitli olayların düzenlenmesinde rol oynayan ubikuitin benzeri bir proteindir. SUMO ubikuitin gibi lizin yan zinciri ile hedef proteine kovalent bağ ile bağlanır. Bununla birlikte, ubikuitin modifikasyonu aksine, SUMO modifikasyonu protein yıkımından ziyade proteinin fonksiyon ve aktiviteleri üzerinde değişikliğe yol açar.

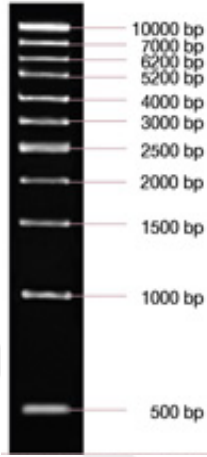
Bu vektör üzerinde yapılan çalışmalar rekombinat proteinin üretim miktarında ve çözünürlüğünde önemli düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir. SUMO proteinin tersiyer yapısı bir sistein proteaz tarafından tanınmaktadır. SUMO proteaz özellikle hedef proteini

Özellik	Fonksiyonu
T7 promoter	<i>Escherichia coli</i> suşlarında IPTG ile indüklenerek T7 RNA polimerazın üretilmesini sağlar. Bu yapıda rekombinant proteinin yüksek oranda sentezlenmesini sağlamaktadır.
lac operator (lacO)	lac repressor bağlanma bölgesidir. Bu yapı rekombinant proteinin basal ekspresyonunu azaltır.
Ribosome binding site	Ta klonlamada optimal aralığa sahiptir. PZR ürünlerinin yeterli oranda translasyonunu sağlar.
N-terminal 6xHis tag	Rekombinant proteinin Ni-NTA spin kolonlarında saflaştırılmasını sağlar. Anti-HisG Antikorları kullanılarak rekombinant proteinlerin tespit edilmesini sağlar.
SUMO ORF	Rekombinant proteinin ekspresyonunu, çözünürlüğünü artırırken ayrıca sumo proteaz tarafından kesilmesini sağlayarak doğal proteinin elde edilmesini sağlar.
SUMO Forward priming site	Vektöre eklenen genin sekans analizini sağlar.
TA Cloning® site (5' T-overhangs)	PZR ürünlerin direk olarak ligasyonunu sağlar.
T7 Reverse priming site	Eklenen genin sekans analizini sağlar.
T7 transcription termination region	Bacteriophage T7 sekansıdır. Transkripsiyonun verimli bir şekilde sonlanmasını sağlar.
Kanamycin resistance gene	Transformant <i>Escherichia coli</i> hücrelerinin seçimi için için seçici besiyeridir.
pBR322 origin of replication (ori)	Vektörün <i>Escherichia coli</i> içerisinde kopyalanmasını ve stabil bir halde kalmasını sağlar.
ROP ORF	pBR322 origin ile etkileşime girerek düşük sayıda kopya oluşumunu sağlar.
lacI ORF	lac repressor kodlayan bölgedir. T7lac promoter bölgesine bağlanarak rekombinant proteinin basal ekspresyonunu azaltır. Ayrıca <i>Escherichia coli</i> hücresini genomundaki lacUV5 bölgesine bağlanarak T7 RNA polimerase üretimini engeller.

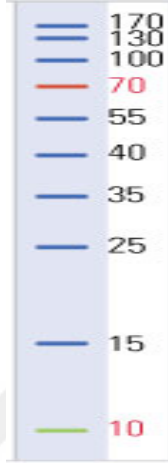
Tablo 3. pET-SUMO vektör sisteminin özellikleri

3.1.7. DNA ve protein marker'ları

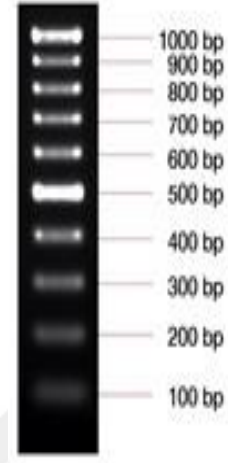
Agarose jel elektroforezinde, 1kb DNA ladder ve 100 bp DNA ladder kullanıldı. Protein elektroforezinde ise Page ruler prestained protein ladder kullanıldı.



Şekil 6. 100 bp DNA ladder



Şekil 7. Prestained protein ladder



Şekil 8. 1000 bp DNA ladder

3.1.8. Tampon ve çözeltiler

- 0.5 M EDTA pH 8 (500ml için)

93.05 gram $\text{Na}_2\text{EDTAH}_2\text{O}$ 400 ml deiyonize su içerisinde 9 gram kadar NaOH eklenir ve daha sonra tamamı çözüldükten sonra çözeltinin pH'sı 8'e gelene kadar yavaşça NaOH eklenir böylelikle EDTA'nın tamamı çözülmüş olur daha sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlanır.

- 1M HEPES pH 7.0 (1 litre için)

238.3gram HEPES (Asitsiz) 800ml deiyonize su içerisinde çözülür ve 10N NaOH kullanılarak pH'sı ayarlanır daha sonra 1 Litreye deiyonize su ile tamamlanır.

- 0.5M MES Tamponu (1 Litre için)

97.6 gram MES (Asitsiz) 800 ml deiyonize su içerisinde çözülür daha sonra pH'sı 7'ye ayarlanıp deiyonize su ile 1 Litreye tamamlandı.

- 5M NaCl (1 Litre için)

292.2 NaCl 1 litre son hacim olacak şekilde deiyonize su içinde çözüldü.

- 10M NaOH (10N NaOH) (500 ml için)

200 gram NaOH tartıldı ve 500 ml deiyonize su içerisinde çözüldü.

- 1M Tris tamponu (1 Litre için)

121.1 gram Trisma base 800ml deiyonize su içerisinde çözüldü istenilen pH'ya konsantre HCl ile ayarlandı ve deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

Jel elektroforezleri için kullanılan tamponlar

- 50X TAE (1Litre için)

242.2 Tris baz 600 ml deiyonize su içerisinde çözülür daha sonra yavaşca 57.1 ml glacial acetic acid eklenir 100 ml 0.5M EDTA pH8 eklendikten sonra 1 litre'ye deiyonize su ile tamamlanır.

- 6X DNA Loading Buffer (100ml için)

50ml gliserol içine 12ml 0.5M EDTA pH8 eklendikten sonra 10mg bromophenol blue eklenir ve deiyonize su ile 100ml'ye tamamlanır.

- 1.5M Tris pH 8.8 (1 litre için)

181.65 gram tris baz'ı 800ml deiyonize içinde çözülür ve daha sonra pH'sı konsantre HCl ile 8.8'e ayarlanır daha sonra deiyonize su ile 1 litreye tamamlanır.

- 0.5 M Tris pH 6.8 (1 litre için)

60.55 gram tris baz 700ml içinde çözülür daha sonra konsantre HCl kullanılarak pH'sı 6.8'e ayarlanır son hacim olarak 1 litreye tamamlanır.

- 10X Tris Glycine running buffer (4 Litre için)

121.1 gram tris base 3 litre içerisinde çözülür daha sonra üzerine 576 gram glycine eklenir 200 ml %20'lik SDS eklendikten sonra deiyonize su ile 4 litreye tamamlanır.

- 2X Sample loading buffer (non-reducing)(100 ml için)

5ml 1M Tris pH 7 üzerine 25ml %20'lik SDS eklenir daha sonra 20ml gliserol eklendikten sonra 2mg bromophenol blue ile karıştırılıp 100ml'ye deiyonize su ile tamamlanır.

- 2x Sample loading buffer (reducing) (1ml için)

950µl 2x non-reducing sample loading buffer içine 50µl β-mercaptoethanol eklenip kullanılır.

- Stain/destain solusyonu (4 litre için)

200ml absolute ethanol için 200ml glacial acetic acid eklenir ve 4 litreye deiyonize su ile tamamlanır.

- Fiksasyon Solusyonu (1 litre için)

600ml absolute ethanol içine 75 ml glacial acetic acid eklenip 1 litreye deiyonize su ile tamamlanır.

- Commasie Blue Stock solusyonu (100 ml için)

250 mg içine Commasie Brilliant Blue G-250 boyası 100 ml fiksasyon solusyonu içine eklendi.

- APS Solusyonu

10 mg Ammonium peroksi disulfat alınıp 1 ml deiyonize su içerisinde çözüldü.

- Etidyum bromid

Son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde 500 µl'lik hacimlerde dH₂O'da çözümlenerek stok solusyon olarak hazırlanır ve 4°C'de saklanır. Agaroz jel elektroforezi için son hacimde 0,5 µg/ml olacak şekilde kullanılır.

PZR ve Ligasyon işleminde kullanılan tamponlar

PZR Tamponu

100 mM Tris-HCl, pH 8.3

500 mM KCl

0.01% Gjelatin

dNTP Mix

12.5 mM dATP

12.5 mM dCTP

12.5 mM dGTP

12.5 mM dTTP

Su pH 8.0

10X Ligasyon Buffer

60 mM	Tris-HCl, pH 7.5
60 mM	MgCl ₂
50 mM	NaCl
1 mg/ml	bovine serum albumin
70 mM	β-mercaptoethanol
1 mM	ATP
20 mM	dithiothreitol
10 mM	spermidine

Protein izolasyonunda kullanılan çözeltiler

Nativ lizis tamponu: Rekombinant *Escherichia coli* BL21 (D3) hücrelerinin ekstraksiyon işleminde kullanıldı.

Native lizis tamponu pH: 7,8

KH ₂ PO ₄	1 M	0.3ml
K ₂ HPO ₄	1 M	4.7ml
NaCl	400mM	2.3 g
KCl	100mM	0.75 g
Glycerol	10%	10ml
Triton X-100	0.5%	0.5ml
İmidazole	10mM	0,068 g
Deiyonize su		100ml tamamlanır.

Ni-NTA spin kolonu için kullanılan tamponlar

Ni-NTA spin kolonlarını kullanırken beraberinde çeşitli tamponlar kullanmak gerekmektedir. Bunlar; yüklenen çözelti içerisinde üretilen rekombinant proteinlerin

yakalanması, yakalanmayan diğer proteinlerin yıkanması ve en son, yakalanan proteinin serbest bırakılmasını sağlamada kullanılmaktadır. Bütün tamponlar hazırlandıktan sonra

Protein elde edilirken hem denatüre hem de native yöntem kullanıldı bu yüzden her yöntem için farklı tamponlar bulunmaktadır.

Denatüre yöntem için kullanılan tamponlar:

B Tamponu: Protein karışımını kolona yüklemek için kullanılan tampondur

Üre	7 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris-HCL	0.001 M
pH 8.0	

C Tamponu: Kolona yüklenen protein karışımından tutunmayanların yıkanıp atılmasını sağlayan tampondur.

Üre	8 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris-HCL	0.001 M
pH 6.3	

E Tamponu: Kolon tarafından tutulan 6x His etiketli rekombinant proteinin kolondan ayrılmasını sağlayan tampondur.

Üre	8 M
NaH ₂ PO ₄	0.1 M
Tris-HCL	0.001 M
pH 4.5	

Native yöntem için kullanılan tamponlar:

Lizis tamponu: Bakteri peletini parçalayarak proteinlerin dışarı çıkmasını sağlayan tampondur.

NaH ₂ PO ₄	50 mM
----------------------------------	-------

NaCl 300 mM

İmidiazol 10 mM

pH 8.0

Wash buffer : Kolona bağlanan his-tag'lı proteinler haricinde kalan diğer tüm proteinlerin yıkanarak atılmasını sağlamak için kullanılan tampondur.

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

İmidiazol 20 mM

pH 8,0

Elution buffer : Kolona bağlanılan his-tag'lı proteinlerin tamamının atılarak toplanmasını sağlayan tampondur.

NaH₂PO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

İmidiazol 500 mM

pH 8,0

Protein miktar tayininde kullanılan çözeltiler

Protein miktar tayininde Bradford metodu kullanıldı. Bu metod için kullanılan çözeltiler aşağıdaki tabloda verilen şekilde hazırlanmıştır.

Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1 g

% 95 'lik Etanol 50 ml

% 95'lik Fosforik asit 100 ml

Deiyonize su 1 L tamamlandı

0,1g Coomassie Brilliant Blue G-250 50ml %95'lik etanolde çözüldü. Bu çözelti üzerine %95'lik 100ml Fosforik asit ilave edildikten sonra deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı. 0,45µm lik filtre ile filtre edildikten sonra ışık almayan bir şişeye konarak +4°C'de saklandı.

Standart: 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart çözeltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.

Sumoproteaz için kullanılan tampon ve çözeltiler

Sumoproteaz rekombinant olarak üretilip saflaştırılan His-Sumo-yvrK proteinin, saflaştırıldıktan sonra, His-SUMO kısmını proteinden ayıran enzimdir. Sumoproteaz enziminin optimum reaksiyon vermesi için, tampon içindeki NaCl ve imidazol konsantrasyonunun optimize edilmesi gerekir. Bu işlem için protein çözeltisinin ortamına göre tuz konsantrasyonu yüksek ya da düşük buffer kullanılır. Protein çözeltisi için tuz konsantrasyonu düşük bufferı kullanıldı.

SUMO Protease (1 U/ μ l)	25 mM Tris-HCl, pH 8.0
	1% Igepal (NP-40)
	250 mM NaCl
	500 μ M DTT
	50% (v/v) glycerol
10X SUMO Protease Buffer	500 mM Tris-HCl, pH 8.0
	2% Igepal (NP-40)
	10 mM DTT

Enzim aktivitesinde kullanılan tamponlar.

- 0.1M Citrate Buffer

29.4gram sodium citrate 100ml deiyonize su içeirsinde çözümlenerek hazırlanır ortamın pH'sının asidik olması için kullanılır.

- Manganaz Klorür Solüsyonu

197.91mg manganaz klorür 100ml deiyonize su içerisinde çözeülerek kullanılır. Oksalat dekarboksilaz enzimi için kofaktör olarak görev görür.

- NAD solüsyonu

Format dehidrogenaz enzimi için kofaktör olan NAD solüsyonu 0.1M olarak stok çözeltisi halinde hazırlandı bunun için 685.41mg NAD 10ml deiyonize su içerisinde çözünerek hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Gen kaynağı organizmayı belirleme

Üretilecek olan oksalat dekarboksilaz enzimini kodlayan genler birçok canlı organizmada bulunmaktadır. Gelişmiş bitkiler ve bazı hayvanlarda bu enzimi kodlayan genler bulunmaktadır fakat rekombinant üretim yapılırken kullanılacak olan konakçı organizma prokaryot olduğundan dolayı transkripsiyon sonrasında yapılan glikolizasyon ve başka posttranskripsiyon modifikasyonlarından dolayı sorunlar çıkmaktadır. Bu yüzden gen kaynağı olarak *Bacillus subtilis* mikroorganizması seçilmiştir. Bu mikroorganizmanın oksalat dekarboksilaz enzimini en iyi üreten suşlarından M168 suşu seçilmiştir.

3.2.2 Genin belirlenmesi ve primer tasarlama

Oksalat dekarboksilaz enzimini kodlayan iki farklı gen *Bacillus subtilis* 168 suşunda bulunmaktadır. İki gen için de primer tasarlanmıştır ve yapılacak olan PZR işleminden sonra kullanılacak olan gen seçilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonu GF-1 Bacterial DNA extraction kiti (Vivantis) kullanılarak yapıldı. Bakterial DNA izolasyon kiti gram negatif ve gram pozitif bakterilerden yaklaşık olarak 20µg genomik DNA'yı saflaştırmak için dizayn edilmiştir. Kit; cam filtre membranlarından oluşan kolonlara yüksek tuz ortamında DNA'nın bağlanması prensibine dayanır. Spin kolon teknolojisi kullanılarak çeşitli yıkama tamponları ile DNA haricindeki hücresel bileşenlerin ortamdaki uzaklaşmasını sağlayarak, en son aşamada düşük yoğunluklu tuz ile DNA'nın elüsyonunu sağlar. Kolondan elüe edilen DNA miktarı A260/280 1,7 -1.9 civarında olup, PZR reaksiyonunda kullanılabilir saflıktadır.

DNA izolasyon protokolü aşağıdaki işlemlerden oluşmaktadır.

- Daha önceden çoğaltılan *Bacillus subtilis* 168 kültür ortamından 3 ml alınarak 10.000RPM'de oda ısısında 2 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı.

- Kalan pelet 100 µl Tampon R1 ile karıştırılıp, süspansiyon haline getirinceye kadar pipetlendi. (Bakterilerin iyice parçalanabilmesi için peletin tam olarak karışması gerekir.)
- Hücre süspansiyonunun üzerine 10 µl lizozyme (50mg/ml) eklendikten sonra karıştırılıp, 37°C 20 dk inkübe edildi.
- 10,000 RPM'de 3 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatant atıldı.
- Kalan pelet 180 µl buffer R2 ve 20 µl proteinaz K ilave edilip karıştırıldıktan sonra 65°C'deki çalkalamalı inkübatörde 20 dk inkübe edildi. (inkübasyonun sonunda lizatın homojen şeffaf bir hale gelmesi gerekmektedir.)
- Ortamdaki RNA'yı uzaklaştırmak için ortama 20µl RNase (20mg/ml) ilave edilip 37°C'de 5 dk inkübe edildi (bu işlem sırasında kalan residual RNA parçaları kolon yıkaması sırasında ortamdaki RNA'yı uzaklaştırılır).
- Tüpteki çözelti miktarının iki katı kadar (yaklaşık 440µl) buffer BG eklenip tüp birkaç kez alt üst edilerek ortamın homojenize edilmesi sağlandı. Sonrasında 65°C'de 10 dk inkübe edildi.
- 200 µl saf etanol ilave edilip hızlıca karıştırıldı.
- Karışım kolona yüklenip, 10,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün dibinde kalan sıvı ortamdaki RNA'yı uzaklaştırıldı.
- Kolon üzerine 750 µl wash buffer ilave edilip, 10,000 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün dibindeki sıvı atıldı.
- Kolona herhangi bir şey eklemeyen, kolonda kalan fazla etanolü uzaklaştırmak için 10,000g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon temiz bir tüpe alınarak, kolon üzerine 100 µl elüsyon buffer ilave edilip, 10,000g'de 1 dk santrifüj edildi. Tüpün dibinde kalan sıvı içerisinde saf genomik DNA bulunmaktadır.
- Elde edilen DNA %1'lik agarose jel elektroforezinde yürütülerek incelendikten sonra, kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Gen belirleme ve primer tasarlama

Kullanılacak olan geni belirlemek için *Bacillus subtilis* 168 suşuna ait oksalat dekarboksilaz proteinine ait gen dizilimi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ve <http://www.uniprot.org/> sitelerinden, Oxalate decarboxylase OxdC (yvrK) (EC:4.1.1.2) olarak tespit edildikten sonra; ilgili gen bölgesi için LightCycler Probe Design Software 2 (Roche) programı kullanılarak primer dizaynı yapıldı.

ENA|CAA11727|CAA11727.1 *Bacillus subtilis* oxdC : Location:1..1158

```
ATGAAAAAACAAAATGACATTCGGCAGCCAATTAGAGGAGACAAAGGAGCAACGGTAAAAATCCC GCGCAATATT
GAAAGAGACCCGGCAAAACCCCTGATATGCTCGTTCGGCCTGAAACCGATCATGGCACCGTCAGCAATATGAAGTTT
TCATTCTCTGATACTCATAACCGATTAGAAAAAGGCGGATATGCCCGGGAAGTGACAGTACGTGAATTGCCGATT
TCAGAAAAACCTTGCATCCGTAATAATGCGGGTGAAGCCAGGCGCGATTTCGCGAGCTTCACTGGCATAAAGAAGCT
GAATGGGCTTATATGATTTACGGAAGTGCAAGAGTCACAATTGTAGATGAAAAAGGGCGCAGCTTTATTGACGAT
GTAGGTGAAGGAGACCTTTGGTACTTCCCGTCAGGCCTGCCGCACATCCATCCAAGCGCTGGAGGAGGGAGCTGAG
TTCTGCTCGTGTGACGATGGATCATTCTCTGAAAACAGCACGTTCCAGCTGACAGATTGGCTGGCCACACT
CCAAAAGAAGTCATTGCTGCGAAGCTTCGGCGTGACAAAAGAAGAGATTTCCAATTTGCCCTGGCAAAGAAAAATAT
ATATTTGAAAACCAACTTCTGGCAGTTTAAAAGATGATATTGTGGAAGGGCCGAATGGCGAAGTGCCTTATCCA
TTTACTTACCGCCTTCTTGAACAAGAGCCGATCGAATCTGAGGGAGGAAAAGTATACATTGCAGATTCGACAAAC
TTCAAAGTGTCTAAAACCATCGCATCAGCGCTCGTAACAGTAGAACCCGGCGCCATGAGAGAAGTGCCTGGCAC
CCGAATACCCACGAATGGCAATACTACATCTCCGGTAAAGCTAGAATGACCGTTTTTGCATCTGACGGCCATGCC
AGAACGTTTAATTACCAAGCCGGTGATGTCCGATATGTACCATTGCAATGGGTTCATTACGTTGAAAACATCGGG
GATGAACCGCTTGTCTTTTAGAAAATCTTCAAAGACGACCATTATGCTGATGTATCTTTAAACCAATGGCTTGCC
ATGCTTCTGAAACATTTGTTCAAGCGCACCTTGACTTGGGCAAAGACTTTACTGATGTGCTTTCAAAGAAAAAG
CACCCAGTAGTGAAAAGAAAATGCAGTAAATAA
```

PZR ile gen bölgesinin çoğaltılması

yvrK gen bölgesinin plasmit vektörüne klonlanması için, gen bölgesinin istenilen miktarda çoğaltılması için PZR işlemi uygulandı.

- PZR işlemi için aşağıdaki tabloda verilen PZR bileşenleri belirtilen miktarda ince çeperli ısı iletimi fazla olan PZR tüpüne konularak hazırlandı.

