

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT *Escherichia coli* İLE FİBROBLAST BÜYÜME  
FAKTÖRÜ (FGF-2) ÜRETİM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI ve  
OPTİMİZASYON ÇALIŞMASININ YAPILMASI

Özlem KÜRKCÜ

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Aytül SOFU

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2019



© 2019 [Özlem KÜRKCÜ]

## TEZ ONAYI

**Özlem KÜRKÇÜ** tarafından hazırlanan "**Rekombinant *Escherichia coli* ile Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF-2) Üretim Potansiyelinin Araştırılması ve Optimizasyon Çalışmasının Yapılması**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

**Danışman**

**Dr. Öğr. Üyesi Aytül SOFU**  
Süleyman Demirel Üniversitesi

**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Halil AŞCI**  
Süleyman Demirel Üniversitesi

**Jüri Üyesi**

**Dr. Öğr. Üyesi Mümin Polat**  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

**Enstitü Müdürü**

**Doç. Dr. Şule Sultan UĞUR**

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Özlem KÜRKÇÜ**



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Büyüme Faktörleri.....	4
2.1.1. Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast growth factor, FGF) .....	5
2.2. Bakteriler .....	9
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	11
2.3. Rekombinant DNA Teknolojisi .....	13
2.3.1. Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları .....	15
2.3.2. Rekombinant DNA Teknolojisinin Başlıca Kullanım Alanları .....	16
2.4. Restriksiyon Enzimleri (Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri).....	17
2.5. Vektörler.....	21
2.5.1. Vektöre gen insersiyonu.....	22
2.5.2. Plazmit vektörler ve özellikleri .....	22
2.6. Klonlama: Ligasyon Tepkimesi.....	24
2.7. Genin Hücreye Transferi.....	25
2.7.1. Transformasyon .....	25
2.8. Geni Taşıyan Plazmitlerin Bulunması .....	27
2.9. PET Sistemler .....	30
2.10. Füzyon Proteinler .....	32
2.11. Füzyon Etiketleri (Tags).....	33
2.11.1. S. Tag .....	34
2.12. Büyüme Ortamı .....	35
2.13. Moleküler Klonlama .....	36
2.13.1. Polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) gen derişiminin arttırılması... 36	
2.14.1. Gen derişiminin ölçümü.....	40
2.15. SDS-Page Protein Analiz Yöntemi.....	42
2.16. Literatür Çalışmaları.....	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	45
3.1. Materyal .....	45
3.1.1. Sarf ve Kimyasal Malzemeler .....	45
3.1.2. Kullanılan cihazlar .....	46
3.2. Yöntem .....	47
3.3. Kodon Seçimi ve Gen Sentezi .....	47
3.3.1. Restriksiyon Enzimleriyle Kesim .....	48
3.3.2. EcoRI, BamHI kesim işleminin sonrasında Agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme .....	49
3.3.3. Vektör DNA'sının jelden ekstraksiyonu .....	50
3.3.4. Besiyerlerinin hazırlanması.....	51
3.3.5. LB agar .....	52

3.3.6. Transformasyon ( <i>E. coli</i> TOP10) .....	54
3.3.7. Transformasyon BL21(DE3) .....	56
3.3.8. Klonlama işleminin test edilmesi amacıyla PCR Analizi .....	57
3.3.9. SDS-Page Analizi.....	58
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	59
4.1. TB ve LB besiyeri ortamlarının karşılaştırılması .....	59
4.2. pET-32a(+) Kesim Reksiyonu Bulguları.....	59
4.3. Ligasyon Öncesi OD Ölçümleri.....	60
4.4. Ligasyon Analiz Bulguları.....	60
4.5. Klonlama Sonrası Plazmit DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Analizi ..	61
4.6. SDS-Page Analiz Bulguları.....	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	68
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ .....	78



## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## REKOMBİNANT *Escherichia coli* İLE FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (FGF-2) ÜRETİM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI ve OPTİMİZASYON ÇALIŞMASININ YAPILMASI

Özlem KÜRKÇÜ

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Aytül SOFU

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler), omurgalılarda yaklaşık 22 üye içeren oldukça korunmuş bir süper aileye aittir. Ayrıca, FGF'ler, heparin ve hücre dışı heparan sülfat proteoglikanları (HSPG'ler) ile etkileşerek FGF reseptörlerine (FGFR) bağlanmayı ve aktivasyonunu kolaylaştırırlar.