Madde	Konsantrasyon	Miktar
Taq buffer	10x	5 µl
MgCl ₂	50 mM	1,5 µl
dNTP	10 mM	1 µl
Primer F	10 pmol/µl	1 µl
Primer R	10 pmol/µl	1 µl
DNA	200 ng	4 µl
Taq DNA polimeraz	5U/µl	0,25 µl
Saf su	deiyonize	36,25 µl
	Toplam	50 µl

Tablo 4. PZR’da kullanılan madde miktarları

- PZR bileşenleri laminar kabin içerisinde herhangi bir kontaminasyon olmayacak şekilde buz üzerindeki PZR tüpüne konulduktan sonra, tüp dibinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde iyice karıştırılıp PZR cihazına konuldu.
- PZR işlemi aşağıda verilen program kullanılarak yapıldı. Kullanılan vektör sistemine klonlama için; klonlanacak parçaların uç kısımlarında A bazına ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle klonlanacak parçaların uç kısımlarına A bazı eklenmesi gereklidir. Thermus cinsine ait birçok polimeraz enziminin 3' ucuna polimerizasyon sonrasında ektradan bir baz ekleme (genellikle adenin) özelliği vardır. Burada polimeraz enzimini bu özelliğini ortaya çıkarmasını sağlamak için final extension safhası 10 dk yapılarak bu işlemin yapılması sağlandı. PZR programının son safhasında 72°C de 10 dk uygulanarak taq polimeraz enziminin PZR ürünün uç kısımlarına poli Adeninleri eklenmesi sağlanır.
- PZR işlemi sonucunda, ürünün 10 µl agaroz jele yüklenerek, istenilen PZR ürünün oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Bunun için hazırlanan %1'lik agaroz jel 120 V 20 dakika boyunca yürütüldü ve daha sonra UV ışık altında kontrol edildi.

	Sıcaklık	Süre	
Initial denaturation	94°C (ön denatürasyon)	3 dk	30 döngü
Denaturation	94°C	3 dk	
Annealing	56°C	45 sn	
Extension	72°C	1 dk	
Final extension	72°C	10 dk	

Tablo 5. PZR için kullanılacak olan sıcaklık ve döngü bilgileri

3.2.3. Vektör hazırlama

PZR işleminden sonra elde edilen gen kopyaları geni taşıyacak olan vektör çeşitli tekniklerle hazırlanır. Vektöre geni bağlayacak enzim olan DNA ligaz enzimi ile birlikte gelen tampon ile hazırlanarak vektör oluşturulur.

	Miktar
Taze PZR ürünü	2µl
10X Ligasyon Buffer	1µl
pET SUMO vector (25 ng/µl)	2µl
Steril su	4µl
T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units)	1µl
Toplam	10µl

Tablo 6. Ligasyon için kullanılan bileşenler

Ligasyon ve TA klonlama

PZR ile çoğaltılan gen bölgesinin vektöre eklenmesi için yapılan bir işlemdir. Bu çalışmada kullanılan vektör uç kısımlarına Timin nükleotidleri eklenerek, linear bir yapıya getirilmiştir, bu sayede PZR sonucunda uç kısmında A bulunan PZR ürünü T ile etkileşime girerek hidrojen bağlarıyla bağlanır. Ortamda bulunan DNA T4 ligaz enzimi ise bu bağı kovalent haline getirerek genin vektöre eklenmesi sağlanır. Ligasyon aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır.

- Optimum ligasyon verimliliği için taze (en fazla 1 gün önce) PZR ürünü gerekmektedir. PZR ürünün ucunda bulunan A grupları zamanla bozunduğu için, ligasyonun etkinliği azalacaktır, bu yüzden bu PZR ürünün taze olarak kullanılması gerekir.

Fazla miktarda PZR örneği kullanılırsa PZR örneklerinde bulunan tuzlar T4 DNA Ligazı inhibe edebilir. Bu yüzden ligasyon işleminde kullanılacak PZR ürünün optimize edilmesi gerekir. 1:1 oranında vektör: PZR ürünü ligasyon için en verimli orandır. Genellikle 0,5 ile 1,0 µl tipik PZR ürünü ortalama gen uzunluğu (1000-1200bp) arasında ise 1:1 vektör: istenilen gen bölgesi oranını vermektedir.

- Ligasyon karışımı hazırlandıktan sonra PZR cihazında 15°C'de gece boyunca (8 saat) inkübasyona bırakıldı.
- Hazırlanan ligasyon örneği kullanılmaya kadar -20°C bekletildi.

Çoğaltma konakçısına klonlama

Ligasyon reaksiyonu ile oluşturulan rekombinant plazmidin çoğaltılması veya protein ifadesinin gerçekleştirilmesi için kompetent hücelere plazmidin aktarımı gereklidir. Transformasyon öncesinde aşağıda verilen hazırlık aşamalarının yapılması gerekir.

- Daha önceden hazırlanan 50 µg/ml kanamycinli LB petripleri 37°C de 30 dk inkübe edildi.
- S.O.C. besiyeri oda ısısında bekletip ılıklaştırıldı.
- Transformasyonda kullanılacak 1 şişe One Shot® hücreleri buz üzerinde eritildi.

Hazırlık işlemi tamamlandıktan sonra transformasyon işlemine geçildi.

- Kompetent One Shot® *Escherichia coli* hücreleri -80°C'den alınıp ve buzda 5 dakika süre ile bekletildi.

- Ligasyon sonunda elde edilen ürün hazırlanan kompetent hücrenin üzerine eklenip, pipetleme yapmadan, hafif bir şekilde karıştırdıktan sonra, buzda 30 dakika süre ile bekletildi.
- Süre sonunda örnekler buzdan alınıp, 42°C'ye ayarlanan ısı bloğuna yerleştirildi. (Bu aşamada hücre membranındaki porların açılarak plasmitlerin hücre içerisine girmesi sağlanır).
- Hücreler ısı bloğunda 30 saniye süre ile bekletildikten sonra, hemen buza alınarak 3 dakika'da buzda bekletildi. Sürenin bitiminde örneklerin üzerine 250 µl oda ısısında bekletilen S.O.C. besiyeri eklendi.
- 37 °C'de orbital shakerde 200 rpm ve 37 °C'de 1 saat süre ile inkübe edildi.
- Kültür ortamından; 150 ve 100 µl alınarak, önceden ılık hale getirilmiş iki farklı seçici besiyeri petrilere yayılıp, bir gece boyu 37 °C'de inkübe edildi. (Hücreler katı besiyerine ekildiklerinde çok fazla üremeye bağlı petri yüzeyini kaplayarak, halı oluşturabilir ve bu nedenle tek koloniler seçilemez. Bu yüzden iki farklı petriye ekim yapılarak tekli koloni oluşumu sağlanır).

Klonlamanın doğrulanması

Transformasyon işleminden sonra kanamisinli seçici besiyerine ekilen hücrelerden plasmid transfer edilen hücreler, kanamisine dirençli gen bölgesi içerdiğinden dolayı ortamda çoğalırken, plasmid içermeyen hücreler kanamisine karşı direnç gösteremediklerinden dolayı ölürlür. Fakat ortamda çoğalan kolonilerin hepsi istenilen plasmidi içermemektedir. Besi ortamında çoğalan koloniler; 1- yvrK genini içermeyen plasmitlere sahip koloniler 2- yvrK gen bölgesi N ve C terminal kısımları ters yerleşmiş koloniler 3- yvrK gen bölgesini doğru bir şekilde içeren koloniler. Bu koloniler içerisinden istenilen koloniyi seçmek için; farklı özelliklere sahip koloni PZR işlemleri yapıldıktan sonra istenilen koloni seçilerek yola devam edilir.

Kontrol PZR için üç farklı PZR kullanıldı oluşmaktadır:

- **Çapraz PZR A** (yvrK forward ve T7 reverse primerleri): yvrK gen bölgesinin forward primeri ve plasmidin T7 reverse primerleri kullanılarak PZR işlemi yapılır. Bu PZR sonucunda elde edilen ürün miktarı 1233 bp olacaktır.
- **Çapraz PZR B** (yvrK reverse ve SUMO forward primerleri) : yvrK gen bölgesinin reverse primeri ve plasmidin sumo forward primerleri kullanılarak PZR işlemi yapılır. Bu PZR sonucunda elde edilen ürün miktarı 1185 bp olacaktır.

- **Koloni PZR** (yvrK Forward ve yvrK reverse): yvrK Forward ve yvrK reverse primerleri kullanılarak PZR işlemi yapılır. PZR sonucunda yvrK gen bölgesi elde edilecektir.

Koloni PZR işlemi aşağıdaki işlemlerden oluşmaktadır:

- 50 µg/ml kanamisin içeren LB petrilinde bulunan pozitif kolonilerden on tanesi seçilerek petri üzerinde işaretlendi.
- Mevcut pozitif kolonileri korumak için kürdanla alınan koloniyi önce başka bir petriye ekip kopye ettikten sonra 20µl steril su içeren tüp içerisinde süspanse edildi.
- Elde edilen reaksiyon karışımı; hücreleri parçalamak ve nükleazları inhibe etmek için 94 °C’de 10 dk inkübe edildi.
- 10,000 rpm’ de 5 dk santrifüj edildi. Plasmid içeren süpernatant alınarak yeni tüplere konuldu.
- Bu şekilde elde edilen süpernatant koloni PZR sırasında template DNA olarak kullanıldı.

Madde	Konsantrasyon	Miktar
Taq buffer	10x	5µl
MgCl ₂	50 mM	1,5µl
dNTP	10 mM	1µl
Primer F	10 pmol/µl	1µl
Primer R	10 pmol/µl	1µl
DNA	200 ng	4µl
Taq DNA polimeraz	5U/µl	0,25µl
Saf su	deiyonize	36,25µl
	Toplam	50µl

Tablo 7. Koloni PZR için kullanılan bileşenler

- Elde edilen pozitif kolonilerin tekleştirilmesi için bunları 50 µg/ml kanamycin içeren LB petrilere ekildi.
- Petrilere oluşan kolonilerden tek bir koloni izole edilip, 50 µg/ml kanamisin içeren 1-2ml LB besiyerine konuldu. Bu kültür ortamında bakteriler durağan faza ulaşıncaya kadar çoğaltıldıktan sonra; 0,85 ml kültür ortamı 0,15ml steril gliserol ile karıştırılıp, cryoviallere konularak -80°C saklandı. Böylelikle istenilen zamanda tekrar geri dönülüp transforme edilen bakterileri elde etmek mümkün olur.

3.2.4. Protein ifadesi ve protein saflaştırma

Protein ifadesinin yapılabılır proteinin saflaştırılması için ilk basamak çoğaltma konakçısından plazmid izolasyonu yapıp ifade konakçısına aktarmaktır. İfade konakçısının plazmid yapısı vektör'ü transformasyon yaparak almaya olanak sağlayamaz çünkü kopya vektör ligasyon aşamasında düşük kopya olarak bulunmaktadır. Bu yüzden öncelikle vektör çoğaltma konakçısına aktarıldı ve yüksek kopya sayısı ile elde edildi. Böylece gen ve vektör bileşimi ifade vektörüne aktarılabilir hale getirildi.

Plazmid izolasyonu klonlamanın kontrol edilmesi için ya da plazmidin protein ifade konakçısına aktarılması için yapılabilir. Bunun dışında klonlanan parçanın kalıp olarak kullanılarak üzerinde değişiklik yapılması veya tekrar çoğaltılması amacıyla da plazmid izolasyonu yapılabilir. Koloni PZR sonucunda pozitif olduğu tespit edilen koloniden; protein eksprese eden BL21 hücrelerine transformasyon ve sekans analizi için plasmit izolasyonu yapıldı.

Plasmitler One Shot® Mach1™-T1R *Escherichia coli* içerisinde düşük oranda kopyalandıkları için istenilen oranda plazmid elde etmek için hücrelerin yüksek miktarda kültür ortamında çoğaltılması gerekmektedir. Yeterli miktarda hücre çoğaltıldıktan sonra plasmit izolasyon aşamalarına geçildi.

Bir gece boyunca çoğaltılan One Shot® Mach1™-T1R *Escherichia coli* hücrelerinden 8ml alınıp 12,000 x g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

- Elde edilen pelet üzerine 200µl resüpsiyon çözeltisi ilave ettikten sonra homojen oluncaya kadar pipetleme yapılarak karıştırıldı.
- Süspansiyon edilen karışım üzerine 200µl lizis buffer eklendikten sonra karışım viskoz ve açık bir hale gelinceye kadar, tüpler 6-8 defa hafifçe alt üst edilerek karıştırılıp, oda ısısında 5 dk inkübe edildi.
- 350µl nötralizasyon tamponu eklendi. Tüp 6-8 kez alt üst edilerek karıştırıldı. Karışım 12,000 x g de 10 dk santrifüj edilerek, plasmit DNA dışındaki genomik DNA, protein, lipid, gibi yapıların, bulutumsu bir yapı gibi dibe çökmesi sağlandı
- Kolon tüp içerisine konuldu. Kolon üzerine 500µl Kolon hazırlama solüsyonu konulduktan sonra 12,00 x g de 1 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan sıvı dökülerek kolon hazır hale getirildi.

- Hazırlanan kolon üzerine süpernatant yüklendi. 12,000 x g de 1 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan sıvı döküldü.
- Kolon üzerine 500µl wash solution 1 eklenip, 12,000 x g de 1 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan sıvı döküldü.
- Kolon üzerine 750µl wash solution 2 eklendikten sonra, 12,000 x g de 1 dk santrifüj edilip, dipte kalan sıvı döküldü. Bu sayede kolondaki tuzlar ve kalıntılar ortamdan uzaklaştırıldı.
- Herhangi bir şey ekmeden kolon 12,000 x g de 1 dk santrifüj edilerek etanol ortamdan uzaklaştırıldı.
- Kolon yeni bir tüpe konularak üzerine 100µl elüsyon buffer eklenip, 12,000 x g de 1 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan plazmidli sıvı toplanarak, -20°C'de kullanıncaya kadar depolandı.
- Plazmidlerin 10µl si % 1 agarose jelde görüntülendi.
- İzole edilen plazmidlerin bir kısmı kullanılarak çapraz PZR işlemi yapıldı. PZR ürünü % 1'lik agarose jelde görüntülendi.

Çapraz PZR sonucu pozitif olan plasmidlerin bir kısmıyla'da sekans analizi yapıldı. Sekans analizi, plazmid içerisine yerleştirdiğimiz genlerin doğru yönde yerleşip yerleşmediğini ve N- terminal kısmında tag füzyon proteininin bulunup bulunmadığını kontrol etmek amacıyla yapıldı. Bu işlem için plasmite özgün SUMO Forward ve T7 Reverse primerleri kullanıldı. Sekans analizi; Sentromer DNA (İstanbul) tarafından Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi, ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer cihazında kullanılarak Otomatik (Fluoresan İşaretleme) Dizi Analizi yapıldı. Elde edilen sekans sonucu <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> ve <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> gibi biyoinformatik analizleri yapabilen programları kullanılarak, yvrK protein dizisi ile karşılaştırıldı.

İfade konakçısına klonlama

Plazmid izolasyonundan sonra yapılan dizilime sonucunda doğru klon belirlenip ifade basamaklarına geçildi. Bundan sonraki aşamada ifade konakçısına doğru olduğu belirlenen plazmid aktarılacaktır. Plazmid aktarma basamakları aşağıda yazılan şekilde olmaktadır;

- Bir şişe BL21(DE3) One Shot® hücreleri buz üzerinde eritildikten sonra, hücrelerin üzerine 5 µl hacimde 10 ng plasmid DNA' sını eklendi, hafifçe karıştırıldı.
- Buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.
- Hücreler ısı bloğunda çalkalamadan 42°C'de 30 saniye ısı şokuna tabi tutuldu
- Isı şokundan hemen sonra tüpler buz üzerine alınarak, 5 dk inkübe edildi.
- Tüplerin üzerine 250µl oda ısısında bekletilmiş S.O.C. medium eklendi.
- Tüplerin kapakları kapatıldıktan sonra, orbital shakerde 200 rpm ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Tüplerde transformasyona uğramış olan karışımından 100 µl alınarak, önceden ılık hale getirilmiş 50 µg/ml kanamisin içeren LB petrilere yayılarak 37°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sırasında oluşan kolonilerden en iyi gelişen üç koloni seçilerek kontrol PZR işlemi yapıldı.

İndükleme ile protein ifadesi

- Kontrol PZR işleminden sonra pozitif olan koloni 10ml 50µg/ml kanamisin içeren 1% glukozlu LB sıvı besiyerine konularak, orbital shakerli inkübatörde 37 °C 200 rpm' de gece boyunca inkübe edildi.
- 1,7ml kültür ortamının bir kısmı steril gliserol ile karıştırılıp -80 C saklandı.
- Besiyerinden 500 µl alınarak 10ml 50 µg/ml kanamycin 1% glucose içeren LB besiyerine konuldu.
- 2 saat 37°C 200rpm de çoğaltıldı. 1ml alınarak spektrofotometrede 600 nm ölçüldü.
- Bu sürede OD600 de absorbands 0,5 ulaştıktan sonra; 10ml besiyeri 5ml lik iki tüpe bölündü. Bu tüplerden birinin üzerine final konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklendi. Bu şekilde tüplerin biri IPTG ile indüklenmiş diğeri indüklenmemiş oldu. (Bu işlem hangi zaman aralığında protein ekspresyonunun fazla olduğunu tespit etmek amacıyla yapıldı)
- Her iki kültür ortamının 37°C 200 rpm 'de çoğalmalarına devam edildi. 3 ile 7. saatleri arasında saat başı her iki kültür ortamından (IPTG (+),IPTG (-) 500 µl örnek alınıp ayrı bir tüpe konuldu.
- 15,000 rpm 'de 1 dk santrifüj edilip, süpernatant kısmı atıldı. Kalan pelet SDS PAGE yapmak üzere -80°C 'ye konuldu.
- 1., 3., 6., 24., saatlik inküba syon süresinden sonra toplanan örnek peletleri 80 µl 1X SDS-PAGE örnek buffer ile karıştırılıp buz üzerine konuldu.

- 95 °C ‘ de 5 dakika inkübe edildi,
- 10,000 rpm 2 dk santrifüj edildikten sonra 10µl si SDS-PAGE yapıldı. Kalan örnekler - 80°C’de saklandı.

Bu işlem sonucunda hangi saat aralığında protein ekspresyonun optimum olduğu saat tespit edildi.

SDS page sonucunda eksprese edilen protein çoğunluğunun pelet kısmında olduğu tespit edildiğinden protein saflaştırma işleminde denatüre lizis metodu uygulandı.

50ml kültür ortamı santrifüj edildikten sonra, elde edilen pelet PBS ile yıkanıp, pelet üzerine 2ml lizozim (1mg/ml) eklenip karıştırıldı. Buz üzerinde 30 dk inkübe edildi.

- 6ml denatüre lizis buffer eklendikten sonra karıştırıldı.
- 10µl’lik kısmı protein saflaştırma işleminde kullanılmak üzere – 20°C’de saklandı.
- Lizat 10dk 8sn pulslarla ultrasonikasyonla buzlu ortamda parçalandı.
- Oda ısında 1 saat shakerda inkübe edildi.
- Oda ısısında 10,000rpm 30 dk santrifüj edildi.

Protein ayırma ve saflaştırma

pET-SUMO vektör sistemi ile üretilen proteinin daha sonra organizmadaki diğer proteinlerden ayrıştırılması için kolon kromatografisi yapıldı. Kolon içinde bulunan Ni-NTA partikülleri 6his içeren proteinleri tutarak diğer proteinlerden ayrıştırılması sağlandı. Bu teknik için kullanılan spin kolonlar santrifüj ile kullanılarak proteinin ayrışması sağlandı. Protein saflaştırma aşamasında proteinlerin hem denatüre yöntemle hem de native yöntemle lizise uğratarak yapılmasından dolayı iki farklı prosedür ile protein ayrıştırılması yapıldı.

Denatüre yöntem ile protein ayırma:

Bakteriler önce kanamisin içeren besiyerinde bir gece büyütüldü. Daha sonra ertesi gün 1ml besiyeri alınıp 10 ml taze kanamisin içeren besiyerine aktarıldı 2 saat sonra OD’si 600 nm’de ölçülerek 0.5 absorbans olup olmadığı ölçüldü. OD 600 0.5’i geçtikten sonra konsantrasyon 1mM olacak şekilde IPTG eklenerek bakterilerin indüklenmesi sağlandı. 37°C’de 6 saat sonra bakteriler toplandı ve santrifüj yapılarak pelet toplandı. Pelet PBS ile yıkanıp ayrıştırılmaya hazır hale geldi. Ayrıştırma aşamaları aşağıdaki gibi yapıldı.

- Kolonlar açılarak içindeki bulunan etanolün uzaklaştırılması için içine birşey yüklenmeden 1600 RMP'de 5 dakika boyunca santrifüj yapıldı.
- Bakteri beleti -20°C'de 5 saat bekletildikten sonra 15dk boyunca çözülmesi için bekletildi.
- 700µl B tamponu ile muamele edilten sonra 15 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
- B tamponu ile muamele edilen bakteri peleti daha sonra 12000 g'de 30 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi ve daha sonra üst kısım toplanıp öncesinde sadece B tamponu ile yıkanan kolona yüklendi.
- 5 dakika 270 g'de santrifüj yapıldıktan sonra kolondan geçen kısım toplanıp SDS page için saklandı.
- Kolona daha sonra 600 µl C tamponu yükleyerek 2 dakika 890 g'de santrifüj yapıldı. Kolondan geçen kısım tekrar toplanarak SDS-PAGE için saklandı.
- Son olarak kolondan 200 µl E tamponu yüklenerek 890 g'de santrifüj edildi böylelikle son kısımda kolona bağlanan 6his tag'lı tüm proteinler elde edildi.

Native yöntem ile protein ayrıştırma:

Denatüre yöntem gibi yine aynı şekilde pelet elde edildikten sonra;

- 630µl lizis tamponu ile muamele edilip buz üzerinde 30 dakika bekletildi.
- Daha sonra lizis tamponu ile muamele edilen pelet 12000 g'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Üst kısım toplandı. İçinden 20 µl'si toplanarak SDS-PAGE için saklandı.
- Önceden lizis tamponu ile santrifüj edilen kolonlara toplanan üst kısım konularak 5 dakika boyunca 270 g'de santrifüj edildi.
- Kolondan geçen kısım toplanarak SDS-PAGE için saklandı
- Daha sonra kolon üzerine 600 µl wash buffer eklenerek 890 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Son olarak 300 µl elüsyon tamponu kolona yüklenerek kolona bağlı olan 6his taglı olan proteinlerin toplanması sağlandı. Bunun için 300 µl elüsyon tamponu kolona yüklenerek 2 dakika boyunca 890 g'de santrifüj yapıldı ve kolondan geçen kısım toplandı.

SDS-PAGE elektroforezi

Proteinlerin denatüre edilerek büyüklüklerine göre ayrılması SDS-PAGE yöntemi ile yapılır. Bu yöntem ile proteinler dimer, tetramer ya da moleküler kompleks oluştursalar bile

denatüre formlarında monomer yapıları gözlenir. Yöntem ile oluşturulan jel proteinlerin büyüklük hesaplamasında ve Western Blot Deneyinden kullanılabilir.

SDS-PAGE jeli iki farklı özellikteki jelden oluşur. Bunlardan ilki ayırma jelidir ve proteinlerin asıl olarak ayrımının yapıldığı jeldir. Sahip olduğu por çapı dar olan bu jel genellikle % 8-12 oranında hazırlanır. Diğer jel ise yığma jelidir. Bu jel daha geniş por büyüklüğüne sahiptir. SDS'nin proteinleri tam olarak kaplaması ve aynı hızda ayırma jeline yönlendirmesi amacı ile kullanılır. Genellikle % 4-12 oranında hazırlanır.