Temel FGF (bFGF) olarak da bilinen fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF2), çeşitli embriyonik ve erişkin hücre tiplerinde bulunan çok işlevli bir büyüme faktörüdür. Bu büyüme faktörü, tirozin kinaz reseptörleri vasıtasıyla etki eder ve hücre kendini yenileme, hücre yaşlanmasının inhibisyonu, hücre farklılaşması ve migrasyon, yara iyileşmesinin uyarılması ve anjiyogenezin teşvik edilmesi de dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonlar sergilemektedir.

FGF-2, homeostatik fonksiyonlar ve doku rejenerasyonu içinde önem arz etmektedir. FGF-2'nin biyolojik aktiviteleri doku mühendisliği, klinik uygulama veya kök hücre araştırmasında kullanılmaktadır. Bu amaçla, bu proteinin rekombinant olarak da üretim çalışmaları yapılmaktadır. *Escherichia coli* (*E. coli*), heterolog proteinlerin düşük maliyetli ve yüksek seviyede üretimi için en sık kullanılan prokaryotik ekspresyon sistemidir.

Bu tez çalışmasında, FGF-2 rekombinant proteininin yüksek saflıkta ve miktarda üretimi için biyoinformatik çalışmalarla ilk defa tasarlanan yeni bir gen profili *E. coli* ekspresyon sistemi için kullanılmıştır. İki farklı besiyeri ortamlarında FGF proteini üretimi ve optimizasyonu sağlanmıştır. Yüksek saflıkta ve verimde rekombinant FGF-2 proteini üretimini elde etmek için yeni gen profiline S. Tag ve Trx (Thioredoxin) fusion rekombinant proteinleri eklenmiştir. Rekombinant teknoloji ile FGF proteini üretim potansiyeline sahip *E. coli* bakterisi kontrol genleri ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) çalışmaları yapılarak test edilmiş ve gen bölgesi doğrulanmıştır. Üretimi yapılan rekombinant FGF proteini SDS-PAGE protein analizi yapılarak FGF proteinin varlığı tesbit edilmiştir. Böylece ilk kez uygulanan yeni gen bölgesi profili ile FGF-2 proteini yüksek verim ve saflıkta üretimi gerçekleştirilmiştir. Ulusal düzeyde ticari olarakda üretiminin de

yapılabileceği sağlık, biyomedikal ve kozmetik alanında kullanılabilir yeni rekombinat protein üretimi sağlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Fibroblast büyüme faktörü, Rekombinant *Escherichia coli*, FGF-2.

**2019, 78 sayfa**





## **ABSTRACT**

**M.Sc. Thesis**

### **INVESTIGATION OF PRODUCTION POTENTIAL OF FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGF-2) WITH RECOMBINANT *Escherichia coli* AND MAKING OPTIMIZATION STUDY**

**Özlem KÜRKÇÜ**

**Süleyman Demirel University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Bioengineering**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Aytül SOFU**

Fibroblast growth factors (FGFs) are a highly conserved superfamily protein containing about 22 members in vertebrates. In addition, FGFs interact with heparin and extracellular heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) to facilitate binding and activation of FGF receptors (FGFR).

Fibroblast growth factor-2 (FGF2), also known as basic FGF (bFGF), is a multifunctional growth factor found in various embryonic and adult cell types. This growth factor acts through tyrosine kinase receptors and exhibits a variety of functions including cell self-renewal, inhibition of cell aging, cell differentiation and migration, stimulation of wound healing and promotion of angiogenesis.

FGF-2 is important for homeostatic functions and tissue regeneration. The biological activities of FGF-2 are used in tissue engineering, clinical practice or stem cell research. For this purpose, recombinant production of this protein is also carried out. *Escherichia coli* (*E. coli*) is the most commonly used prokaryotic expression system for low cost and high level production of heterologous proteins.

In this thesis, a novel gene profile which was designed for the first time by bioinformatics studies for the production of high purity and quantity of FGF-2 recombinant protein was used for *E. coli* expression system. Production and optimization of FGF protein was achieved in two different media. S. Tag and Trx (Thioredoxin) fusion recombinant proteins were added to the new gene profile to obtain high purity and yield of recombinant FGF-2 protein. Polymerase Chain Reaction (PCR) studies were performed with *E. coli* bacterium control genes which have the potential to produce FGF protein by recombinant technology and the gene region was verified. The recombinant FGF protein produced was analyzed by SDS-PAGE protein to determine the presence of FGF protein. Thus, with the new gene region profile applied for the first time, FGF-2 protein was produced in high yield and purity. Production of new recombinant protein for health, biomedical and cosmetic production, which can be commercially produced at national level

**Keywords:** Fibroblast Growth Factor, Recombinant *Escherichia coli*, FGF-2.

**2019, 78 pages**



## TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Dr. Öğretim yesi Aytül SOFU'ya teőekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin yapılma aşamasında bana yardımcı olan YETEM personeli değerli hocalarım Öğr. Gör. Uğur şahin ve Öğr. Gör. Okan Sancer hocalarıma teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan eşim ve aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Özlem KÜRKÇÜ  
ISPARTA, 2019



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan FGF ailesinin filogenetik ağacı.....	5
Şekil 2.2. FGF proteininin yapısı.....	7
Şekil 2.3. Bakteri hücresi .....	10
Şekil 2.4. Bakterilerin üç farklı formu.....	10
Şekil 2.5. (A) <i>E. coli</i> B suşu REL606, tipik bir sosis şeklinde morfolojisine sahip bir Laboratuvar suşu. (B) <i>E. coli</i> O119: HND suşu A111, saç benzeri pili üreten bir enteropatojenik suş ( <i>E.coli</i> SEM görüntüsü).....	13
Şekil 2.6. Restriksiyon enzimi ile kesim.....	18
Şekil 2.7. Bazı restriksiyon enzimlerinin, çift sarmallı DNA da restriksiyon tanıma alanları ve kesilmiş yapıları.....	19
Şekil 2.8. DNA molekülüne bağlanmış (yeşil) restriksiyon enzimi BamHI.....	19
Şekil 2.9. Yapışkan uçlu EcoRI 'la kesim ile 3' ve 5' tamamlayıcı fragmentler oluşturma.....	21
Şekil 2.10. Plazmitlerin (vektörlerin) genel yapıları.....	23
Şekil 2.11. Ligasyon tepkimesi .....	24
Şekil 2.12. İndüklenmiş transformasyon sırasında hücre ve plazmidin durumu.....	27
Şekil 2.13. pUC19 plazmit vektörü.....	29
Şekil 2.14. Rekombinant plazmidi almış olan bakteri hücrelerinin bulunduğu petri kabı .....	30
Şekil 2.15. pET vektör ve konakçı türe göre kullanılacak füzyon proteinler. Kısaltmalar: amp = ampisilin veya karbenisilin, kan = kanamisin, cam = kloramfenikol, tet=tetrasiklin T = trombin, X = Faktör Xa, E = enterokinaz.....	31
Şekil 2.16. Afinite etiketlerinin sırası ve boyutu.....	34
Şekil 2.17. Afinite etiketlerinin matrisleri ve elüsyon koşulları.....	35
Şekil 2.19. PCR ile gen konsantrasyonunun arttırılması .....	38
Şekil 2.20. PCR ile matematiksel artış .....	39
Şekil 2.21. Jel elektroforezi.....	41
Şekil 2.22. SDS-Page yöntemi .....	43
Şekil 3.1. Kuru ısı bloğunda 37°C' de .....	48
Şekil 3.2. Küvete kuruması için dökülen jel.....	49
Şekil 3.3. Jel elektroforezi.....	50
Şekil 3.4. Jel görüntüleme sistemi.....	50
Şekil 3.5. UV spektrofotometre ile mikroorganizma yoğunluğu ölçümü.....	51
Şekil 3.6. Otoklav ile sterilizasyon işlemi.....	52
Şekil 3.7. Petri kaplarına besiyeri dökümü .....	52
Şekil 3.8. Ligasyon 16°C'de buz banyosunda.....	54
Şekil 3.9. TB besiyeri ortamına ekim yapılması.....	56
Şekil 3.10. Steril öze yardımıyla toplanıp distile suya konulan koloniler.....	58
Şekil 4.1. <i>E. coli</i> TOP10 ve <i>E. coli</i> BL21(DE3)'ün LB besiyeri ortamında 19 saatsonunda oluşan koloni görüntüsü.....	59
Şekil 4.2. Jel görüntüleme sisteminden çıkan fotoğraf soldan sağa sırasıyla 1.kuyucuk, kontrol, 2. kuyucuk, kesilmiş vektör, 3. kuyucuk, DNA ladder.....	60
Şekil 4.3. PCR görüntüsü soldan sağa; 1. kuyucuk DNA Ladder 2. kuyucuk ligasyon1 3. kuyucuk ligasyon2.....	61