SDS-PAGE deneyinin adımları aşağıda verilmiştir.

- Elektroforez camları kullanılmadan önce su ve alkol yıkanarak iyice temizlenir, sonra camlar arasında 0,75mm olacak şekilde sistem oluşturulur. Öncelikle jelin hazırlanacağı jel dökme aparatı kurularak su ile test edilir. Sızdırma yapmıyorsa jel hazırlanmaya başlanır.
- Ayırma jeli hazırlanır, jeli hazırlarken en son aşamada TEMED ve APS eklendikten sonra camlara dökülür.
- Ayırma jeli döküldükten sonra polimerleşmenin sağlanması ve jelin üst kısmının düz bir şekil alması için 0,5ml isopropanol ayırma jelinin üzerine hafifçe eklenir 30-60 dk arasında oda ısısında jel polimerleştikten sonra, jel üzerindeki isopropanol kurutma kâğıdıyla uzaklaştırıldıktan sonra su ile yıkanır, kurutma kâğıdıyla su uzaklaştırılır.
- Yığma jeli, ayırma jelinin üzerine döküldükten sonra taraklar yerleştirilir. 30-45 dk arasında polimerleşme sağlanır.
- Jel hazırlandıktan sonra; Protein örneği 1:1 oranında 2X SDS örnek tamponu ile karıştırıldıktan sonra örnekler buz üzerinde tutuldu, sonra 5 dk 95°C'de inkübe edildi. (SDS oda ısısında eklendiğinde protein örnekleri proteazlar tarafından parçalanır, bunu önlemek için buz üzerinde tutulur, proteazları inhibe etmek için kaynatılır). Kaynama işleminden sonra örnekler oda ısısında soğutuldu.
- 10,000 rpm 'de 2 dk santrifüj edildikten sonra jelle yüklenir hale getirildi.
- Taraklar jelden dikkatlice çıkarıldıktan sonra kuyular 1X SDS elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerleşmeyen monomerler uzaklaştırıldı. Çünkü kuyularda polimerleşme olabileceğinden dolayı kuyulara örnek yükleme işlemi aksar.
- Jeller tanka yerleştirildikten sonra iç kısım 1X SDS elektroforez tamponu ile dolduruldu.
- Örnekler kuyulara aynı miktar ve yoğunlukta eklenir yoksa yan kuyucuklara yayılma olabilir. Kuyucuklara fazla yüklendiğinde bantlarda bozulma gözlenir. Bu yüzden kuyucuklara 20µl den fazla örnek yüklenmedi.

- Protein büyüklüklerinin belirlenmesi için belirteç olarak, Pageruler Prestained markerı (Thermo) kullanıldı.
- Jeller önce 100 V yürütüldü, bromofenol ayırma jeline geldiğinde akım 120V çıkarıldı. Bu işlem 2 saat sürdü. Çalışma ortamının ısı 10-20°C arasında olmalı ve 5°C'den küçük olmamalıdır. Ortamın aşırı ısınması bantların eğri olmasına neden olmaktadır.
- Yürütme işlemi bittikten sonra iç kısımdaki tamponu alttaki tampon ile karıştırmadan döküldü. Dış kısımdaki tampon bir kaç kez daha kullanılabilir.
- Camlar açılıp jel çıkarıldıktan sonra bir köşesi işaretlenir sonrasında boyama işlemine geçildi. Hazırlanan jelin üst kısmı daha düşük yoğunlukta olduğundan dolayı kopması daha kolaydır ayrıca o bölgede protein olmadığından dolayı kesilip atılabilir.
- Jel boyama çözeltisinde bir gece boyunca bırakıldı. Sonrasında fazla boyanın giderilmesi için jel yıkama çözeltisine kondu. Bantlar belirginleşip fazla boya giderildikten sonra jel görüntüledi.

Diyaliz

Diyaliz işlemi iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Birinci aşamada ortamdaki imidazole miktarının uzaklaştırılarak SUMO proteaz enziminin çalışması için uygun ortam oluşturmak. İkinci aşamada ise; kolondan saflaştırma işleminde elüsyon aşamasında kullanılan yüksek tuz konsantrasyonu azaltıldı. Bu sayede sumo kesim işleminin gerçekleşmesi sağlandı.

Optimal sumo proteaz reaksiyonu; < 300 mM NaCl ve < 150 mM imidazole içeren bir tampon içerisinde yapılması gerekir. Sumo proteaz enzimi; belirtilen tuz ve imidazole konsantrasyonun üzerine çıktığında inhibisyona uğramaktadır. Kolondan direk elüsyon edilmiş olan saf proteine, sumo proteaz işlemi uygulanırsa tuz ve imidazole miktarı istenilen miktarın üzerinde çıkacaktır. Bu yüzden tuz ve imidazole miktarını azaltmak için dializ işlemi yapıldı.

- Diyaliz membranı içerisine; saflaştırma işlemi sırasında elüsyon fraksiyonlarından elde edilen recombinant proteinlerden 2ml konulup diyaliz torbası mandallarla kapatıldı.
- Sırasıyla 500ml 400mM ---->250mM ----> 150mM ----> 50mM imidiazol içeren PBS tamponunda +4°C'de manyetik karıştırıcıda 100 rpm hızda her bir gradiente 3 saat boyunca diyaliz edildikten sonra en son aşamada 1L PBS tamponunda gece boyunca dializ yapıldı. Diyaliz sonrası elde edilen protein çözeltisinin konsantrasyonu sumo proteaz kesim

reaksiyonda kullanılacak konsantrasyonda olduğu için, protein çözeltisinin konsantre etme işlemine gerek kalmadı.

SUMO proteaz ile kesim işlemi

Füzyon proteini saflaştırıldıktan sonra, doğal proteini elde etmek amacıyla sumo proteaz kullanılarak N-terminal peptid kısmında bulunan 6xHis tag ve SUMO kısımları uzaklaştırıldı.

Tabloda verilen kimyasallar, karıştırılıp +4°C 'de gece boyunca inkübe edildi.

Füzyon protein	400µl
10 X tuzsuz sumo proteaz buffer	80µl
Deiyonize su	280
Sumo proteaz(10 U)	40µl
Toplam	800µl

Tablo 8. SUMO Proteaz kesim için kullanılan kimyasallar

İnkübasyon sonrasında 20 µl alınıp üzerine 20 µl 2X SDS sample buffer eklenip SDS page yapıldı. Geriye kalan örnek çalışma tamamlanıncaya kadar -20°C saklandı.

Hem SUMO füzyon proteini hemde SUMO Proteaz enzimi N- terminal kısmında polyhistidine içerdiklerinden dolayı Ni-NTA affinite kromatografisi ile ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir. Kesim reaksiyon çözeltisi kolon bağlama bufferı ile seyreltilir. Kolona protokoluna göre yüklenir. Sonuçta proteinimiz kolonda çıkarken diğerk yapılar kolona bağlı kalmış olur.

Protein miktarının belirlenmesi

Protein miktarı Bradford metoduyla ölçüldü. Bu metod 0,1-200 µg protein ölçme hassasiyetine sahiptir. Bu yöntemde spektrofotometrik ölçüm metoduyla ölçülür. Ölçüm için 1ml'lik plastik tek kullanımlık küvetler kullanıldı. Spektrofotometre öncelikle sadece bradford boyasıyla sıfırlandı.

- 1 mg/ml BSA (bovine serum albümin) içeren stok standart çözeltisi kullanılarak farklı miktarda stok içeren standartlar hazırlandı.
- 20 µl örnek ya da standart üzerine 980 µl Bradford ayırıcı eklendikten sonra vortekslendi.
- Oda ısısında 10 dk inkübe edildi.
- Spektrofotometrede 595 nm okundu.

3.2.5. Enzim aktivitesinin belirlenmesi

İzole edilen proteinin enzimatik karakterizasyonu için optimum koşulların sağlanması gerekir. Oksalat dekarboksilaz enzimi kofaktör olarak manganezklorür kullanılmaktadır. Bu yüzden enzimin bulunduğu ortamda optimum manganezklorür bulunmalıdır. Ayrıca enzim asidik ya da bazik karakterde olabilir bunu bulabilmek için asidik ve bazik tamponlar deneyerek optimum pH ortamı bulunmalıdır.

Karakterizasyon yapılırken spektrofotometrik ölçüm yöntemlerinden yararlanılır. Oksalat dekarboksilaz enzimi substrat olarak oksalat kullanılmaktadır. Ortamda bulunan oksalat, oksalat dekarboksilaz enzimi sayesinde katalizlenerek format ve karbondioksit kadar parçalanır. Ölçüm yapılırken oksalat dekarboksilaz enziminin reaksiyon sonucu ortaya çıkardığı format ticari olarak satın alınan format dehidrogenaz enzimi ile ölçülür. Oksalat dekarboksilaz enzimi sayesinde parçalanan oksalattan meydana gelen format, format dehidrogenaz enzimi ile

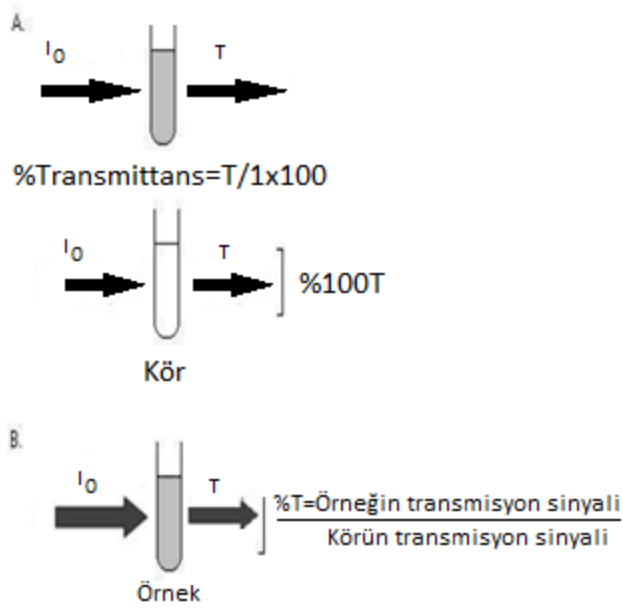
NAD varlığında formik asit ve H⁺ iyonlarına ayrılır böylelikle ortamda bulunan NAD, parçalanma sonucu oluşan H⁺ iyonlarıyla tepkimeye girerek NADH+H⁺ oluşturur. Sonunda ortamda bulunan NADH⁺'lar 340 nm'de spektrofotometre ile ölçülerek enzimatik reaksiyon ölçülür. Reaksiyon ölçümü tükenen yerine ortaya çıkan NADH⁺ üzerine olduğundan dolayı artan bi grafik elde edilmesi beklenmektedir.

Spektrofotometrik yöntem ile enzim aktivitesi belirleme

Lambert-Beer eşitliği; ışık şiddeti, konsantrasyon ve ışık yolunun uzunluğu arasındaki matematiksel ilişkiyi açıklar. Eşitlikteki I₀ ve I sırasıyla küvete giren ve küvetten çıkan ışığın şiddetini, T ise ışık geçirgenliği olan transmittansı ifade etmektedir.

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \left(\frac{1}{T}\right) = a \cdot b \cdot c$$

(a) absorptivite adı verilen oransal bir sabittir. (b) santimetre olarak ışık yolunun uzunluğunu, (c) ise ışığı absorbe eden maddenin konsantrasyonunu göstermektedir. Işığın dalga boyuna ve ışığı absorbe eden maddenin özelliğine bağlı olan absorbansın (A) birimi yoktur. Konsantrasyonun molarite olarak verildiği durumda, (ϵ) molar absorpsiyon katsayısı olarak adlandırılır ve eşitlik $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ şeklinde gösterilir. Bu koşulda (ϵ)'nun biriminin L/mol.cm olduğu eşitlikten hesaplanabilir. Konsantrasyonun mg/mL, %1 olarak verildiği durumda ise, (a) spesifik absorpsiyon katsayısı olarak adlandırılmaktadır. Çözeltiliye gelen



Şekil 9. Yüzde transmittans (% T)

monokromatik ışığın bir kısmı çözelti tarafından absorbe edilir, diğer kısmı ise ortamdan serbestçe geçerek dedektör üzerine düşer ve fotoelektrik olay sonucunda elektriksel sinyale dönüşür. Yüzde transmittans (%T); örnekten geçen ışığın enerjisinin, örneğe gelen ışık enerjisine oranının 100 ile çarpımına eşittir. Gelen ışığın tamamının absorbe edildiği durumda $\%T=0$, tamamının geçtiği durumda ise $\%T=100$ değerine eşittir. Absorbansı ölçülecek maddeyi içermeyen çözücü (kör, blank tüpünün içeriği) ışık yoluna yerleştirilir. Bu olay sonucunda küvete gelen ışık büyük oranda geçerek dedektöre ulaşır, kısmen de çözücü ve küvet tarafından absorbe edilir. Bu durumda cihazın göstergesi $\%100 T$ 'a ayarlanır. Işığın absorplayan örneği içeren küvet ışık yoluna yerleştirilerek yeniden transmisyon ölçülür. İki transmisyon ölçümü arasındaki fark absorbansı ölçülecek maddeden kaynaklanmaktadır. Spektrofotometrelerde örnekten kaynaklanan transmisyon değerinin, körün transmisyon değerine bölünmesiyle elde edilen $\% T$ değerini verir.

Lambert-Beer kanununun hesaplanması:

Lambert-Beer eşitliğinin bulunması aşağıda açıklaması yapılan bir dizi matematiksel hesaplama ile mümkün olmaktadır.

$$-\frac{dI}{I} = kdc$$

veya

$$-\frac{dI}{I} = kdc$$

$-dI$ ile gösterilen ışık transmisionundaki (T) küçük bir azalma, sabit bir ışık yolu uzunluğunda hesaplanan dc konsantrasyonunda bir artışa yol açmaktadır. Oransal bir sabit olan k konsantrasyonu araştırılan maddenin özelliğine bağlıdır. Işık şiddeti ve konsantrasyonla ilgili olarak, limitler arasının integralinin alınması ile işlemlere devam edilir.

$$\int_{I_0}^I -\frac{dI}{I} = kb \int_0^c dc$$

$$-\ln \frac{I}{I_0} = kbc$$

Yukarıdaki eşitliğin başındaki (–) işaretinden eşitliği, kurtarabilmek için \ln 'li ifadedeki pay ve payda yer değiştirir.

$$\ln I_0/I = kbc$$

Üstteki eşitlikte yer alan e tabanına göre logaritma aşağıdaki şekilde de yazılabilir

$$2.3 \log I_0/I = kbc$$

$$\log I_0/I = k/2,3 b c$$

$\log I_0/I$ yerine A , $k/2,3$ yerine ise a yazılarak Lambert-Beer eşitliği bulunur.

$$A = a.b.c$$

Enzimler biyolojik materyalde çok düşük konsantrasyonlarda bulduklarından aktivitelerinin ölçülmesi tercih edilir. Enzim aktivitesinin ölçülmesiyle ilgili metotlarda

genellikle fotometrik olarak artmış ürün konsantrasyonu, azalmış substrat veya koenzim konsantrasyonu, ya da değişime uğramış koenzim konsantrasyonundaki artış ölçülür. Laboratuarda enzim aktivitesinin ölçülmesi; ortamda fazla miktarda substrat ve koenzim varlığında yani “sıfırıncı derece kinetikte” gerçekleşir. Bu durumda enzim tarafından katalizlenen reaksiyonun hızı doğrudan enzim aktivitesine bağlıdır. NADH, laboratuarlarda en sıklıkla ölçülen koenzimdir. NADH 340 nm’de maksimum absorbans yaptığı halde, NAD bu dalga boyunda absorbans yapmaz. Enzim aktivitesi lineer fazda (ilk 6-8 dakikalık zaman) ölçülürken yöntemde önerilen sabit sıcaklık ve pH değerleri sağlanmalıdır. Spesifik koşullar altında (sabit sıcaklık, pH, substrat, aktivatörler) dakikada 1 µmol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarına bir internasyonal ünite (U) adı verilmektedir. Genellikle U/L olarak ifade edilir. Enzim aktivitesinin SI’deki karşılığı ise katal’dır. Katal saniyede bir mol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. 1 U≈16,7 nkat’dır.

Biyokimyasal redoks sistemlerinde, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar NAD⁺ (NADP⁺) ‘nin ve NADH (NADPH)’ın birbirlerine dönüşümü ile gözlemlenebilir. 260 nm dalga boyunda her iki koenzimin de yükseltgenmiş ve indirgenmiş formları ışığı absorblarken, 340 nm dalga boyunda piridin nükleotid yapısındaki bu koenzimlerin sadece indirgenmiş şekilleri ışığı absorbe eder. NADH’ın 340 nm’deki molar ekstinksiyon katsayısı ε= 6.22 x10³ mol⁻¹ x L x cm⁻¹ değerine sahiptir. Absorbans değişikliğini internasyonal üniteye çevirmek için aşağıdaki formülden yararlanılır.10⁶

$$U/L = \frac{\mu M}{dkL} = \Delta A_{min} \cdot \frac{Vt \times 10^6 \left(\frac{\mu mol}{mol} \right)}{\epsilon x V_s \times 1}$$

ΔA/min=Dakikadaki absorbans değişimi, Vt=Toplam reaksiyon hacmi = Örnek + Reaktif + Dilüent Vs=Örnek hacmi ε = ekstinksiyon katsayısı

Format dehidrogenaz enziminin optimizasyonu

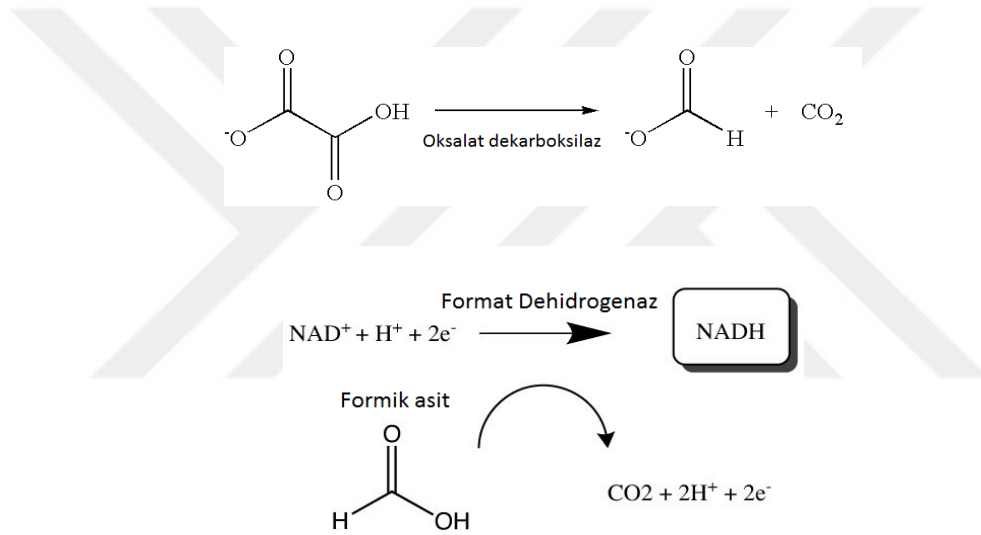
Formate dehidrogenaz enzimi ortamda bulunan format’ı formik asit ve karbondioksite parçalar ve ortama H⁺ iyonlarının salınmasını sağlar böylece ortama eklenmiş olan NAD’lara bu salınan H⁺ iyonlarını bağlayarak NADH kompleksinin oluşmasını sağlar. Spektrofotometrik ölçüm teknikleri kullanılarak da 340 nm’de NADH ölçülür böylece enzim aktivasyon tayini yapılır. Enzim ticari olarak satın alındığından dolayı içerisinde kaç ünite enzim ne kadar kaldığı gibi bilgiler yazılı olarak bulunmaktadır. Rekombinant DNA

teknolojisi ile üretilecek olan oksalat dekarboksilaz enzimi pH aralığı olarak 5-7 arası optimum koşullarda çalıştığından dolayı optimizasyon için aşağıdaki iki basamak çalışılacaktır:

- Optimum koşulları asidik pH'ya doğru indirebilme
- Minimum NAD konsantrasyonu belirlenerek en az miktarda NAD kullanılması

Rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi aktivite tayini

Üretilecek olan oksalat dekarboksilaz enziminin aktivite tayini ve optimizasyonu için öncelikle izole edilen proteinin ağırlık olarak miktarı ölçüldükten sonra U/L cinsinden miktarı ölçülecek ve daha sonra aktivitesi ölçülecektir.



Şekil 10. Oksalat dekarboksilaz ve format dehidrogenaz enziminin tepkime şeması

Oksalat dekarboksilaz enzimi son ürün olarak ortaya çıkardığı format (formik asit) ölçülmesi için birçok yol bulunmaktadır. En kolay ve biyokimyasal kitlere uyumluluk açısından en iyi yöntem format'ın format dehidrogenaz enzimi ile hem parçalanarak karbondioksit'e dönüşmesi hem de ortaya çıkan H⁺ iyonlarının ortama önceden eklenmiş NAD'lara bağlayarak NADH⁺ ortaya çıkmasıyla birlikte 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır.

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü üzere 1 mol oksalattan yine 1 mol format (formik asit) oluşmaktadır. Aynı şekilde 1mol formik asitten kopan 2 elektron ve 1 mol H⁺, 1 mol NAD⁺ ile birleşerek 1 mol NADH oluşmaktadır. Buna göre oksalat dekarboksilaz enziminin aktivite tayini ve miktarını ölçmek için direkt olarak format dehidrogenazın ortaya çıkardığı NADH⁺lar ölçülerek belirlenebilir.

4. BULGULAR

Bacillus subtilis 168 yvrK proteini rekombinant DNA teknikleri ile üretildikten sonra, Ni-NTA Spin kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Çalışma kısaca aşağıda verilen aşamalardan oluşmaktadır;

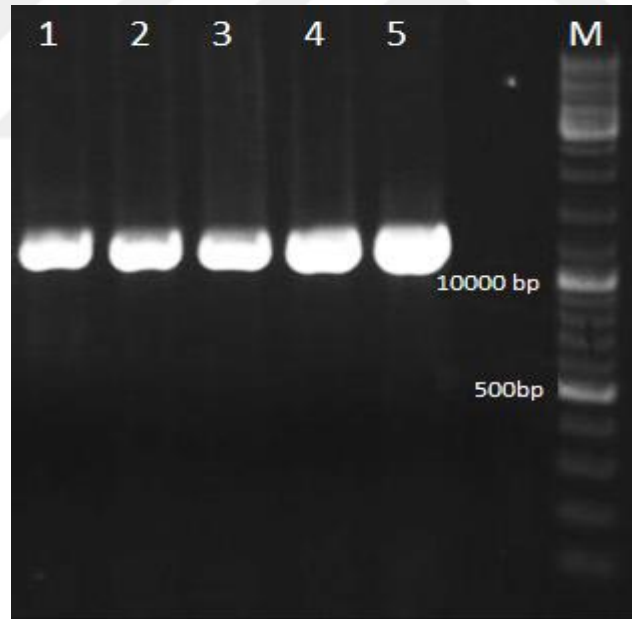
- *Bacillus subtilis* 168 mikroorganizmasından genomik DNA izolasyonu.
- Oksalat dekarboksilaz yvrK gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması
- PZR ürününün (Oksalat dekarboksilaz yvrK gen bölgesi) pETSUMO plasmidine ligasyonu
- Ligasyon ürününün klonlama konağı olan *Escherichia coli* One Shot® Mach1™ T1R hücrelerine transformasyonu
- Transformasyon sonucu *Escherichia coli* One Shot® Mach1™ T1R hücrelerinin seçici besiyerine (50µg/ml kanamisin) konularak pozitif kolonilerin seçilmesi ve PZR ile (çapraz PZR ve yvrK primerleri ile) kontrol edilmesi.
- Plasmid izolasyonu ve PZR ile kontrol edilmesi
- Sekans analizinin yapılması
- Plazmidlerin protein ekspresyon konakçısı olan *Escherichia coli* BL21 (D3) hücrelerine transfer edilmesi
- Transformasyon hücrelerinin seçici besiyerine ekilmesi ve pozitif kolonilerin PZR ile kontrol edilmesi
- Pozitif recombinant yvrK gen bölgesini içeren BL21 (D3) hücrelerinin çoğaltılması ve optimum protein ekspresyon süresinin tespit edilmesi için farklı inkübasyon sürelerinin uygulanması.
- İfade edilen proteinin çözünürlüğün tespit edilmesi.
- BL21 (D3) hücrelerinin ekstraksiyonu ve Ni-NTA spin kolonu ile saflaştırılması ve protein miktarının tayin edilmesi
- Saflaştırılan recombinant His-Sumo-yvrK proteinin, Sumo proteaz uygulanarak His-Sumo kısmının, yvrK protein kısmından kesilmesi

- Native yvrK proteinin enzimatik aktivitesinin belirlenerek format dehidrogenaz enzimi ile birlikte kullanılarak oksalat miktarının ölçülmesi.

4.1. Gen Kaynağı Seçilen Organizmadan Genomik DNA İzolasyonu

Gen kaynağı olarak *Bacillus subtilis* mikroorganizmasının 168 suşu seçilmiştir. Bütün genomdan gen alabilmek için mikroorganizmadan genomik DNA izolasyonu yapılması gerekmektedir. Liyofilize halde satın alınan mikroorganizma örneği sıvı LB besiyerinde 37°C’de bir gece bekeletilerek büyümeleri sağlanmıştır. Daha sonra sıvı besiyerinde büyüyen bakterilerden bir kısmı stok yapıp -80°C’de saklanmak için gliserol ortamına alınıp saklandı. Daha sonra tekrar sıvı besiyerinde 1, 3, 5, 10 ve 20ml’lik kültürlerden örnekler santrifüj edilip elde edilen peletten genomik DNA izolasyonu yapıp %1’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp gösterilmiştir.

Jel görüntüsünden sonra 5ml’lik bakteri peleti kullanılarak çalışmaya devam edildi. Kalan DNA’lar daha sonra kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.



Şekil 11. İzole edilen *Bacillus subtilis* 168 M suşundan elde edilen genomik DNA

4.2. Belirlenen Gen ve Tasarlanan Primerler

Klonlanacak olan gen www.uniprot.org ve ncbi.nih.gov sitelerinden yapılan araştırma sonucunda yvrK proteinini kodlayan genler seçildi. Biyoinformatik yazılımlar ile yapılan analizler sonucunda yvrK proteinin kodlayan genler için bir çift primer tasarımı yapıldı. Primerler aşağıdaki gibidir;

Oligo Adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz Sayısı	Skala	MW (g/mol)	Tm (°C)	GC (%)	nmol
yvrK-Forward	ATG AAA AAA CAA AAT GAC ATT CCG	24	50 nmol	7371	54.2	29.2	62.1
yvrK-Reverse	TTA TTT ACT GCA TTT CTT TTT CAC TAC T	28	50 nmol	8436	56.3	25.0	53.1

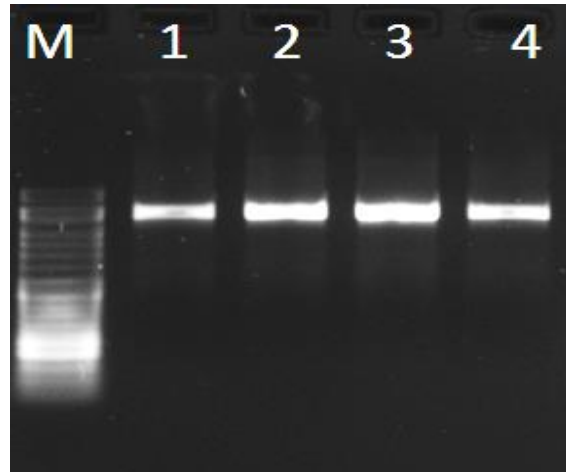
Tablo 9. yvrK geni için belirlenen primerlerin bulguları

Oligo Adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz Sayısı	Skala	MW (g/mol)	Tm (°C)	GC (%)	nmol
SUMO Forward	AGA TTC TTG TAC GAC GGT ATT AG	23	200 nmol	7094	57.1	39.1	54.4
T7 Reverse	TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG	20	200 nmol	6179	57.3	50	60.4

Tablo 10. pET-SUMO vektörü için kontrol amaçlı belirlenen primerlerin bulguları

4.2.1. PZR ile çoğaltılan gen bölgesi bulgusu

İzole edilen *Bacillus subtilis* genomik DNA'sı ve yvrK gen bölgesi için dizayn edilen primerler kullanılarak PZR işlemi yapıldı. PZR işleminde optimum ürün elde etmek için, en uygun Tm sıcaklığını (primerlerin bağlanma ısısı) tespit etmek için farklı Tm sıcaklığı ve sürelerde (annealing süresi) PZR işlemi yapıldı. PZR sonucu % 1'lik agarose jel



Şekil 12. Gradient PZR sonucu. M) 1500bp DNA marker 1) 52°C, 2) 54°C, 3)58°C 4) 60°C

elektroforezinde görüntülendi. PZR işlemi sonucunda 1158 bp büyüklüğünde farklı yoğunlukta ürün elde edildiği tespit edildi. En iyi ürünün 4. bandta elde edildiği tespit edildi. Bunun sonucunda sonraki PZR işlemlerinde annealing aşaması için optimum şartlar 58°C'de 45 sn olarak tespit edildi.

Primerler her ne kadar yazılımlarla tasarlandığında PZR uygulamasındaki bağlanma sıcaklıkları belirlense de bu hesap her zaman doğru olmayabiliyor. Bu yüzden gradient PZR yapılarak optimum bağlanma sıcaklığı belirlendi. Gradient PZR için izole edilen genomik DNA'lar kullanılarak 52°C, 54°C, 58°C ve 60°C sıcaklıklarında gradient PZR yapıldı. Optimize edilen PZR programı kullanılarak elde edilen ürün, %1 lik agarose jelde görüntüledikten sonra kalan PZR ürünü ligasyon işleminde kullanıldı.

4.3. Vektör Hazırlama

Gen konakçısı mikroorganizmadan PZR ile çoğaltılan gen bölgesi klonlama yapmak için kullanılan vektöre aktarıldı. Bunun için pET-SUMO vektörü kullanıldı. Bu vektöre PZR ile çoğaltılan gen bölgesi DNA Ligaz enzimi ile vektörde açık bulunan uçlara bağlayarak vektörü hazırlar.

4.3.1. Ligasyon ve TA klonlama bulguları

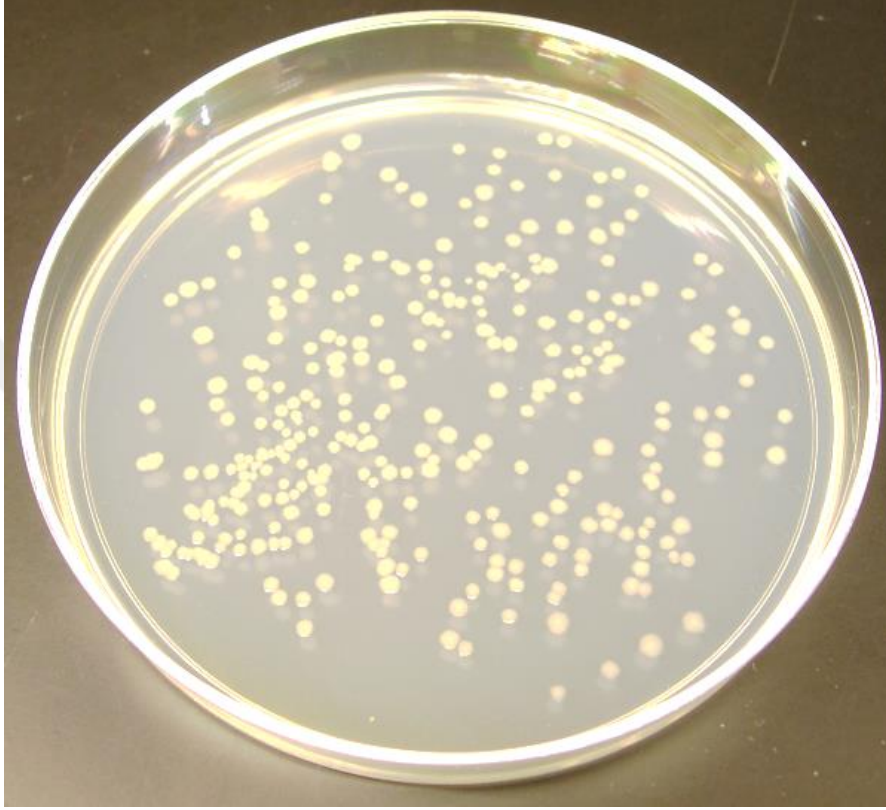
yvrK gen bölgesinin PZR işlemi esnasında, PZR programının extension aşamasında (72°C'de 10 dk) ekzonükleaz aktivitesi olmayan taq polimeraz enzimi kullanıldığı için, gen bölgesinin uç kısımlarına poli A (adenin) nükleotidleri eklenir. Bu sayede uç kısımlarında T (timin) nükleotidleri eklenerek lineer hale getirilmiş pETSUMO vektörüne, yvrK gen bölgesinin bağlanması sağlanır. Ligasyon işlemiyle; ortama ilave edilen T4 Ligaz enzimi'de gen bölgesinin pETSUMO vektörüne sağlam bir şekilde entegre olmasını sağlar.

Ligasyon işlemi sonrasında PZR ürünün, pETSUMO vektörüne yerleştiği ve lineer bir yapıya sahip olan pETSUMO vektörünün yvrK gen bölgesinin eklenmesiyle sirküler bir yapıya dönüştüğü varsayıldı.

4.3.2. Transformasyon ve klonlama bulguları

yvrK gen bölgesi yerleştirilen pETSUMO vektörünün çoğalması ve stabil bir yapıya kavuşması için *Escherichia coli* One Shot® Mach1™T1R hücrelerine transfer edildi.

Transformasyon ısı şoku uygulanarak yapıldı. Transformasyon işleminden sonra; 50µg/ml kanamisinli LB agar besiyerine ekim yapıldı. Transformasyon sonrasında plazmid içeren koloniler, kanamisine dirençli olduklarından dolayı kanamisinli besiyerinde çoğalıp koloni oluştururken, plazmid içermeyen bakteriler direnç gösteremediklerinden dolayı ölürler.



Şekil 13. Transforme edilmiş bakterilerin büyüdüğü petri kabı

Kanamisinli besiyerinde oluşan koloniler, plazmid içerebilirler fakat yvrK gen bölgesini içerip içermediklerinin kontrol edilmesi gereklidir. Bu yüzden oluşan kolonilerden yedi tanesi seçildi. Koloniler seçilirken; iyi gelişmiş, tek ve diğer kolonilerden biraz uzakta bulunan koloniler seçildi. Kolonilerin uzakta olması; koloniden örnek alınırken, koloniler arasında muhtemel kontaminasyonu önlemek için yapıldı.

4.4. Doğru Klon ve Transformant Hücrelerin Tespiti

Petride bulunan her koloni doğru plazmidi almamış olabilir. Bazı durumlarda ortamdaki kontaminasyondan dolayı antibiyotik olmasına karşın bu antibiyotike karşı dirençli olan mikroorganizmaların karışma ihtimali olabiliyor. Diğer kolonilerden farklı olarak daha büyük ve diğerlerinden uzak olan koloniler seçilip PZR ve kontrol amaçlı olarak çapraz PZR yapılarak transforme edilen bakterilerin içerdiği gen bölgesi doğrulandı.

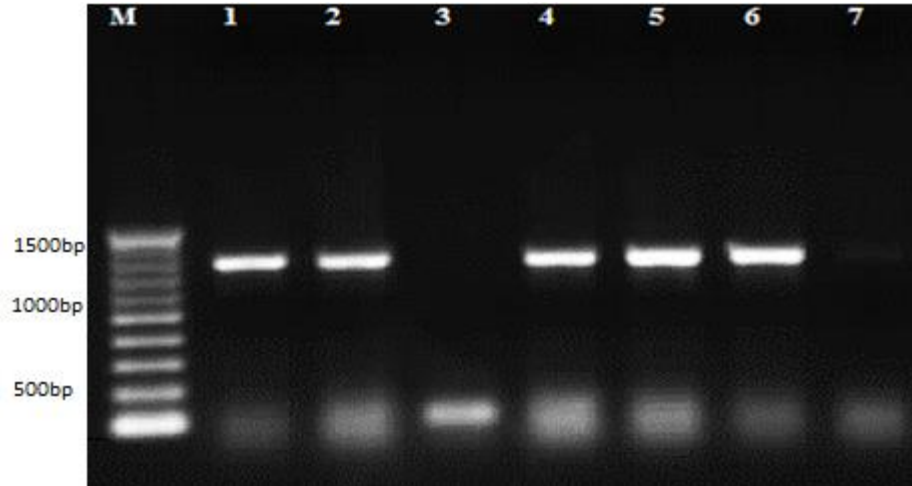
4.4.1. Koloni PZR sonucu

Seçilen 7 kolonilerden steril kürdan ile alınan örnekler 5ml'lik kanamisin içeren LB besiyerinde gece boyu 37°C'de inkübe edilerek büyümeleri sağlandı. Daha sonra santrifüjlenerek elde edilen pelet 50µl saf su ile çözülerek 95°C'de 10 dakika boyunca ısıtıldı. Sonrasında 10.000rpm'de 5 dakika santrifüj yapıp supernatant kısımları kalıp DNA olarak kullanılıp PZR yapıldı.

yvrK gen bölgesinin primerleri ile yapılan PZR işlemi; pozitif kolonilerin içerdiği plasmidlerde yvrK gen bölgesinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla yapıldı. Eğer mevcut koloni içerisinde yvrK geni varsa PZR işlemi sonucunda, 1158 büyüklüğünde ürün elde edilmesi gerekir.

Bu işlem için toplam 7 koloniden örnek alınarak PZR yapıldı. PZR ürünü % 1'lik agarose jel elektroforezinde görüntülendi. Sonuçta 7 koloninin 5 inde yvrK gen bölgesinin olduğu tespit edildi.

Aşağıdaki şekilde yvrK primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucu görülmektedir. Sonuçta seçilen 7 koloniden 5'inde 1158bp büyüklüğündeki yvrK gen bölgesinin olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 14. Transforme edilmiş bakterilerden yapılan PZR bulgusu

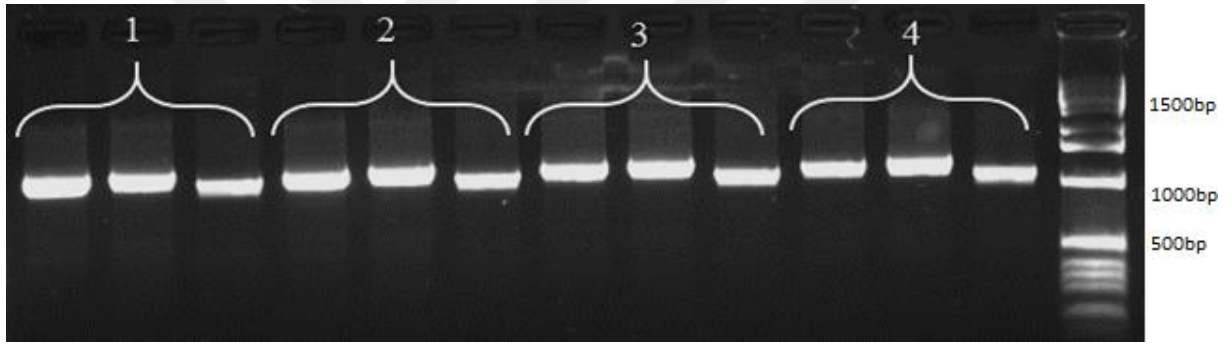
4.4.2. Çapraz PZR sonucu

Çapraz PZR işlemi; yvrK gen bölgesini içeren plazmidlere sahip *Escherichia coli* One Shot® Mach1™T1R bakterilerinde, yvrK gen bölgesinin doğru bir şekilde plazmide yerleşip yerleşmediğini test etmek amacıyla yapıldı. His-sumo-yvrK recombinant proteinin

sentezlenebilmesi için, plazmidin sumo kısmından hemen sonra, yvrK gen bölgesinin başlangıç kodonunun gelmesi gerekir, aksi durumda yvrK gen bölgesinin stop kodonu N-terminal kısma geleceğinden, His-sumo-yvrK recombinant proteinin yerine, yalnızca His-sumo proteini üretilir.

YvrK gen bölgesini içerdiği tespit edilen 7 koloniden 4 tanesi alınarak çapraz PZR-A ve PZR-B işlemi yapıldı. Çapraz PZR işlemi sonunda seçilen 4 koloninin tamamında pozitif sonuç elde edildi.

Aşağıdaki agarose jel şeklinde 4 pozitif koloniden farklı büyüklükte 3 farklı bant gözlenmektedir. Her koloniden sırasıyla SumoForward ve yvrK-Reverse, yvrK-Forward ve T7 Reverse son olarak yvrK-Forward ve yvrK Reverse primer çift ile yapılmış PZR sonucunda agaroz jel elektroforezi sonucu bantlar oluşmuştur.



Şekil 15. Kontrol amaçlı yapılmış çapraz PZR sonucu

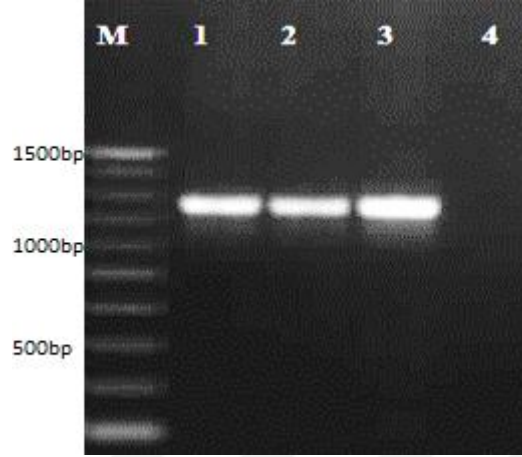
Çapraz PZR sonucunda pozitif olan 4 koloniden bir tanesi alınarak çalışmaya devam edildi. PZR işleminden önce LB agar ortamına ekimi yapılan bu koloniye kürdan ucuyla dokunularak, yeni bir 50µg/ml kanamisinli LB agar besiyerine ekimi yapıldı.

4.4.3. Plazmid izolasyonu ve kontrol PZR

Çoğalan recombinant *Escherichia coli* One Shot® Mach1™T1R hücrelerinden plasmid izolasyonu yapılarak 100µl plasmid elde edildi. Plasmidlerin 10µl'si agarose jel elektroforezinde izole edilen plasmidi görüntülemek için kullanılırken, bir kısımda çapraz PZR ve yvrK PZR işlemlerinde kullanıldı. Geriye kalan plasmidler ise sekans analizi ve BL21 (D3) hücrelerine transfer etmek için -20°C'de saklandı.

İzole edilen plasmidler BL21 (D3) hücrelerine transfer edilmeden önce kontrol ve çapraz PZR işlemlerine tabi tutuldu. Bu işlemler sayesinde transfer işleminden önce

plazmidlerin yvrK gen bölgesini içerip içermediği ve yvrK gen bölgesinin plazmide doğru yönde yerleşip yerleşmediği test edildi.



Şekil 16. İzole edilen plazmidlerle yapılmış PZR bulgusu.

Yukarıdaki şekil incelendiğinde; YvrK primerleri kullanılarak yapılan plasmit PZR sonucunda 1153 bp ürün oluştuğu gözlemlendiğinden dolayı, izole edilen plazmidlerde yvrK precursor gen bölgesinin olduğu tespit edilmiştir.