Şekil 4.4. Soldan sağa 1. 50bp'lik DNA ladder 2. <i>E. coli</i> TOP10 3. ve 4. <i>E. coli</i> BL21 (DE3) 5. 200bp'lik ladder.....	62
Şekil 4.5. <i>E. coli</i> TOP10 ve <i>E. coli</i> BL21(DE3)'ün TB besiyeri ortamında 19 saat sonunda oluşan koloni görüntüsü.....	63
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> TOP10 ve BL21(DE3)'ün TB besiyeri ortamında 44 saat sonunda oluşan koloni görüntüsü. ....	63
Şekil 4.7. Koloniler öze yardımıyla toplanırken.....	64
Şekil 4.8. SDS-Page solüsyonuna koloniler konuldu. ....	64
Şekil 4.9. Protein boyutunu gösteren çizelge .....	65
Şekil 4.10. SDS-Page yürütme sonucunda protein bandı ilk deneyde, en düşük 18kd ve en yüksek 24kd büyüklüğünde çıktı. ....	66
Şekil 4.11. SDS-Page yürütme sonucunda protein bandı 2. Deneyde en düşük 18kd ve en yüksek 24kd büyüklüğünde gözlemlendi. ....	66
Şekil 4.12. SDS-Page yürütme sonucunda protein bandı 3. Deneyde en düşük 18kd ve en yüksek 24kd büyüklüğünde gözlemlendi. ....	67



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 2.1. Farklı organ sistemleri üzerinde bFGF'nin fonksiyonları..	9
Çizelge 2.2. Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri.....	18
Çizelge 3.1 Sarf ve Kimyasal Malzemeler .....	45
Çizelge 3.2. Kullanılan enzimler.....	45
Çizelge 3.3. Oligonükleotitler .....	45
Çizelge 3.4. Klonlama işlemlerinde kullanılan 2 farklı mikroorganizma.....	46
Çizelge 3.5. Klonlamada ve ekspresyonda kullanılan plazmitler .....	46
Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	46
Çizelge 3.7. pET-32a(+) vektörü için kesim optimum koşulu.....	48
Çizelge 3.8. Jel elektroforezinde kullanılan malzemeler.....	49
Çizelge 3.9. LB agar hazırlamak için kullanılan malzemeler. ....	52
Çizelge 3.10. İki farklı ligasyon işlemi protokolü .....	53
Çizelge 4.1. Ligasyon öncesi UV ölçümleri.....	60