4.4.4. Dizileme sonucu

İzole edilen plazmidlerin 50µl'si sekans analizi için kullanıldı. Sekans analizi gen aktarımı yapılan plazmidte, genin doğru bir şekilde yerleşip yerleşmediği ve PZR işlemleri sırasında eklenen gen bölgesinde herhangi bir mutasyonun olup olmadığını test etmek amacıyla yapıldı. Sekans analizi çift yönlü Sumo Forward ve T7 reverse primerleri kullanılarak yapıldı. Sekans sonucu <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> adresinden clustal W2 programı kullanılarak karşılaştırıldı, sonuçta sekans analizi yapılan bölgenin, yvrK gen bölgesiyle % 96,6 oranında benzerlik gösterdiği, farklılık oluşturan kısmın ise plazmide ait bölgede olduğu ve bu farklılığın sekanslama sonucunda oluşan bir hata olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sekans sonucu <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> adresinden blastlama yapılarak sonuçların doğruluğu teyit edildi.

```

yvrK -----
Dizileme AGATTCCTGTACGACGGTATTAGAATTCAAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATG 60
yvrK -----
Dizileme GAGGATAACGATATTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTATGAACACTCGTGCT 120
yvrK ATGAAAAAACAAAATGACATTCCGCAGCCAATTAGAGGAGACAAAGGAGCAACGGTAAAA 60
Dizileme ATGAAAAAACAAAATGACATTCCGCAGCCAATTAGAGGAGACAAAGGAGCAACGGTAAAA 180
*****
yvrK ATCCCGCGCAATATTGAAAGAGACCGGCAAAACCCTGATATGCTCGTTCGCCTGAAACC 120
Dizileme ATCCCGCGCAATATTGAAAGAGACCGGCAAAACCCTGATATGCTCGTTCGCCTGAAACC 240

```

```

*****
yvrK      GATCATGGCACCGTCAGCAATATGAAGTTTTTCATTCTCTGATACTCATAACCGATTAGAA 180
Dizileme  GATCATGGCACCGTCAGCAATATGAAGTTTTTCATTCTCTGATACTCATAACCGATTAGAA 300
*****
yvrK      AAAGGCGGATATGCCCGGGAAGTGACAGTACGTGAATTGCCGATTCAGAAAACCTTGCA 240
Dizileme  AAAGGCGGATATGCCCGGGAAGTGACAGTACGTGAATTGCCGATTCAGAAAACCTTGCA 360
*****
yvrK      TCCGTAAATATGCGGCTGAAGCCAGGCGGATTCGCGAGCTTCACTGGCATAAAGAAGCT 300
Dizileme  TCCGTAAATATGCGGCTGAAGCCAGGCGGATTCGCGAGCTTCACTGGCATAAAGAAGCT 420
*****
yvrK      GAATGGGCTTATATGATTACGGAAGTGCAAGAGTCAACAATTGTAGATGAAAAAGGGCGC 360
Dizileme  GAATGGGCTTATATGATTACGGAAGTGCAAGAGTCAACAATTGTAGATGAAAAAGGGCGC 480
*****
yvrK      AGCTTTATTGACGATGTAGGTGAAGGAGACCTTTGGTACTTCCCGTCAGGCCTGCCGCAC 420
Dizileme  AGCTTTATTGACGATGTAGGTGAAGGAGACCTTTGGTACTTCCCGTCAGGCCTGCCGCAC 540
*****
yvrK      TCCATCCAAGCGCTGGAGGAGGAGCTGAGTTCCTGCTCGTGTGTTGACGATGGATCATTC 480
Dizileme  TCCATCCAAGCGCTGGAGGAGGAGCTGAGTTCCTGCTCGTGTGTTGACGATGGATCATTC 600
*****
yvrK      TCTGAAAACAGCACGTTCCAGCTGACAGATTGGCTGGCCACACTCCAAAAGAAGTCATT 540
Dizileme  TCTGAAAACAGCACGTTCCAGCTGACAGATTGGCTGGCCACACTCCAAAAGAAGTCATT 660
*****
yvrK      GCTGCGAACTTCGGCGTGACAAAAGAAGAGATTTCCAATTTGCCTGGCAAAGAAAATAT 600
Dizileme  GCTGCGAACTTCGGCGTGACAAAAGAAGAGATTTCCAATTTGCCTGGCAAAGAAAATAT 720
*****
yvrK      ATATTTGAAAACCAACTTCCTGGCAGTTTAAAAGATGATATTGTGGAAGGGCCGAATGGC 660
Dizileme  ATATTTGAAAACCAACTTCCTGGCAGTTTAAAAGATGATATTGTGGAAGGGCCGAATGGC 780
*****
yvrK      GAAGTGCCTTATCCATTTACTTACC GCCTTCTTGAACAAGAGCCGATCGAATCTGAGGGA 720
Dizileme  GAAGTGCCTTATCCATTTACTTACC GCCTTCTTGAACAAGAGCCGATCGAATCTGAGGGA 840
*****
yvrK      GGAAAAGTATACATTGCAGATTTCGACAAACTTCAAAGTGTCTAAAACCATCGCATCAGCG 780
Dizileme  GGAAAAGTATACATTGCAGATTTCGACAAACTTCAAAGTGTCTAAAACCATCGCATCAGCG 900
*****
yvrK      CTCGTAACAGTAGAACCCGGCGCCATGAGAGAAGTGCCTGGCACCCGAATACCCACGAA 840
Dizileme  CTCGTAACAGTAGAACCCGGCGCCATGAGAGAAGTGCCTGGCACCCGAATACCCACGAA 960
*****
yvrK      TGGCAATACTACATCTCCGGTAAAGCTAGAATGACCGTTTTTGCATCTGACGGCCATGCC 900
Dizileme  TGGCAATACTACATCTCCGGTAAAGCTAGAATGACCGTTTTTGCATCTGACGGCCATGCC 1020
*****
yvrK      AGAACGTTTAATTACCAAGCCGGTGTGTCGGATATGTACCATTTGCAATGGGTCAATTAC 960
Dizileme  AGAACGTTTAATTACCAAGCCGGTGTGTCGGATATGTACCATTTGCAATGGGTCAATTAC 1080
*****
yvrK      GTTGAAAACATCGGGGATGAACCGCTTGTCTTTTTAGAAATCTTCAAAGACGACCATTAT 1020
Dizileme  GTTGAAAACATCGGGGATGAACCGCTTGTCTTTTTAGAAATCTTCAAAGACGACCATTAT 1140
*****
yvrK      GCTGATGTATCTTTAAACCAATGGCTTGCCATGCTTCTGAAACATTTGTTCAAGCGCAC 1080
Dizileme  GCTGATGTATCTTTAAACCAATGGCTTGCCATGCTTCTGAAACATTTGTTCAAGCGCAC 1220
*****
yvrK      CTTGACTTGGGCAAAGACTTTACTGATGTGCTTTCAAAGAAAAGCACCCAGTAGTGAAA 1140
Dizileme  CTTGACTTGGGCAAAGACTTTACTGATGTGCTTTCAAAGAAAAGCACCCAGTAGTGAAA 1280
*****
yvrK      AAGAAATGCAGTAAATAA 1158
Dizileme  AAGAAATGCAGTAAATAA 1298
*****

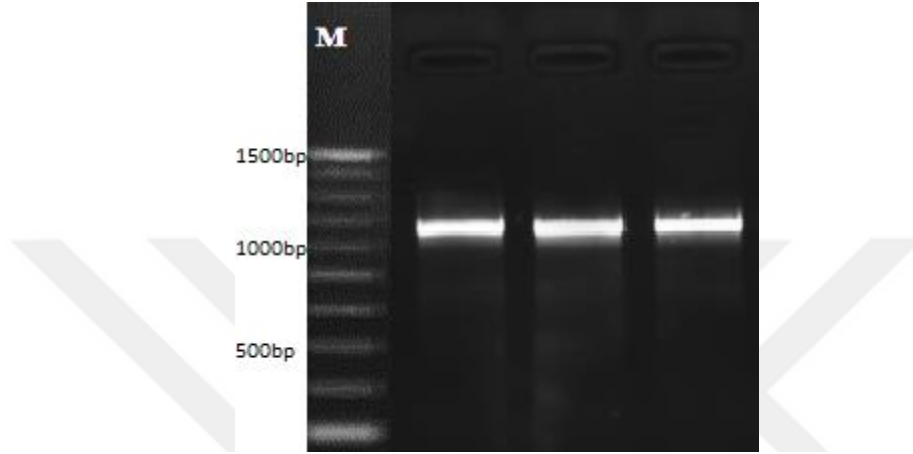
```

4.5. Protein İfade Bulguları

Plazmid PZR ve sekans analizi işlemlerinden sonra, kalan plazmidler protein ekspresyonu sağlayan *Escherichia coli* One Shot® BL21(DE3) hücrelerine ısı şoku uygulanarak, transfer edildi. Transformasyon sonucunda, plazmidlerin BL21(DE3) hücrelerine transfer edilip edilmediğini kontrol etmek amacıyla, transformasyon sonrasında,

transformant hücreler 50µg/ml kanamisinli LB agar besiyerine ekilerek inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında oluşan üç koloni alınarak kontrol PZR işlemleri yapıldı.

PZR işlemi sonucunda seçilen tüm kolonilerde plazmidlerin BL21 (DE3) hücrelerine transfer edildiği tespit edildi. Bu işlemden sonra hücreler 50µg/ml kanamisinli LB sıvı besiyerine ekilerek, protein ekspresyon işlemine geçildi.



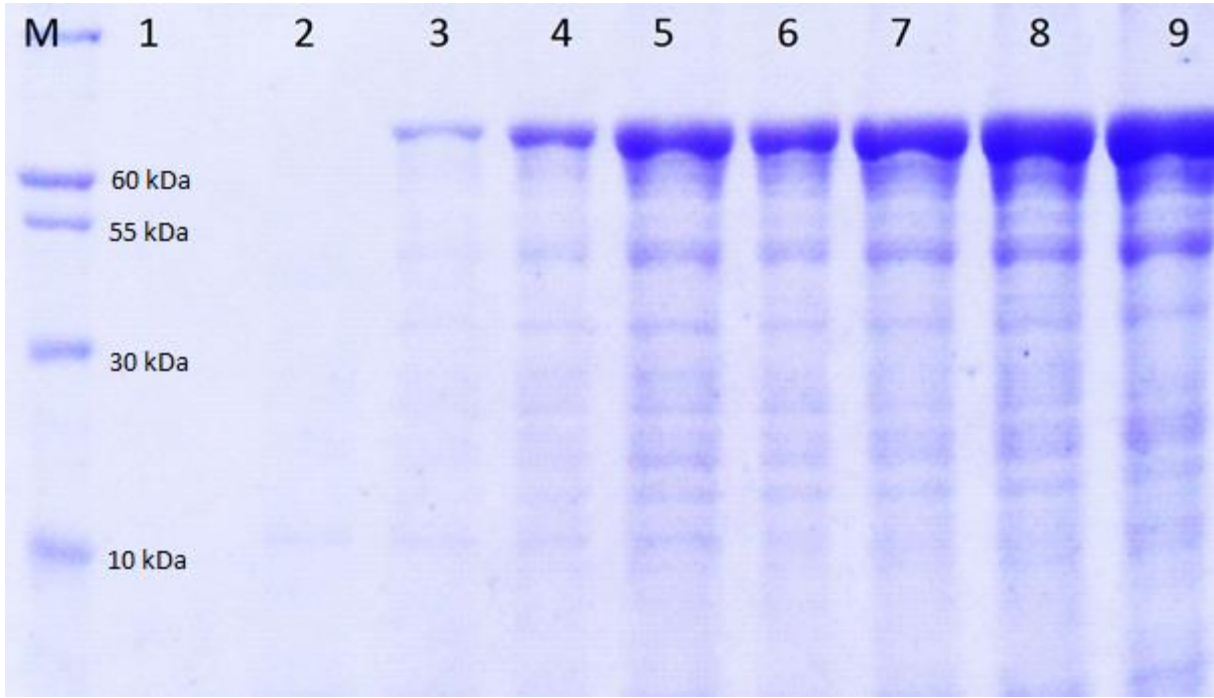
Şekil 17. Transformasyon sonucu izole edilen ifade konakçılarının kontrol PZR'ı

Protein ekspresyonu için 40µl recombinant *Escherichia coli* BL21 (D3) kültür ortamı, 20ml 50µg/ml kanamisinli LB sıvı ortama eklenip, 37°C 200 rpm'de yaklaşık olarak 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında spektrofotometrede 600 nm'de absorbansın 0.5 olduğu tespit edildikten sonra kültür ortamı 10ml lik iki tüpe ayrıldı. Tüplerin birine son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG eklendikten sonra 1. saatten başlanarak saat başı 7.saate kadar kültür ortamından 1ml 'lik kültür ortamı alınarak SDS page yapıldı.

Optimum protein ekspresyonun yapıldığı ortam şartlarını tespit etmek amacıyla çeşitli denemeler yapıldı. Öncelikle His-Sumo-yvrK füzyon proteinin inklüzyon taneciklerine dönüşmeden üretilmesi için 1 mM IPTG ile 30°C de farklı sürelerde inkübe edilerek 1-24. saatlerde örnek alınıp, protein ekspresyon seviyesi SDS-PAGE yapılarak incelendi. Farklı inkübasyon sürelerinde örnek alınarak protein ekspresyon seviyesine bakıldı. Her saat başı alınan örnek IPTG ilave edilmiş grup, IPTG ilave edilmemiş grup ile karşılaştırılarak incelendi.

Sonuçta; His-Sumo-yvrK füzyon proteinin çok az miktarda bazal ekspresyon seviyesinde üretildiği tespit edildi. Yapılan denemeler sonucunda protein ekspresyonu için optimum ortam sıcaklığının 37°C, protein ekspresyon indükleyici IPTG konsantrasyonunun 1 mM olduğu tespit edildi.

Protein ekspresyonunun hangi inkübasyon süresinde optimum olduğunu tespit etmek için, farklı inkübasyon sürelerinde, protein ekspresyon seviyeleri SDS page yapılarak gözlemlendi. Şekilde verilen; 0-24. saatlik inkübasyon sonrası kültür ortamı kullanılarak yapılan SDS Page sonucuna göre; protein ekspresyonunun 0-2. saatler arasında çok az olduğu, 2. saatte başladığı ve 24. saate kadar devam ettiği tespit edildi.



Şekil 18. IPTG ile indüklenme sonucu elde edilen farklı saatlerdeki proteinlerle yapılmış SDS-Page bulgusu. M) Protein Marker 1) 0 saat IPTG (-) 2) 0 saat IPTG (+) 3) 1 saat IPTG (+) 4) 2 saat IPTG (+) 5) 3 saat IPTG (+) 6) 4 saat IPTG (+) 7) 5 saat IPTG (+) 8) 6 saat IPTG (+) 9) 24 saat IPTG (+)

Sonraki aşamada; elde edilen toplam protein miktarının hücre sayısı ile doğru orantılı olarak artacağı varsayılarak, daha uzun inkübasyon sürelerindeki protein ekspresyon seviyesine bakıldı. Bu amaçla 6-8. saatlerde inkübasyon yapılarak protein ekspresyon seviyelerine bakıldı. Ayrıca bu denemede IPTG eklendikten hemen sonra (0. saat) ve 1. saatte'de örnek alınarak düşük inkübasyon süresindeki ekspresyon seviyesi de kontrol edildi.

SDS page sonucuna göre; 0. ve 1. saatlerde protein ekspresyonunun olmadığı, 6 saatlik inkübasyondan sonraki sürelerde ekspresyon seviyesinde azda olsa azalma olduğu tespit edildi. Sonuçta yüksek miktarda protein ekspresyonu için optimum inkübasyon süresi 6 saat olarak tespit edildi.

Protein ekspresyonunda kültür ortamının inkübasyon süresi tespit edildikten sonra, protein saflaştırma aşamasında yüksek verim elde etmek için, protein çözünürlüğünün test edilmesi gerekir. Bu yüzden kültür ortamından elde edilen hücre peleti, nativ lizis metodu ile

lize edildikten sonra süpernatant kısmı SDS page yapılarak görüntülendi. Sonuçta süpernatant kısmında His-sumo-yvrK füzyon proteinin olduğu belirlendi. Bu sonuç His-sumo-yvrK füzyon proteinin inklüzyon tanecikleri halinde depolanmadığını göstermektedir.

Yapılan denemeler sonucunda; hücrelerin öncelikle native metodla lize edildikten sonra, elde edilen peletin inklüzyon tanecikleri açısından zengin olmadığı tespit edildi. Nativ lizis sonucu oluşan pelet içindeki inklüzyon tanecikleri denatüre lizis yapıldıktan sonra SDS page yapılarak incelendiğinde protein verimliliğinin belirgin şekilde arttırmadığı gösterildi. Bu sonuçlar doğrultusunda protein saflaştırma işlemi esnasında nativ liziz yöntemi yeterli görüldü.

4.6. Protein Saflaştırma Bulguları

His-Sumo-yvrK füzyon proteini rekombinant olarak üretildikten sonra protein üretim konakçısı olan *Escherichia coli* BL-21 (DE3) hücrelerinden toplam protein izolasyonu yapıldı. Üretilen rekombinant protein, N- terminal kısmında His-tag kısmına sahip olduğu için histidin'e (His) afinite gösteren Ni-NTA agarose partiküllerinden oluşan affinite kromatografisi ile toplam protein içerisinde rekombinant protein saflaştırılarak, SDS-PAGE jelinde görüntülendi.

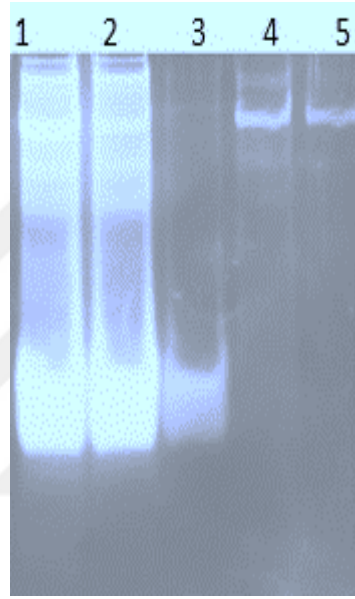
Escherichia coli BL21 (D3) hücreleri, 37°C'de, 50 ml kültür ortamında 6 saat 1 mM IPTG ile indüklenerek protein ekspresyonu gerçekleştirildi. Protein ekspresyonundan sonra, elde edilen hücre peleti (0,96 mg) ekstraksiyon yapılarak lize edildi. Elde edilen hücre lizati, Ni-NTA spin kolonuna yüklenerek protein saflaştırma işlemine tabi tutuldu.

4.6.1. Ni-NTA spin kolon ile ayırma bulguları

Affinite kolonunda; örnekler binding buffer (dengeleme tamponu) içerisinde dilüe edilerek kolona yüklendi. Binding buffer (bağlama tamponu) yüklemesi sonucu öncelikle, kolona bağlanmayan proteinler kolondan ayrıldı, washing buffer (yıkama tamponu) kolona yüklendiğinde ise kolona zayıf bağlanan proteinlerin kolondan ayrılması sağlanarak, yalnızca His-tag kısmı içeren His-sumo-yvrK rekombinat proteinin kolona bağlı olarak kalması sağlandı. En son aşamada ise; imidazol konsantrasyonu yüksek elüsyon tamponu kolona yüklenerek, kolona bağlı olan rekombinant His-sumo-yvrK proteinlerinin kolondan ayrılması sağlandı. Bu şekilde total hücre lizati içerisinde bulunan binlerce protein içerisinde rekombinant His-Sumo-yvrK proteinini saflaştırıldı.

Aşağıdaki şekilde görüldüğü üzere yapılan SDS-PAGE'de native yöntemle yapılmış lizat, bağlama tamponu ile yapılmış yükleme, birinci ve ikinci yıkama ve birinci ile birlikte

ikinci elüsyon işlemleri sonucunda elde edilmiş proteinlerin görüntüsü yer almaktadır. 1. bantta liziz edilen tüm proteinler görüntülenmektedir, 2. bantta ise kolona yüklenen proteinlerin kolondan geçtikten sonra elde edilen tüm proteinlerin görüntüsü bulunmaktadır. Burada ifade edilen rekombinant proteinin yıkama sonrası bile hala bir miktar bulunması kolonun bağlanma kapasitesinin üstünde bir miktarda üretim olduğunu göstermektedir. 3. bantta ikinci defa yapılan yıkama işlemindeki proteinler gösterilmektedir burda da yine az miktarda diğer proteinlerin olduğu gösterilmiştir. Son iki bantta ise birinci ve ikinci elüsyon işlemleri sonucunda elde edilen rekombinant protein görülmektedir. İkinci elüsyonda bile hala



Şekil 19. Spin kolon kullanılarak elde edilmiş protein saflaştırma işlemlerini gösteren SDS-PAGE görüntüsü. 1) Native yöntemle elde edilen bakteri lizatı 2) Kolona yüklendikten sonra toplanan proteinler 3)Yıkama işlemi sonrası toplanan kısım 4) ilk elüsyon basamağı 5) İkinci elüsyon basamağı

birinci elüsyona nazaran az ama yine etkili bir miktar rekombinant protein elde edilmiştir.

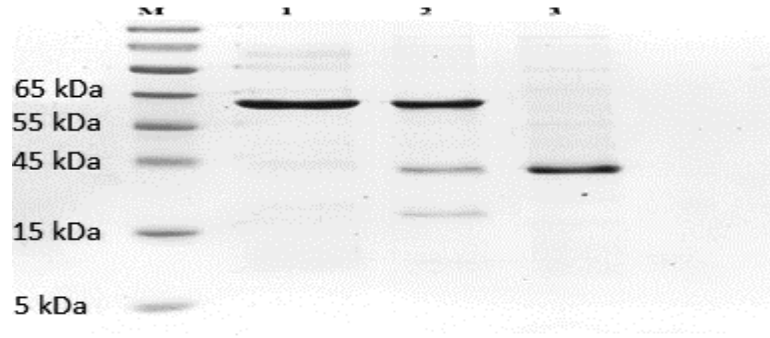
4.6.2. Diyaliz membran sonucu

Spin kolonlardan geçirildikten sonra elde edilen saflaştırılmış rekombinant proteinler diyaliz işlemine tabi tutulması gerekiyor. Son saflaştırma basamağı olan elüsyon basamağında 500mM konsantrasyonunda bulunan imidazol SUMO proteaz için çok yüksek miktar olduğu için SUMO proteazın çalışmasını etkilemektedir. Bu yüzden seriler halinde imidazol miktarı azaltıldı ve en son aşamada PBS ile diyaliz yapılarak hem tuz miktarı hem de imidazol miktarı optimum düzeye indirildi.

4.6.3. SUMO Proteaz ile kesim sonucu

Sumo proteaz enzimi; His-Sumo-yvrK proteininin His-Sumo- kısmını keserek nativ yvrK proteinin elde edilmesini sağlar. Ni-NTA affinite kolonu ile saflaştırma işleminden

sonra elde edilen His-Sumo-yvrK füzyon proteini diyaliz edildikten sonra, proteaz işlemine tabi tutuldu. SUMO proteaz ile kesim işleminden sonra proteinler tekrar Ni-NTA spin

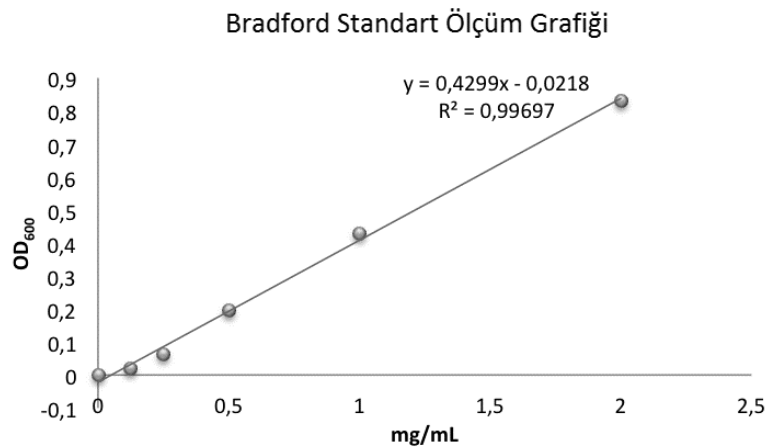


Şekil 20. SUMO Proteaz ile yapılan enzimatik kesim işlemi sonrasında yapılan spin kolon ile saflaştırma görüntüsü. M) Protein marker 1) Elüsyon sonrası elde edilen His-Sumo-yvrK proteini 2) Enzimatik kesim sonucu oluşan bantlar 3) Spin kolon ile elde edilen saf rekombinant protein

kolondan geçirildi böylece ilk aşamada hem SUMO proteaz enzimi hem de kesilmiş olan His-SUMO kısımları üretilen rekombinant proteinden ayrılmış oldu. Önceki Ni-NTA spin kolondan farklı olarak bu sefer yıkama işlemindeki proteinler toplandı ve böylece üretilen rekombinant protein enzim saflaştırılmış olarak elde edildi. SUMO proteazla kesim sonucu SDS page yapılarak görüntülendi.

4.6.4. Protein miktarının belirlenmesi

Bradford yöntemiyle yapılan ölçüm ile protein miktarı belirlendi. Bunun için değerlendirilmede kullanılacak olan standartlar ölçüldü ve aşağıdaki grafik elde edildi.



Şekil 21. Bradford standart ölçüm grafiği

Elde edilen saflaştırılmış rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi protein olarak Bradford yöntemi ile ölçüldü. Sonuç olarak elde edilen enzim, protein olarak 1.8mg/ml olarak elde edildi.

4.7. Enzimatik Aktivite Bulguları

4.7.1. Format dehidrogenaz enziminin optimizasyon bulguları

Format dehidrogenaz enzimi 300mg 250U olarak. SIGMA firmasından satın alındı. Üretilen rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin aktivite tayini için önceden format dehidrogenazın enziminin optimizasyonu yapılması gerekmektedir. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi asidik karakterde olduğu için öncelikle pH'nın asidik karaktere düşülmesi gerekmektedir bunun için farklı pH'lardaki tamponlar kullanıldı.

pH	Tampon ve konsantrasyonu	Sodyum format	Format dehidrogenaz	NAD	ΔA
7	PBS 100mM	1M	4mg/ml	500mM	0,230
6	PBS 100mM	1M	4mg/ml	500mM	0,350
5	Sitrat Tamponu 100mM	1M	4mg/ml	500mM	0,39

Tablo 11. Format dehidrogenaz enzimi ile yapılan optimizasyon çalışmaları.

Kullanılan bileşen	Miktar	İlk konsantrasyon
Format dehidrogenaz	250 μ l	4mg/ml
Sodyum format	100 μ l	1M
NAD	250 μ l	50mM

Tablo 12. Format dehidrogenaz enzimi ile yapılan optimizasyon çalışmalarda kullanılan bileşen ve miktarları

Tabloda yazılı olan bileşenler kullanılarak format dehidrogenaz enziminin asidik özellikte çalışabileceği optimum koşullar belirlendi. Bu değerler daha sonra üretilen rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin enzimatik aktivitesini ölçmek için kullanıldı.

4.7.2. Rekombinant oksalat dekarboksilaz'ın enzimatik aktivite bulguları

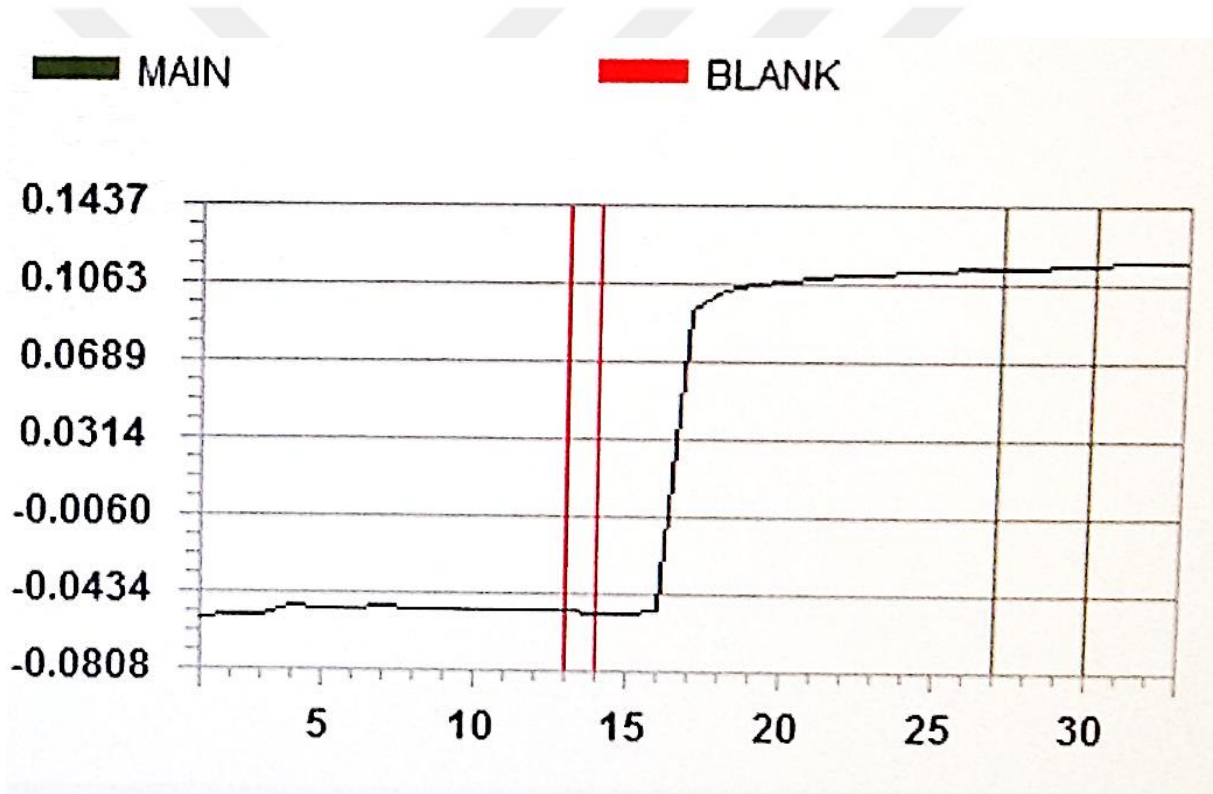
Bacillus subtilis M168 suşundan elde edilen genlerin pET-SUMO vektör sistemiyle aktarıldığı *Escherichia coli* mikroorganizmalarla üretilen rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin aktivitesinin göstermek için Abbott marka Achitect c8000 model araştırma cihazı kullanıldı. Bu cihaz sayesinde çok daha az miktarda reaktiflerle daha hızlı ve net sonuçlar elde edilebildi. İlk denemede aşağıdaki miktarlar kullanılarak ölçüm yapıldı.

Bileşen	Miktar
R1 (Format dehidrogenaz + NAD)	150µl
R2 (Rekombinant Oksalat dekarboksilaz +MnCl ₂)	75µl
Numune	5µl

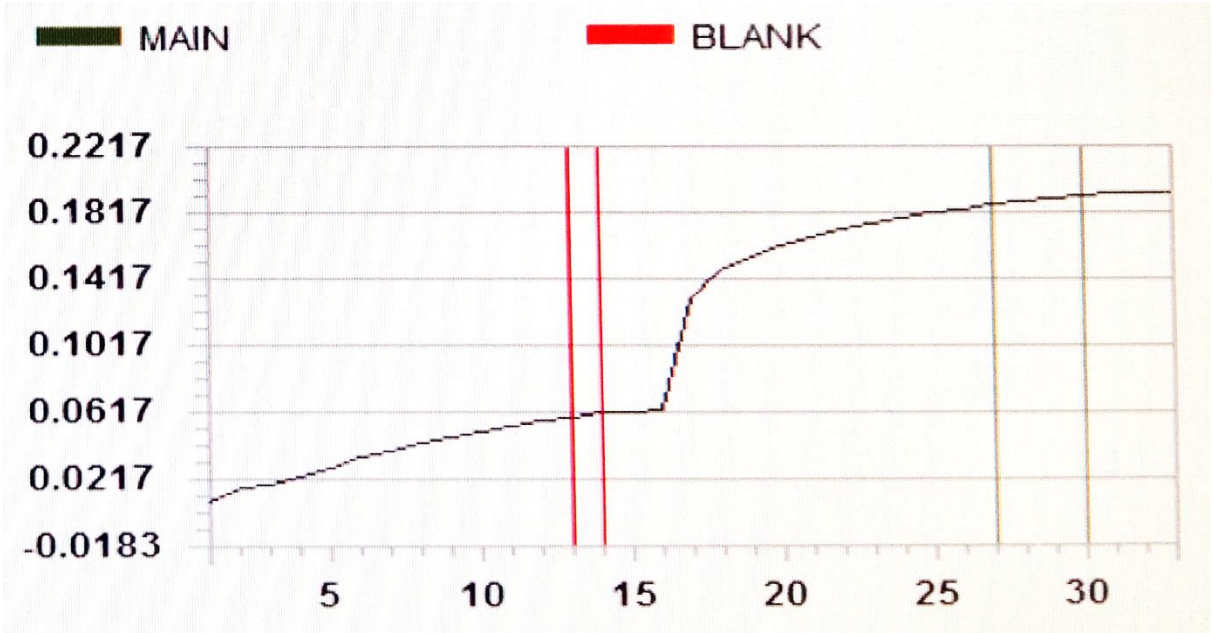
Tablo 12. Rekombinant oksalat dekarboksilaz'ın aktivite bulgularında kullanılan bileşen ve miktarları

Aktivite tayininde öncelikle substrat olarak su kullanıldı böylelikle enzimin substrata özgül olduğu gösterildi. Grafikte suya karşı oluşan absorbans miktarı kirlilikten dolayı olduğu ve miktarı gözardı edilebileceği için önemsiz sayıldı.

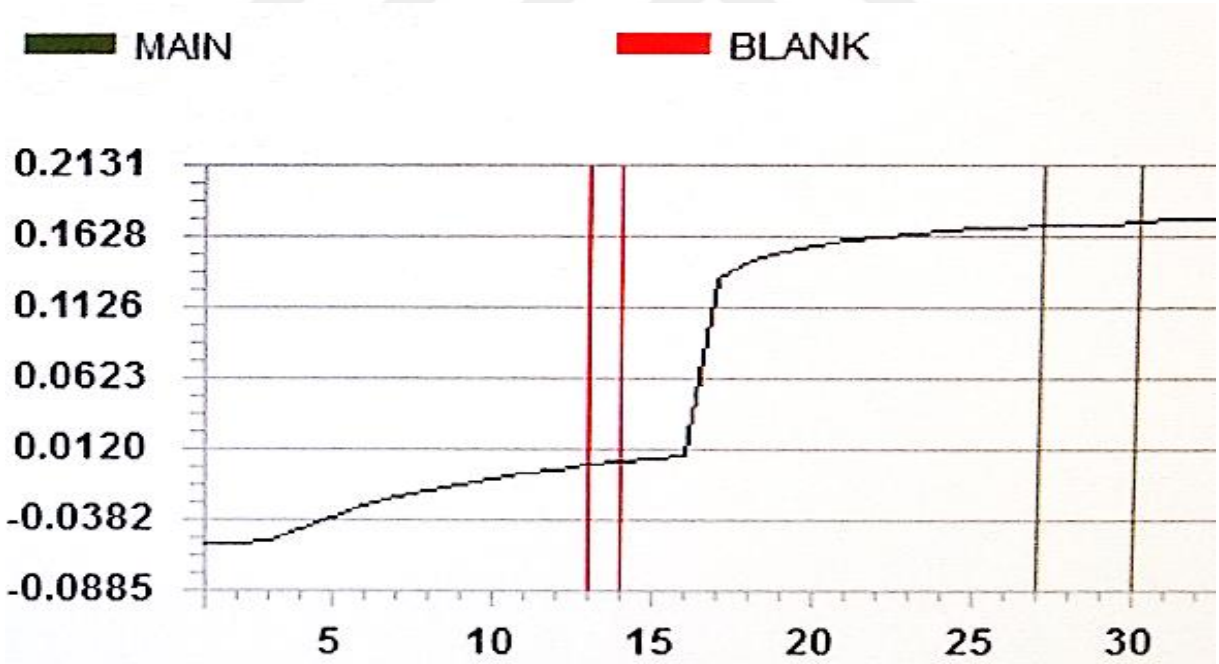
Su ile yapılan ölçümden sonra oksalat dekarboksilaz enziminin substratı olan oksalik asidin farklı konsantrasyonlardaki absorbans değişimleri ölçüldü.



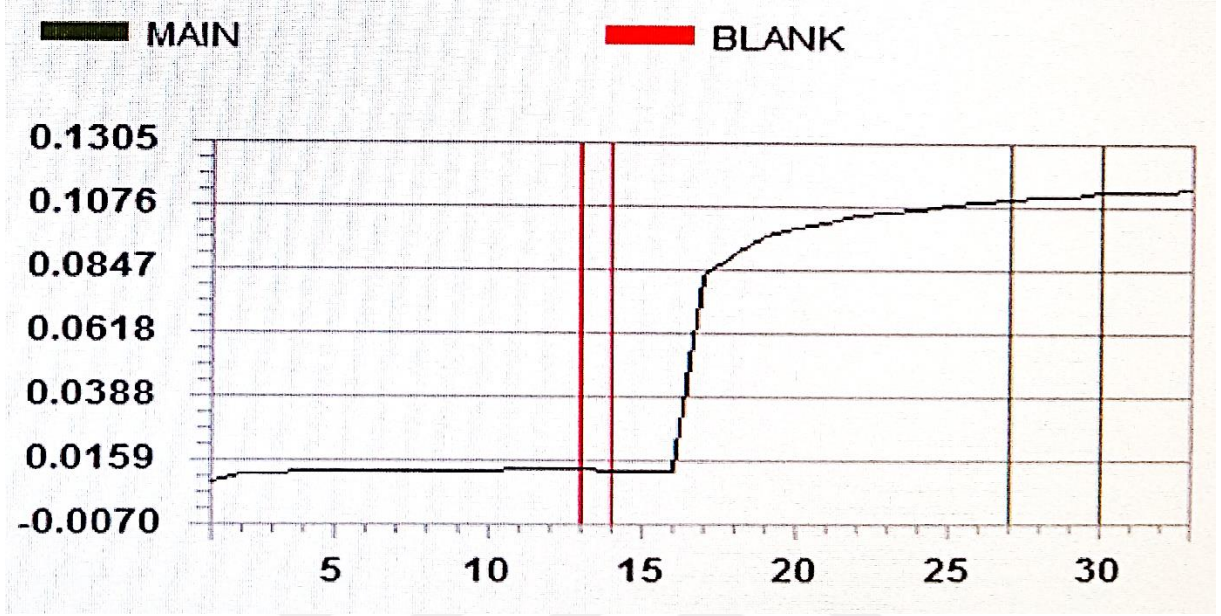
Şekil 22. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin su kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü



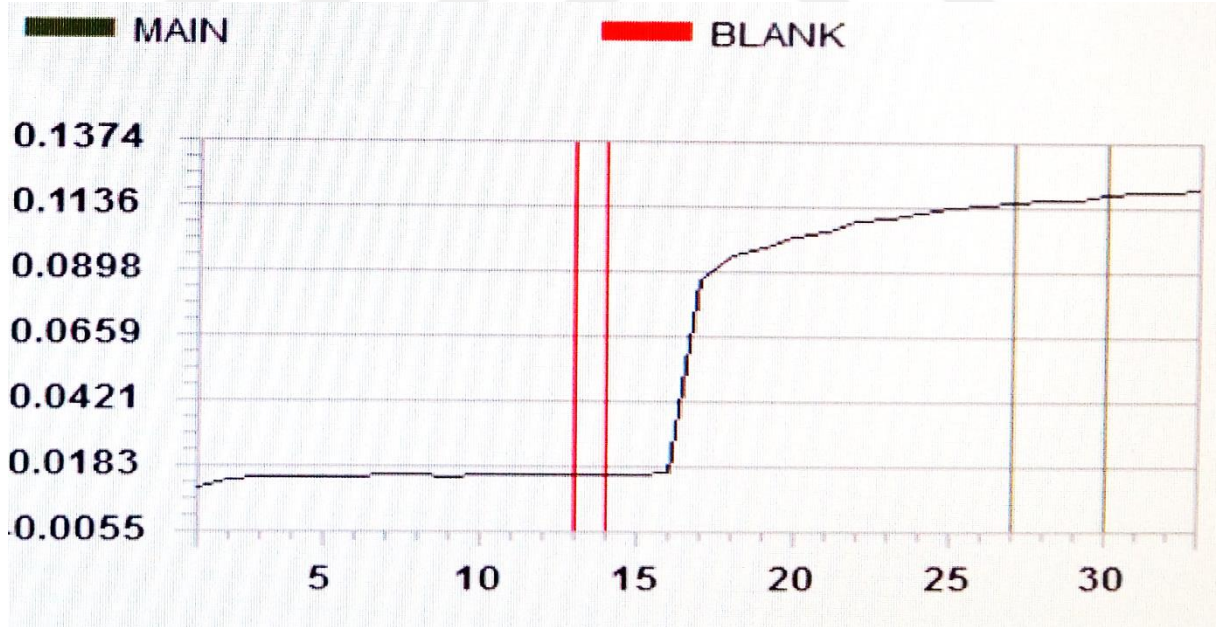
Şekil 23. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 1mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü



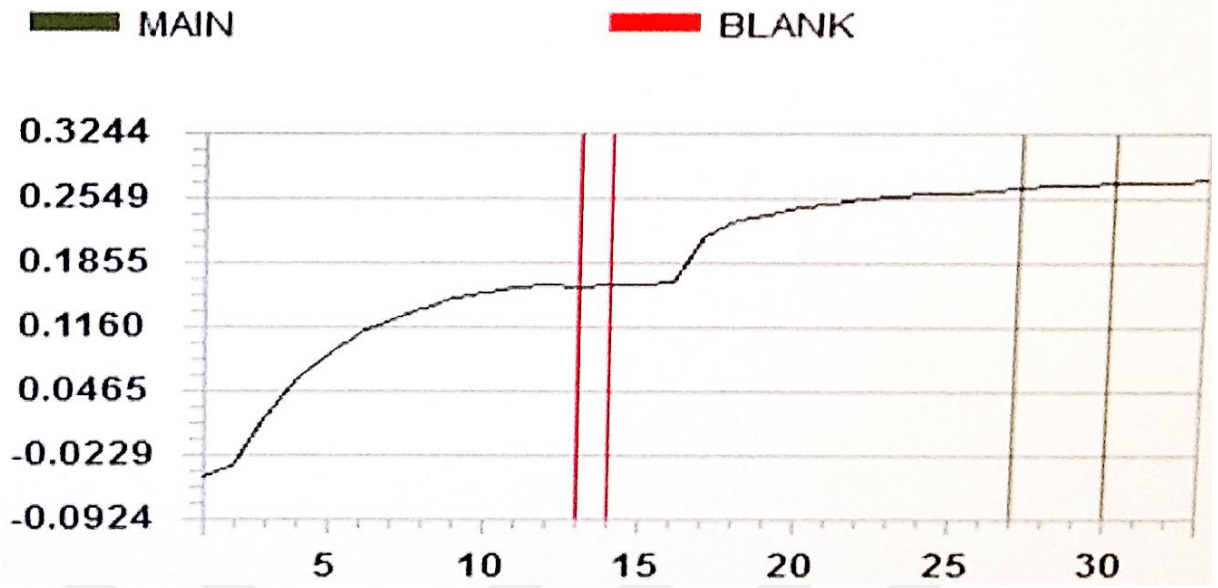
Şekil 24. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 2mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü



Şekil 25. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 3mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü



Şekil 26. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 4mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü

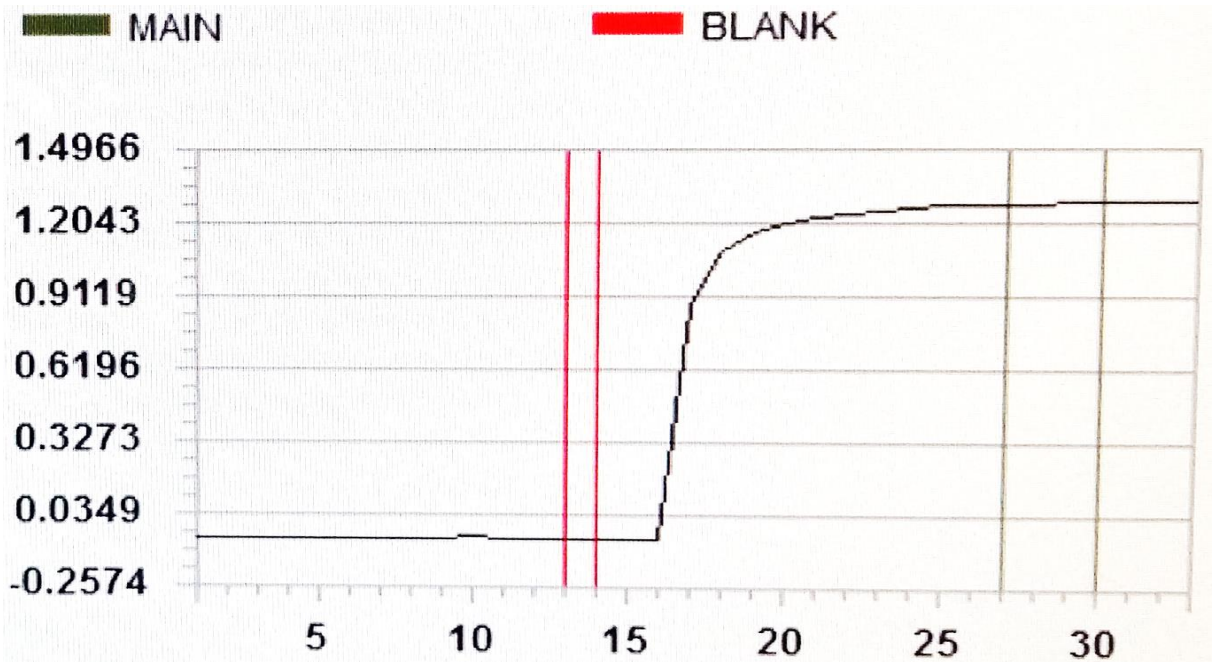


Şekil 27. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 5mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü.

Son olarak en uygun değerlerin aşağıdaki tablodaki gibi olduğu belirlendi ve son absorpsiyon değişimi ölçülerek aktivite belirlendi ve U/L olarak ölçüldü.

Bileşen	Miktar
R1 (Format dehidrogenaz + NAD)	95µl
R2 (Rekombinant Oksalat dekarboksilaz +MnCl ₂)	95µl
Numune	10µl

Tablo 13. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi ile yapılan optimizasyon çalışmalarında kullanılan bileşen ve miktarları



Şekil 28. Rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin 10mM oksalik asit kullanılarak yapılan spektrofotometrik ölçümü.