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Amp	Ampisilin
bFGF	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
BMP	Kemik morfojenik proteini
CBP	Kitin bağlayıcı protein
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribo nükleik asit
dH <sub>2</sub> O	distile su
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Etidyum bromür
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
g	gram
GN	Gümüş nitrat
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GST	Glutasyon- S transferaz
His	Histidin
kDa	kilo Dalton
L	Litre
LB	Luria-bertani Broth
MBP	Maltoz bağlayıcı protein
ml	mili litre
mRNA	mesajcı Ribo Nükleik Asit
nm	nano metre
tRNA	transfer Ribo Nükleik Asit
rRNA	ribozomal Ribo Nükleik Asit
OD	Optik yoğunluk
UV	Ultra viyole
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)
S.Tag	Subtimisilin Etiketi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-Page	SDS- Poliakrilamid jel elektroforezi
TB	Terrific Broth
tRNA	taşıyıcı Ribo Nükleik Asit
TRX	Thioredoxin
WNT	Woordenboek der Nederlandsche Taal
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside
µl	mikro litre
µg	mikro gram
%	Yüzde
°C	Santigrat

## 1. GİRİŞ

Birçok moleküler biyoloji teknolojisinin temel taşı, “gen”dir. Gen çalışmalarını kolaylaştırmak için izole edilebilir ve çoğaltılabilir. Bir genin izolasyonu ve çoğaltılmasının yöntemi, canlı bir hücrede kopyalanabilen vektör veya bir araç vazifesi gören diğer bir DNA molekülünün içine ilgili geni yerleştirerek klonlamaktır. Farklı kaynaklardan oluşan bu iki DNA kombine edildiğinde, sonuç yeni bir DNA molekülünün oluşmasıdır.

Kromozomlarda görülen parça değişimi (Krossing over) gibi genetik süreçler teknik olarak rekombinant DNA oluşturmaya rağmen, farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen segmentlere katılımıyla oluşturulan DNA molekülleri genellikle bu iş için kullanılmaktadır. Rekombinant DNA molekülü ya prokaryotik ya da ökaryotik konakçı bir hücreye yerleştirilmektedir. Konakçı hücre sonra replike olarak yabancı DNA parçası ile vektör de replike olmaktadır. Yabancı DNA böylece çoğaltılmış olur ve sonrasında diğer analizler için çoğaltılmış DNA’lar saflaştırılmaktadır (Mullis, 1990).

Günümüzde modern biyoloji alanında ilk akla gelen, rekombinant DNA veya rekombinant DNA teknolojisi; çoğu zaman bir canlıdan izole edilerek elde edilen bir genin, uygun bir konağın içerisine sokularak orada çoğaltılmasını, genetik mühendislik aracılığıyla kesilmesi ve elde edilen bu farklı biyolojik kaynaklı DNA parçalarının yeniden birleştirilmesi işlemine ve bu işlem sonucunda da üretilmiş olan yeni DNA molekülüne verilen bir isimdir (Katartaş, 2011). Bu işlem sonucunda üretilmiş olan DNA molekülüne de “rekombinant DNA” ismi verilmektedir (Temizkan ve Arda, 2004).

Rekombinant DNA teknolojisi; Hamilton Smith tarafından 1970’de *Heamophilus influenzae* elde edilen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin keşfi ile başlamıştır. Bu enzimler özgün DNA bölgelerini tanıyıp bu özgün bölgelerden kesen enzimlerdir (Sultuybek vd., 1995).

Rekombinant DNA teknolojisi; hedeflenen bir geni ifade etmeyen (eksprese etmeyen) bir hücrenin, o hedeflenen geni eksprese edebilmesini veya hedeflenen



bir genin yüksek miktarlarda üretimini amaçlamaktadır (Soydemir ve Aksoy, 2017).