Yapılan tüm ölçümler sonrasında en uygun değerlerin 10mM oksalik asid kullanılarak yapılan ölçümde elde edildiği belirlendi. Buna göre aşağıdaki bağıntı kullanılarak enzim miktarı belirlendi.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta A \cdot V_r}{\epsilon \cdot V_e} \times 10^6$$

Bu formüldeki simgeler aşağıdaki gibidir;

$E\ddot{U}/ml$: 1ml'deki enzim ünitesi

ΔA : 1 dakikadaki absorbans değişimi

ϵ : $NADH^+$ nın molar absorpsiyon katsayısı $6,22 \times 10^3$

V_r : Ölçümün yapıldığı toplam hacim

V_e : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

Buna göre elde edilen veriler yukarıdaki formülde yerine koyulduğunda rekombinant dna teknolojisi ile elde edilen oksalat dekarboksilaz enziminin 1 ml tampon içerisinde ünite olarak miktarını bulmuş olduk.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta A \cdot V_r}{\epsilon \cdot V_e} \times 10^6$$

$$E\ddot{U}/ml = \frac{1,15 \times 200}{6220 \times 95} \times 10^6$$

$$E\ddot{U}/ml = 389,23675$$

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, idrar oksalat seviyesinin ölçümü amacıyla oksalat dekarboksilaz enziminin rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi hedeflenmiş, üretilen rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi, ticari olarak satılan format dehidrogenaz enzimi ile birlikte kullanılarak oksalat tayininde kullanılacak sensitivitesi yüksek yeni bir enzimatik fotometrik ölçüm metodu geliştirilmiştir.

Oksalik asid: Oksalik asid ve karboksilli asidlerin moleküler ağırlığı en küçük olan iki molekül kristal su kapsayan formudur. Bileşimlerinde fazla miktarda oksalat bulunan besinlerin yenilmesinde eksojen kaynaklı oksalat alımını arttırarak hiperoksalüriye sebep olur. Diğer yandan eksojen kaynaklı oksalatın ön maddelerini aşırı miktarda kapsayan besinlerin veya maddelerin alımı da oksalat miktarını arttırır. Bu gibi maddeler arasında glisin, askorbik asid, glikolat, hidroksiprolin, triptofan, etilen glikol sayılabilir.

İdrar ve kandaki oksalat miktarını belirlemek için kolorimetrik ve enzimatik yöntemleri kullanan çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Son zamanlarda tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) kullanılarak geliştirilen *kolorimetrik* yöntemlerden birinde 0,2-10µmol/L aralığında kandaki oksalat miktarı ölçülmüştür (32). Bu metotta kullanılan malzemelerin pahalı olması ve yüksek pH gerektiren bir işlem olduğundan dolayı özellikle idrar ile kullanımı konusunda bazı hatalar meydana getirmektedir. Ayrıca metodun laboratuvara uyarlanması hem zaman açısından hem de kullanım pratikliği açısından eksikliklere sahiptir.

S. Gilman [33] yaptığı bir çalışmada; platinyum elektrotları sayesinde oluşan potansiyel farkı kullanılarak ortamdaki oksalik asit miktarı ölçülmüştür. S. Gilman'a göre perklorik asit kaplı platin elektrot kullanılarak oksalik asit içeren bir solüsyonda oksalat/bioksalat anyonları difüzyon kontrollü oksijen adsorbisyonunda çok hızlı bir şekilde ölçüm yapılabilmektedir. Enzimatik ölçümlere göre daha fazla miktarda örnek gerektiren bu yöntemde elektrotların pratikliği ve zamanla aşınmasından dolayı hem zor hem de spesifitesi düşük bir yöntem olarak kalmıştır. Bu yöntem oksalik asit ölçmede geliştirilen ilk yöntemlerden biridir. Halen bir solüsyondaki oksalik asit ölçümünde elektrot kullanılarak yapılan ölçüm metodu olarak geçerliliği koruyor olsa da örnek miktarının yüksek miktarda gereksinimi metodun uygulanabilirliğini düşürmektedir.

A. Hudgkinson ve Ann Williams [9, 34] yaptığı bir tekniğe göre 0,5 ml idrar içindeki oksalik asit miktarı kalsiyum sülfat ile presipitasyon ön işlemine tabi tutulup glikolik asit ile redükte edilip oluşan peletin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Hazırlanan örnekler daha sonra hidrojen peroksit ile yavaş bir şekilde karıştırılıp 30 dakika boyunca kaynatılıp spektrofotometrik yöntemle 570 nm'de ölçümü yapılmıştır. Teknikte kullanılan hidrojen peroksitin strabilitesinin düşük olması ve öncesindeki redüksüyon tepkimelerindeki verim düşüklüğü ile tekniğin spesifitesini düşürmektedir. Teknik idrar ölçümünde kullanıldığında doğru sonuçlar verebilirken kandaki oksalat miktarını ölçmede başarısız olmuştur. Kanda bulunan diğer proteinlerin çökmesiyle oksalik asit miktarının ölçülmesi zorlaşmaktadır.

İyon-Değiştirici kromotografidan sağlanan oksalat glikolik asit ile redüklenir ve kromotropik asit ile renklendirilir. Önceki çalışmada bahsedildiği gibi daha sonra sülfirik asit ile reaksiyon durdurulur ve 570 nm'de sepektrofotometrik olarak ölçümü yapılır. Bu çalışmaya göre ölçülmek istenen oksalat miktarının %98 kadar miktarı ölçülebilmektedir [35]. İyon-Değiştirici kromotografi ile yapılan bu teknik oksalat miktarının en yüksek ölçüldüğü tekniklerden birisidir. Enzimatik ölçümlere göre hassasiyeti yüksek olan bu teknik maliyet açısından oldukça pahalı olmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen enzimler ile geliştirilen enzimetik oksalat tayin metotlarında ölçüm maliyeti diğer metotlara göre daha düşüktür. .

Oksalat miktarı kolorimetrik ölçümlerle yapıldığı gibi ayrıca bir veya birden fazla enzimin bir arada kullanılmasıyla da ölçümü yapılabilmektedir [36]. Oksalik asidin okside ya da dekarboksile olmasıyla oluşan ürünlerin daha sonra yine başka tepkimelerle son ürün eldesi sonrasında oluşan ürünlerin ölçülmesiyle doğrudan kantitatif olarak ölçümü mümkün olmaktadır. Teorik olarak oksalik asitin okside olması ile birlikte ortaya çıkan hidrojen peroksit horse radish peroksidaz enzimi parçalanıp elde edilen son ürünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi sonucunda oksalat miktarının ölçülmesi mümkün olmaktadır. Bir diğer enzimetik ölçüm tekniğindeki dekarboksilasyon işleminde oksalik asitin parçalanması sonucunda ortaya çıkan format miktarı; format dehidrogenaz enziminin format'ı karbondioksit ve formikasit'e parçalaması sonucunda oluşan NADH+'yı 340nm'de spektrofotometrik olarak ölçümüyle oksalat miktarı belirlenebilmektedir [37]. Çalışmamızda da kullandığımız bu teknik oksalat miktarını en doğru ve en uygun maliyette ölçen

tekniklerden birisidir. Tekniğin en zor yanı ise üretilecek olan enzimlerin karakteristik olarak birbirlerine yakın özelliklere sahip olması gerektiğidir. Özellikle pH sıcaklık ve kofaktörlerin birbiriyle olan ilişkileri metodun geliştirilmesi aşamasında önmlü sorunlar çıkarmaktadır. pH başlı başına bir etken olmaktadır. Enzimlerin optimum pH noktaları arasındaki fark arttıkça enzimlerden elde edilecek verim düşmektedir. Sıcaklık, pH kadar çalışma koşullarında belirleyici olmasa da yine de en yüksek verim için çalışma sıcaklıklarının birbirbirlerine yakın olmaları gerekmektedir. Kofaktör, birden fazla enzim kullanılan yöntemlerde optimizasyonu etkileyen faktörlerden birisidir. Birbirleriyle etkileşime girebilen kofaktörler enzimlerin inhibisyonunu neden olabiliyorken ayrıca birleşip çöken kofaktörler de metod için sorun oluşturabilmektedir.

M.F. Laker ve arkadaşlarının [38] yaptığı bir çalışmada bir yosun türünden elde ettiği oksalat oksidaz (EC 1.2.3.4) enzimi kullanarak idrarda oksalat miktarı tayini yapılmıştır. Bu metotta oksalat oksidaz (EC 1.2.3.4) tarafından parçalanarak oksalik asit reaksiyon sonucundan hidrojen peroksit ve karbondioksit meydana gelmektedir. Kullanılacak olan ikinci bir enzim olan horseradish peroksidaz (EC 1.11.1.7) ile ortaya çıkan 3-metil-2-benzothiazolinon hidrozon bileşiği N,N-dimetilanilin ile boyanarak indamin rengi açığa çıkarır ve bu 595nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi sonucundan oksalik asit miktarı tayin edilir [38]. Bu idrarda bulunan oksalik asit miktarı için yüksek spesifiteye sahipken kanda bulunan oksalik asit miktarı için yanlış sonuç vermektedir. Spektrofotometrik ölçüm esnasında kullanılan 595nm ayrıca bütün proteinlerde interferans yapma özelliğine sahiptir. Bu dalga boyunda proteinlerin azot kısmındaki bağlar da absorban vermektedir. Bu yüzden idrara epitel doku ya da sistemik yolla idrara karışan proteinler olduğunda yanlış sonuç verebilmektedir.

Oksalik asidi karbondioksit ve formik aside dönüştüren oksalat dekarboksilaz (EC 4.1.1.2) enziminin kullanıldığı bir yöntemde, oluşan karbondioksit bir tampon içinde tutulmakta, pH'da meydana gelen değişim ise ya direkt olarak ya da bir indikatörün renk değişiminden yararlanılarak tesbit edilmektedir. Böylece kantitatif olarak tayin edilen karbondioksitin miktarından oksalik asit miktarına geçilmektedir [38]. Karbondioksit çok hızlı hareket eden ve sıcaklıkla hareketi artan bir gazdır. Tampon içerisinde tutulabilme gücü düşük olduğundan dolayı bu teknikte alınan sonuçlar tam doğru sonuç verememektedir. Ayrıca karbondioksitin tutulduğu tampon verimi düşüren bir faktör olmaktadır. Çünkü tampon her seferinde değişmesi gerekmektedir.

Bacillus subtilis ilk olarak çalışılan model mikroorganizmalardan birisidir. İlk kez 1835 yılında *Vibrio subtilis* olarak isimlendirilen mikroorganizma daha sonra 1872 yılında *Bacillus subtilis* olarak isimlendirilmiştir. Bütün genomu dizilene bu model mikroorganizma gen kaynağı olarak en çok tercih edilen mikroorganizmalardan biridir. Özellikle proteazlar konusunda gen kaynağı mikroorganizma olarak tercih edilen bu tür karboksilasyon reaksiyonlarında kullanılan enzimler olarak da zengin proteinlere sahiptir.

Sensitivite ve spesifitesi yüksek ve aynı zamanda ekonomik bir oksalat ölçüm yöntemi geliştirmek, böbrek taşı hastalıklarının tanısı için önemli olup, toplumsal amaca hizmet edecektir. Bundan dolayı bakteriyel kaynaklı enzimlerin kullanımı endüstriyel amaçlı çalışmalara büyük katkı sağlamaktadır. Ancak, mevcut oksalat miktarı ölçüm metotları tanıda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, hem ülke ekonomisine katkı hem de ölçüm doğruluğunu artırılması açısından yeni metodların geliştirilip üretime dayalı çalışmaların yapılması önemlidir.

Başta bitki olmak üzere başka organizmalardan saflaştırma yöntemleri ile elde edilen oksalat oksidaz ve oksalat dekarboksilaz enzimi hem maliyet açısından hem de etkinlik açısından sorunludur.. Son yıllarda, rekombinant DNA teknolojisi sayesinde düşük maliyet ve yüksek verimlilikle enzim üretimi alanındaki çalışmalar artmıştır. Kaynak mikroorganizmalardan alınan genler, model mikroorganizmalara aktararak hızlı ve yüksek miktarda protein elde edilmesini mümkün hale gelmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız *Bacillus subtilis* 168 suşundan elde edilen *oxdC* geni *yvrK* proteinini ifade etmede kullanılmaktadır. Aslında zaten *Bacillus subtilis* 168 türünde bulunan bu gen oksalat dekarboksilaz enzimini üretebilmektedir fakat bu türün bu enzimi ürettiği koşullar hem zor hem de verim açısından düşük olmaktadır. Bu yüzden bir vektör aracılığı ile üretim için daha az maliyetli ortamlar ve mümkün olabilen koşullar ile model organizmalara gen aktarımı yapılması enzim üretimini kolaylaştırmaktadır.

Önceki çalışmalarda kullanılan pET28a, pET28b, pET-11a gibi vektörleri hem oksalat oksidaz hem de oksalat dekarboksilaz enziminin üretiminde başarı sağlamıştır. Bu plazmidlerin üzerinde bulunan mutasyon sayesinde enzim zarar görmeden ve doğru şekilde üretilmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada ilk olarak kullanılan pET-SUMO plazmidi hem

üzerinden promotör sayesinde hem de üretilen proteine ek olarak eklenen SUMO ve Histidin yapıları üretilen rekombinant proteinlerin saflaştırmasını kolaylaştırmaktadır.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* m168 suşunun yvrK proteinini klonlanması, ekspresyonu ve saflaştırma işlemlerini gerçekleştirdik. yvrK proteini bacillusa ait dehidrogenazlar ailesine ait olan enzim sınıfına girmektedir. *Bacillus subtilis* M168'e ait yvrK proteini, NCBI genom bankasındaki ORF gen dizisi kullanılarak üretildi. ORF gen bölgesinin tamamı PZR yapıldıktan sonra pETSUMO ekspresyon vektörüne klonlanarak üretildi.

Rekombinant protein üretiminde en büyük sorunlardan biri olan şaperonların proteinleri paketlemede yetersiz kalmalarından dolayı üretilen proteinlerin inklüzyon tanecikleri haline dönüşmektedir. Çalışmamızda böyle bir sorun yaşamadığımız için üretilen protein nativ halde elde edebildik. Hem kaynak hem de konakçı mikroorganizmanın prokaryotik olması ve genom olarak birbirlerine yakın olması nedeni ile inklüzyon taneciklerinin oluşmadığı düşünülmektedir. Önceki çalışmalarda kullanılan plazmidlerde bulunan polihistidin tag proteinin nativ olarak elde edilmesini engellemiştir. Bizim çalışmamızda ilk olarak plazmidde bulunan polihistidine ek olarak bulunan 11kDa uzunluğunda SUMO proteini, SUMO proteaz sayesinde kesilerek proteinin nativ halde edilmesi sağlandı.

Elde edilen enzimin aktivitesini belirlemek için ikinci bir enzime ihtiyaç duyulmaktadır. Format dehidrogenaz enzimi ticari olarak satın alınabilen bir enzimdir. Ekmek mayasından elde edilen bu enzim oksalat dekarboksilaz enziminin oksalatı kullanarak oluşturduğu format sayesinde ortamdaki NAD'ların indirgenerek NADH ölçümü ve böylelikle oksalat miktarının belirlenmesi mümkün olmuştur. Üretilen rekombinant enzim kofaktör olarak manganez klorür kullanmaktadır. Manganez klorür enzim aktivitesinin önemli rol oynamaktadır. Oksalat dekarboksilaz enziminde aktif bölgelerin çalışmasını sağlamaktadır. Bicipin ailesine ait olan oksalat dekarboksilaz enzimi manganez'den başka demir brom kükürt diğer elementlerle yapılan çalışmalarda aktivite göstermemiştir.

Bu çalışmada üretilen rekombinant enzim şuan dünyada en çok kullanılan oksalat ölçüm kitlerinden biri olan Trinity Biotech firmasına ait olan kit ile yapılan karşılaştırmada bu kitden on kat daha verimli ve sensitivitesi %19 daha yüksek bulunmuştur. Bunun başlıca

nedeni diğer kitde kullanılan enzimin oksalat dekarboksilaz yerine oksalat oksidaz olması ve enzimin bitkisel kaynaklı olması düşünölmektedir.

Bu çalışmanın amacı rutin biyokimyada kullanılabilircek böbrek taşı oluşumunu belirlemek için yapılabilircek bir kit için rekombinant olarak enzim üretmektir. İleriki aşamalarda yapılabilircek bir kit için ürettiğimiz oksalat dekarboksilaz enzimi format dehidrogenaz enzimi ile birlikte çalışarak idrar ve kandaki oksalat miktarını ölçmede kullanılabilircektir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Böbrekler bel omurunun her iki yanında yer alan ortalama 150 gr ağırlığında organlardır. Vücut metabolizması sonucu oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılmasını sağlamak ve vücut sıvılarının içerdiği maddelerin yoğunluğunu ayarlamak başlıca görevleridir. İdrardaki kalsiyum, oksalat ve ürik asit gibi minerallerin kristalleşerek kümeleşmesiyle ve taş oluşumunu engelleyici maddelerin idrarda yoğunluklarının azalmasıyla taş oluşur. Taş hastalığı ülkemizde ortalama % 15 sıklıkta görülmektedir.

Taş oluşumunda genetik, çevresel faktörler ve diyet başlıca etkenlerdir. Erkeklerde kadınlara göre 3 kat daha fazla görülür. Ailesinde taş hastalığı olanlarda %20-30 oranında taş oluşma riski vardır. Bazı enzim eksiklikleri taş oluşumuna zemin hazırlar. Ayrıca, alınan sıvı miktarı azaldıkça idrar yoğunlaşmakta ve atık maddelerin birikip taş oluşturması kolaylaşmaktadır. Her durumda ggeçerli olmamakla birlikte, bazı hastalarda hayvansal protein, süt, sofr tuzu ve oksalat içeren ıspanak, pancar, çikolata gibi besinlerin fazla miktarda alınması taş oluşumunu artırır. Kortizon, asit gidericiler, idrar söktürücüler (furosemid), D vitamini gibi bazı ilaçların taş oluşumu üzerine etkisi vardır.

Hastanelerde idrar ve kanda oksalat miktarı ölçüm yöntemleri biyokimyasal kitlerle yapılmaktadır. Biyokimyasal kitler enzimatik reaksiyonlar sonucu elde edilen ürünlerin ölçülmesiyle kullanılmaktadır. Enzim olarak oksalat oksidaz ya da oksalat dekarboksilaz kullanılmaktadır. Oksalat oksidaz enzimi oksalat dekarboksilaz enzimine göre hassasiyet bakımından daha düşük bulunmuştur [64]. Ayrıca spektrofotometrik ölçümlerde interferans verme açısından oksalat oksidaz enzimi oksalat dekarboksilaz enzimine göre daha yüksek özellik göstermektedir. Her iki enzim de sonuç oluşturmak için bir başka enzime ihtiyaç duyar. Hem oksalat oksidaz hem de oksalat dekarboksilaz enzimi son ürün olarak ürettikleri ürünler ancak ikinci bir enzim tarafında reaksiyona girmesi sonucu çıkan ürünler ölçülerek sonuç verir.

Her iki enzim de hem bitkilerden hem de mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir. Bitkisel kaynaklı enzimler hem elde edilmesi hem de saflaştırma işlemlerindeki güçlülük ve maliyet açısından verim kaybı oluşturmaktadır. Mikroorganizmalardan elde edilenler ise enzimin üretim aşamalarında zorluklar

yaşanmaktadır. Mikroorganizmaların ürettiği enzimlerin optimum koşulları oluşturmak güç hale gelmektedir. Ayrıca bu mikroorganizmaların ürettiği diğer enzim ve proteinler de elde edilmek istenilen enzimlerin yapısını bozmaktadır.

Bu yüzden nativ özellikte bir enzim elde edebilmek için son yıllarda rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bakterilerin birçoğunun tüm genomu açıklanmış ve tüm gen dizileri belli olmuştur. Böylelikle bakterilerin özelliklerini kodlayan genleri kopyalayarak model başka bir mikroorganizmaya aktararak istenilen şartlarda üretmek mümkün olmuştur [58].

Bu çalışmada; *Bacillus subtilis* M168 suşundan el ettiğimiz *oxdC* genini pET-SUMO vektör sistemi kullanarak *Escherichia coli* mikroorganizmasına aktardık. Yüksek miktarda elde edilen ve saflaştırılan *yvrK* proteini gerekli katlanmalar sayesinde enzimatik özellik göstermektedir. Enzimatik aktivite için kofaktör olarak $MnCl$ kullanıldı ve üretilen rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin aktivitesi ticari olarak satın alınan format dehidrogenaz enzimi ile birlikte kullanılarak gösterildi. Böylelikle biyokimyasal test olarak kullanabilecek idrar ve kanda bulunan oksalat miktarını ölçecek bir metod geliştirmek amacıyla oksalat dekarboksilaz enzimi rekombinant olarak üretildi. Çalışma kısaca aşağıdaki aşamalardan oluşmuştur.

- *Bacillus subtilis* M168 suşundan genomik DNA üzölasyonu

Rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimini üretebilmek için kaynak olarak bu enzimi kodlayan genleri taşıyan genler *Bacillus subtilis* m168 suşundan elde edildi. Bunun için bakterinin tüm genlerini içeren genomu, genomik izolasyon kiti kullanılarak izole edildi. İzole edilen genom agaroz jel elektroforezine yüklenerek yürütüldü ve daha sonra UV ışık altında kontrol edildi.

- PZR ile gen bölgesi çoğaltma

Klonlanacak olan *yvrK* (oksalat dekarboksilaz) proteini kodlayan genler yüksek miktarda elde edilmek için PZR uygulaması ile çoğaltılması gerekmektedir. Bunun için elde edilen genomik DNA dizayn edilen primer çifti ile çoğaltıldı.

Primerler, NCBI gen bankasında açıklanan oksalat dekarboksilaz enzimini kodlayan gen bölgesini Lightsyler (Roche) yazılımı kullanılarak tasarlandı. Tasarlanan primerlerle yapılan PZR uygulaması sonrasında 1158bp'lik bir gen bölgesi elde edildi. PZR uygulamasından sonra elde edilen ürünler yine agaroz jel elektroforezi ile yürütülerek kontrol edildi. En uygun olan banta sahip olan tüp seçilerek devam edildi.

- Kopyalanan gen bölgesinin vektöre bağlama işlemi

PZR ile çoğaltılan gen bölgesi konakçı mikroorganizmaya aktarılmadan önce uygun bir vektöre bağlanması gerekmektedir. Bunun için pET-SUMO vektör sistemi kullanıldı. Çeşitli bağlama teknikleri bulunmaktadır. Kullandığımız vektör sistemi T/A klonlama teknikğine sahiptir. PZR sonrasında elde edilen ürünlerin uç ve son kısımlarında timin ve adenin bazlarının karşılığı bulunmaktadır. Böylelikle DNA ligaz enzimi PZR ürünlerini vektörün açık olan A/T kısımlarına bağlayarak vektörü kapatır.

- Transformasyon ve koloni seçimi

Gen aktarılan vektörün üretim yapacak bakteriye aktarılması için transformasyon işlemi gerekmektedir. Bunun için üzerine bırakılan vektörleri sıcak/soğuk şok işlemiyle içine alabilecek kompeten hücreler kullanıldı. Bu ilk aşama hazırladığımız vektörün aktarılıp çoğaltılması için gerekmektedir. Böylece protein ifadesi için kullanılacak mikroorganizmaya yüksek kopyada plazmid elde edilmesi sağlandı.

Kopyaladığımız gen eğer başarılı bir şekilde kopyalanmışsa vektörde bulunan β galaktozidaz geninin inhibasyonuna neden olur. Böylece bakterilerin transformasyon sonrası ekildiği besiyerinde beyaz renkli koloniler oluşur. Eğer gen doğru bir şekilde kopyalanmamışsa besiyerine eklenen x-gal genin yanlış kopyalandığı bakteri kolonileri tarafından kullanılarak mavi renk oluşumu görülür.

- Pozitif koloni seçimi genin doğruluğunun sağlanması

Ekim yapılan transforme olmuş bakterilerden beyaz renkli ve diğerlerine göre daha büyük olan kolonilerden bazıları seçildi ve sıvı besiyerine aktarıldı. Daha sonra sıvı besiyerinde büyüyen bakteriler pelet halinde toplanarak PZR yapıldı. Ayrıca çapraz pzs yapılarak gen bölgesinin ters ya da düz oturduğu kontrol edildi.

Doğru koloni seçildikten sonra yapılan kontrolden sonra bakterilerden tekrar sıvı besiyerine ekilerek pelet elde edildi ve plazmid izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmidler sekans analizi için Sentromer DNA (İstanbul) firmasına gönderildi ve dizi analizi sonucu kopyalamanın doğru olduğu gösterildi.

- Protein ifadesi saflaştırma

Seçilen klonun doğruluğu PZR, çapraz PZR ve dizi analizi işlemleriyle kontrol edildikten sonra tekrar plazmid izolasyonu yapıldı ve ifade konakçısına yine ısı şoku uygulamasıyla aktarıldı.

Aynı doğrulama işlemleri tekrar ifade konakçısı için yapıldıktan sonra protein ifadesi çalışmaları yapıldı. Vektörün özelliği olan IPTG ile indükleme sonucunda aktarılan gen çalıştı ve yvrK proteini ifade edildi.

Yüksek miktarda protein elde etmek için yüksek miktarda bakteri fermantasyonu yapılması gerekmektedir. Bu yüzden daha yüksek miktarda bakteri fermantasyonu yapılarak yüksek miktarda protein eldesi edildi.

Ni-NTA spin kolonları kullanılarak elde edilen His-Sumo ekli rekombinant proteinimiz diğer binlerce protein arasından izole edildi. Bunun için öncesinde bakteri peleti nativ yöntemle liziz edildikten sonra santrifüj yapılarak tüm proteinler toplandı. Saflaştırılan protein His-Sumo ekli olduğundan dolayı enzimatik aktivitesinin bozulmaması için sumo proteaz enzimi kullanılarak sumo kısmından kesim işlemi yapıldı. Tekrar Ni-NTA spin kolonlar kullanılarak saf halde rekombinant protein elde edilmiş oldu.

- Enzimatik aktivite çalışmaları

Elde edilen proteinin enzimatik aktivite göstermesi için gerekli kofaktör ve tampon optimizasyonları yapılması gerekmektedir. Bunun için öncelikle ticari olarak satın aldığımız format dehidrogenaz enzimi optimizasyonu yapıldı. Format dehidrogenaz enziminin optimum tamponunun olabildiğince asidik olması gerekli çünkü üretilen rekombinant protein asidik karakterde bir proteindir. Format dehidrogenaz pH 6 tamponunda 500µM NAD konsantasyonu içerisinde 50µM format'ı kullanarak NADH⁺'ı optimum absorpsiyon gösterecek şekilde oluşturdu.

Format dehidrogenaz enziminin optimizasyonu sağlandıktan sonra üretilen rekombinant enzimimizin aktivite tayini yapıldı. Üretilen rekombinant protein pH 6'da 500µM MnCl₂ kofaktörü ile birlikte kullanılarak 100µM oksalik asit'i ΔA=0,690 absorpsiyon ile ölçtüğü gösterilmiştir.

6.2. Öneriler

- Çalışmamızda ürettiğimiz rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi etkinliği yüksek ve maliyeti düşük bir enzim olmuştur. Oksalat miktarını ölçmek için kullanılacak kitlerde uygun bulunmuştur. Gen kaynağı olarak *Bacillus subtilis* mikroorganizması yerine kullanılacak başka gelişmiş ökaryotik canlılardan elde edilebilecek genler kullanılarak verimi ve aktivitesi daha yüksek olan enzimler elde edilebilir.
- Vektör olarak kullandığımız pET-SUMO vektörü her ne kadar yüksek verim sağlasa da üzerinde bulunduğu SUMO proteinini son aşamada rekombinant proteinden kesmek protein

kaybına neden olmaktadır. Bunun yerine daha gelişmiş vektör sistemleri kullanılarak verim daha da yükseltilebilir.

- Protein ifadesi için kullanılan Escherichia coli bakterisi rekombinant DNA teknolojisinde öncü mikroorganizmaların en önemlilerinden biridir. Fakat yüksek bazçifti uzunluğuna sahip olan genlerin ifadesi konusunda bazı sorunlar yaşanabiliyor. Özellikle protein paketlemesinde yetersiz kalan bakteri şaperonları verimin düşmesine neden olmaktadır. Escherichia coli yerine daha gelişmiş maya mikroorganizmaları kullanılabilir. Böylece hem üretim koşulları bakımından daha az maliyette ve düşük sıcaklıkta enzim üretilmesi sağlanabilir. Ayrıca düşük sıcaklıkta aktivitesini kaybeden HSP'ler ve aktivitesi artan CSP'ler sayesinde en fazla şaperon aktivitesi ile daha çok protein ifadesi mümkün olabilir.
- Elde edilen enzim miktarını arttırmak için liyofilizasyon işlemi yapılması daha az çözelti içerisinde daha fazla enzime sahip olabilmeyi sağlar. Bu yüzden hacimce yüksek miktarlarda elde edilen enzimler liyofilizasyon işlemine tabii tutularak daha az miktarda hacimle daha fazla enzim sayesinde aktivite artışı sağlanacaktır.
- Hernekadar oksalik asit kullanılarak yapılan aktivite ölçümlerinde üretilen rekombinant oksalat dekarboksilaz enzimi yüksek aktivite gösterse de enzim idrar ve kan kullanılarak yapılmalı ve kit geliştirilmelidir.
- Aktivite tayininde kullanılan format dehidrogenaz enzimi ile üretilen rekombinant oksalat dekarboksilaz enziminin çalışma tamponları birbirlerine yakın oldukları sürece aktiviteleri daha yüksek olacaktır. Bu yüzden ikisinin de en yakın pH'ya gelebilmeleri için seçilecek konakçı genlerin ürettiği proteinler birbirlerine daha yakın optimum koşullara sahip olması gerekmektedir. Birbirine karakteristik olarak yakın olan enzimler beraber çalıştığında daha yüksek aktivite ortaya çıkabilir.
- Günümüzde tıp ve diğer arge çalışmalarında kullanılan tanı kitleri, enzimler, aşılarda ve terapötik ajanlar rekombinant DNA teknikleri kullanılarak üretilmektedir. Bu kadar geniş yelpazede ürün oluşturma potansiyeli olan rekombinant DNA teknolojisi, ne yazık ki ülkemizde çok geniş bir yer bulamamıştır. Bu tezde kullanılan rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak protein üretimi ve saflaştırma tekniklerinin tüm aşamaları mümkün olduğunca ayrıntılı olarak vermeye çalıştık. Bu sayede, bu tekniklerin ülkemizde daha çok kullanılarak, ülke ekonomisine katma değer sağlayarak, dışa bağımlılığı azaltacak hali hazırda kullanılan çeşitli tanı kitlerinin üretimesinin yanı sıra, yeni tanı kitlerinin, (kanseri, markırları v.b) ortaya çıkarılması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Cox, E.G., M.W. Dougill, and G.A. Jeffrey, 1946. *The structure of [small alpha]-oxalic acid and of the carboxyl group*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1952(0): p. 4854-4864.
2. Jeffrey, G.A. and G.S. Parry, 1947. *The structure of the oxalate ion*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1952(0): p. 4864-4867.
3. Sillén, L.G., A.E. Martell, and J. Bjerrum, *Stability constants of metal-ion complexes*. 1964, London: Chemical Society.
4. Laker, M.F., *The Clinical Chemistry of Oxalate Metabolism*, in *Advances in Clinical Chemistry*, A.L. Latner and K.S. Morton, Editors. 1983, Elsevier. p. 259-297.
5. Shah, G.M., et al., *Effects of Ascorbic Acid and Pyridoxine Supplementation on Oxalate Metabolism in Peritoneal Dialysis Patients*. American Journal of Kidney Diseases, 1992. **20**(1): p. 42-49.
6. Maeno, T., et al., *Calcium oxalate in the sputum may aid in the diagnosis of pulmonary aspergillosis: A report of two cases*. Medical Mycology Case Reports, 2015. **8**(0): p. 32-36.
7. Seidell, A. and W.F. Linke, *Solubilities of inorganic and metal organic compounds; a compilation of quantitative solubility data from the periodical literature*. 1940, New York: D. Van Nostrand Company, Inc.
8. Hammarsten, G., *On calcium oxalate and its solubility in the presence of inorganic salts with special reference to the occurrence of oxaluria*. CR Trav Lab Carlsberg, 1929. **17**: p. 1.
9. Novoa, W.B., et al., *Lactic dehydrogenase. V. Inhibition by oxamate and by oxalate*. J Biol Chem, 1959. **234**(5): p. 1143-8.
10. Northrop, D.B. and H.G. Wood, *Transcarboxylase. VII. Exchange reactions and kinetics of oxalate inhibition*. J Biol Chem, 1969. **244**(21): p. 5820-7.
11. Elliot, J.S. and E. Eusebio, *CALCIUM OXALATE SOLUBILITY: THE EFFECT OF INORGANIC SALTS, UREA, CREATININE, AND ORGANIC ACIDS*. Invest Urol, 1965. **3**: p. 72-6.
12. Miller, G.H., C.W. Vermeullen, and J.D. Moore, *Calcium oxalate solubility in urine; experimental urolithiasis. XIV*. J Urol, 1958. **79**(3): p. 607-12.
13. Crawford, J.E., E.P. Crematy, and A.E. Alexander, *The effect of natural and synthetic polyelectrolytes on the crystallization of calcium oxalate*. Australian Journal of Chemistry, 1968. **21**(4): p. 1067-1072.
14. Gershoff, S.N., et al., *Vitamin B6 deficiency and oxalate nephrocalcinosis in the cat*. Am J Med, 1959. **27**(1): p. 72-80.
15. Sutor, D.J., *GROWTH STUDIES OF CALCIUM OXALATE IN THE PRESENCE OF VARIOUS IONS AND COMPOUNDS*. British Journal of Urology, 1969. **41**(2): p. 171-178.
16. Weinhouse, S. and B. Friedmann, *METABOLISM OF LABELED 2-CARBON ACIDS IN THE INTACT RAT*. Journal of Biological Chemistry, 1951. **191**(2): p. 707-717.
17. Elder, T.D. and J.B. Wyngaarden, *THE BIOSYNTHESIS AND TURNOVER OF OXALATE IN NORMAL AND HYPEROXALURIC SUBJECTS*. J Clin Invest, 1960. **39**(8): p. 1337-44.
18. Abt, A.F., S. Von Schuching, and T. Enns, *L-Ascorbic-1-14C Acid Catabolism in the Rhesus Monkey*. Nature, 1962. **193**(4821): p. 1178-1179.
19. Banay, M. and E. Dimant, *On the metabolism of L-ascorbic acid in the scorbutic guinea-pig*. Biochimica et Biophysica Acta, 1962. **59**(2): p. 313-319.
20. Curtin, C.O. and C.G. King, *The metabolism of ascorbic acid-1-C14 and oxalic acid-C14 in the rat*. J Biol Chem, 1955. **216**(2): p. 539-48.
21. Hellman, L. and J.J. Burns, *Metabolism of L-ascorbic acid-1-C14 in man*. J Biol Chem, 1958. **230**(2): p. 923-30.
22. Gessner, P.K., D.V. Parke, and R.T. Williams, *Studies in detoxication. 86. The metabolism of (14)C-labelled ethylene glycol*. Biochem J, 1961. **79**(3): p. 482-9.
23. Ludwig, G.D., *RENAL CALCULI ASSOCIATED WITH HYPEROXALURIA**. Annals of the New York Academy of Sciences, 1963. **104**(2): p. 621-637.

24. Pyrah, L.N., et al., *A CASE OF OXALATE NEPHROCALCINOSIS and PRIMARY HYPEROXALURIA*. British Journal of Urology, 1959. **31**(3): p. 235-248.
25. Gershoff, S.N. and F.F. Faragalla, *Endogenous Oxalate Synthesis and Glycine, Serine, Deoxyripyridoxine Interrelationships in Vitamin B6-deficient Rats*. Journal of Biological Chemistry, 1959. **234**(9): p. 2391-2393.
26. GERSHOF, S.N., A.L. MAYER, and L.L. KULCZYCKI, *Effect of Pyridoxine Administration on the Urinary Excretion of Oxalic Acid, Pyridoxine, and Related Compounds in Mongoloids and Nonmongoloids*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1959. **7**(1): p. 76-79.
27. Gershoff, S.N. and E.L. Prien, *Effect of daily MgO and vitamin B6 administration to patients with recurring calcium oxalate kidney stones*. Am J Clin Nutr, 1967. **20**(5): p. 393-9.
28. Gershoff, S.N., *Production of urinary calculi in vitamin B6-deficient male, female and castrated male rats*. J Nutr, 1970. **100**(1): p. 117-22.
29. Mohr, W. and D. Hey, *Endogene Oxalose mit Manifestation im Erwachsenenalter*. Virchows Archiv A, 1969. **347**(2): p. 185-196.
30. Schöll, A., *Vergleichende bioptische und autoptische Untersuchungen bei primärer (endogener) Oxalose*. Dtsch med Wochenschr, 1971. **96**(07): p. 294-296.
31. Haqqani, M.T., *Crystals in brain and meninges in primary hyperoxaluria and oxalosis*. Journal of Clinical Pathology, 1977. **30**(1): p. 16-18.
32. Ito, Y., et al., *DEVELOPMENT OF A NOVEL METHOD FOR MEASURING SERUM OXALATE BY USING A TRIS(2,2'-BIPYRIDYL) RUTHENIUM(II) CHEMILUMINESCENCE ANALYSIS SYSTEM, AND ITS IMPORTANCE FOR UROLITHIASIS PATIENTS*. The Journal of Urology, 2012. **189**(4): p. e639.
33. Gilman, S., *Coulometric study of rates of oxalic acid adsorption at a polycrystalline Platinum Electrode*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2013. **692**(0): p. 53-59.
34. Hodgkinson, A. and A. Williams, *An improved colorimetric procedure for urine oxalate*. Clin Chim Acta, 1972. **36**(1): p. 127-32.
35. Olthuis, F.M., et al., *Urinary oxalate estimation*. Clin Chim Acta, 1977. **75**(1): p. 123-8.
36. Hayaishi, O., W.B. Jakoby, and E. Ohmura, *Enzymatic decarboxylation of oxalic acid*. J Biol Chem, 1956. **222**(1): p. 435-46.
37. Liu, X., et al., *Ammonium reduces oxalate accumulation in different spinach (*Spinacia oleracea* L.) genotypes by inhibiting root uptake of nitrate*. Food Chemistry, 2015. **186**(0): p. 312-318.
38. Laker, M.F., A.F. Hofmann, and B.J. Meeuse, *Spectrophotometric determination of urinary oxalate with oxalate oxidase prepared from moss*. Clin Chem, 1980. **26**(7): p. 827-30.
39. Yriberry, J. and S. Posen, *A semi-automatic enzymic method for estimating urinary oxalate*. Clin Chem, 1980. **26**(7): p. 881-4.
40. Tanner, A., et al., *Oxalate decarboxylase requires manganese and dioxygen for activity. Overexpression and characterization of Bacillus subtilis YvrK and YoaN*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43627-34.
41. Just, V.J., et al., *The identity of the active site of oxalate decarboxylase and the importance of the stability of active-site lid conformations*. Biochem J, 2007. **407**(3): p. 397-406.
42. Moomaw, E.W., et al., *Metal dependence of oxalate decarboxylase activity*. Biochemistry, 2009. **48**(26): p. 6116-25.
43. Obzansky, D.M. and K.E. Richardson, *Quantification of urinary oxalate with oxalate oxidase from beet stems*. Clin Chem, 1983. **29**(10): p. 1815-9.
44. Raghavan, K.G. and U. Tarachand, *Degradation of oxalate in rats implanted with immobilized oxalate oxidase*. FEBS Letters, 1986. **195**(1-2): p. 101-105.
45. Sugiura, M., et al., *Purification and properties of oxalate oxidase from barley seedlings*. Pharmaceutical Bulletin, 1979. **27**(9): p. 2003-2007.
46. Chiriboga, J., *Some properties of an oxalic oxidase purified from barley seedlings*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1963. **11**(4): p. 277-282.
47. Requena, L. and S. Bornemann, *Barley (*Hordeum vulgare*) oxalate oxidase is a manganese-containing enzyme*. Biochemical Journal, 1999. **343**(Pt 1): p. 185-190.

48. Jormakka, M., B. Byrne, and S. Iwata, *Formate dehydrogenase--a versatile enzyme in changing environments*. *Curr Opin Struct Biol*, 2003. **13**(4): p. 418-23.
49. Ferry, J.G., *Formate dehydrogenase*. *FEMS Microbiol Rev*, 1990. **7**(3-4): p. 377-82.
50. Khangulov, S.V., et al., *Selenium-Containing Formate Dehydrogenase H from Escherichia coli: A Molybdopterin Enzyme That Catalyzes Formate Oxidation without Oxygen Transfer*. *Biochemistry*, 1998. **37**(10): p. 3518-3528.
51. Anonim, *Rekombinant DNA teknolojisi*. 2012.
52. Tanne, E. and I. Sela, *Occurrence of a DNA sequence of a non-retro RNA virus in a host plant genome and its expression: evidence for recombination between viral and host RNAs*. *Virology*, 2005. **332**(2): p. 614-622.
53. Kalender, H., et al., *Antimicrobial susceptibilities, phage types, and molecular characterization of Salmonella enterica serovar Enteritidis from chickens and chicken meat in turkey*. *Foodborne Pathog Dis*, 2009. **6**(3): p. 265-71.
54. Bloom, S.C., et al., *Data Assimilation Using Incremental Analysis Updates*. *Monthly Weather Review*, 1996. **124**(6): p. 1256-1271.
55. Ju, J.Y., et al., *Design and Synthesis of Fluorescence Energy Transfer Dye-Labeled Primers and Their Application for DNA Sequencing and Analysis*. *Analytical Biochemistry*, 1995. **231**(1): p. 131-140.
56. Mossessova, E. and C.D. Lima, *Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast*. *Mol Cell*, 2000. **5**(5): p. 865-76.
57. Sanchez, A., et al., *Effect of fermentation conditions in the enzymatic activity and stereoselectivity of crude lipase from Candida rugosa*. *Appl Biochem Biotechnol*, 1999. **80**(1): p. 65-75.
58. Olempska-Bier, Z.S., et al., *Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review*. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006. **45**(2): p. 144-158.
59. Natarajan, K. and A. Rajendran, *Effect of Fermentation Parameters on Extra Cellular Tannase Production by Lactobacillus plantarum MTCC 1407*. *E-Journal of Chemistry*, 2009. **6**(4).
60. Pariza, M.W. and E.A. Johnson, *Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century*. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2001. **33**(2): p. 173-86.
61. Azam, M., et al., *A Secretion Signal Is Present in the Collybia velutipes Oxalate Decarboxylase Gene*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. **289**(4): p. 807-812.
62. Kathiara, M., D.A. Wood, and C.S. Evans, *Detection and partial characterization of oxalate decarboxylase from Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 2000. **104**(3): p. 345-350.
63. Micales, J.A., *Localization and induction of oxalate decarboxylase in the brown-rot wood decay fungus Postia placenta*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1997. **39**(2-3): p. 125-132.
64. Santamaria, J.R., R. Coll, and E. Fuentespina, *Comparative study of two commercial enzymatic kits for determining oxalate concentrations in urine*. *Clinical Biochemistry*, 1993. **26**(2): p. 93-96.
65. Lung, H.-y., J.G. Cornelius, and A.B. Peck, *Cloning and Expression of the Oxalyl-CoA Decarboxylase Gene From the Bacterium, Oxalobacter formigenes: Prospects for Gene Therapy to Control Ca-Oxalate Kidney Stone Formation*. *American Journal of Kidney Diseases*, 1991. **17**(4): p. 381-385.
66. Chen, Q.-Z. and F. Hong, *Extraction of intracellular oxalate decarboxylase from the white-rot wood decay fungus Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 2008. **136**, **Supplement**(0): p. S324.
67. Cadieux, P.A., et al., *RECOMBINANT OXALATE DECARBOXYLASE YVRK DEGRADES OXALATE IN A DOSE- AND TIME-DEPENDENT MANNER*. *The Journal of Urology*, 2009. **181**(4, Supplement): p. 659-660.

68. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. Journal of Molecular Biology, 1986. **189**(1): p. 113-130.
69. Li, S.-J. and M. Hochstrasser, *A new protease required for cell-cycle progression in yeast*. Nature, 1999. **398**(6724): p. 246-251.



ÖZGEÇMİŞ

Biyolog			
1. Adı Soyadı	Ersin KARATAŞ		
<u>İletişim Bilgileri</u> Adres Telefon Mail	: Sarıgazi mah. Ulucanlar sk no : 15/6 Sancaktepe/istanbul : 0546 927 4663 : hdersin@gmail.com		
2. Doğum Tarihi	: 10.01.1988		
3. Ünvanı	: Biyolog		
4. Öğrenim Durumu	:		
Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Anadolu Üniversitesi	2006-2011
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Ege üniversitesi	2011-GEÇİŞ
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	GEÇİŞ-2015
Doktora			
5. Akademik Ünvanlar			
Yardımcı Doçentlik Tarihi : Doçentlik Tarihi			
Görev Ünvanı	Görev Yeri	Görev Yılı	
Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi.	Aralık 2013- HALEN	