Gelişmenin olduğu büyüme ve farklılaşma evrelerinde çok sayıda faktör etkili olmakta, hücre büyümesi ve çoğalması olaylarının başlamasında ise büyüme faktörleri (growth factors) temel rolü oynamaktadır (Burçak, 2002).

Temel fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2)'nin üreme sistemi, akciğerler, sinir sistemi, deri, göz, hematopoietik sistem, kaslar, kemikler ve sindirim sistemi gibi çoklu organ sistemlerinin gelişimi ve işlevinde önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Bikfalvi vd., 1997). FGF-2'nin biyolojik aktiviteleri doku mühendisliği, klinik uygulama veya kök hücre araştırmasında kullanılabilir (Nugent ve Lozzo, 2000). Bu amaçla, bu proteinin rekombinant formunun üst düzey üretimi gereklidir (Hannig ve Makrides, 1998).

*E. coli* sistemi söz konusu olduğunda, rekombinant FGF-2'nin ekspresyon seviyeleri, ökaryotik ve prokaryotik genler arasındaki kodon kullanımındaki önemli farktan ötürü tipik olarak düşüktür ve bu, mevcut olan aynı türden amino asitlenmiş tRNA seviyesine göre yansıtılır (Sorensen ve Mortensen, 2005).

Nadir görülen kodonların mevcudiyetinin *E. coli*'deki mRNA ve plazmid stabilitesinin yanı sıra protein ekspresyon düzeylerini etkilediği bildirilmiştir (Kane, 1995). Öte yandan, genlerde nadir bulunan kodonların aşırı varlığı, küçük kodon tRNA'larına bağlanmış amino asitlerin, yavaş translasyonun ve çeviri hatalarının birleşmesini gerektiren pozisyonlarda ribozom duraklamasına veya hatta protein sentezinin ve hücre büyümesinin tamamen engellenmesine neden olur (Kurland ve Galland, 2003; McNulty vd., 2003).

Bazı kanıtlar, kodon önyargılarının ortadan kaldırılmasının, *E. coli*'deki ökaryotik genlerin ekspresyon düzeylerini, bazen 40 misli kadar arttırmasına yardımcı olacağını düşündürmektedir (Sirivastava vd., 2004). Öte yandan, rekombinant bir proteinin aşırı üretilmesi, kültür ortamı ve deneysel koşul ile kuvvetli bir şekilde ilişkilidir (Sivashanmugam vd., 2009). Bu sebeple, rekombinant FGF-2

verimliliğini en üst düzeye çıkarmak için ekim modu, ifade konakçı ve vektörü, orta kompozisyon, indüksiyon sonrası dönem ve çevresel faktörler gibi mevcut parametrelerin deneysel optimizasyonu esastır.

Bu amaçla, bu proteinin rekombinant formunun üst düzeyde üretimi gerekmektedir. FGF-2 geninin insan genomundan izolasyon ve amplifikasyonunu sağlayacak biyoinformatik çalışmalarla yeniden dizayn edilmiştir. Bu hususlar ele alınarak hazırlanan tez çalışmasında;

- Vektör kodon kullanılarak hibridizasyon yöntemi ile FGF-2 tanımlı rekombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) bakteri hücresi elde edilmesi,
- Rekombinant *E. coli* bakterisi için optimizasyon çalışmaları (kültür etme yöntemi, ekspresyon konakçı ve vektörü, kültür kompozisyonu, indüksiyon sonrası dönem ve çevresel faktörler) yapılması,
- Kesim ve Ligasyon işlemlerinin kontrolü için PCR yapılması.
- FGF-2 proteininin saflık derecesinin ölçümü için SDS-Page protein analizinin yapılması,
- *E.coli'* nin FGF-2 proteininin üretimini yüksek verimde elde etmek için başlangıç kodonuna ek olarak, iki farklı S.Tag ve Trx (Thioredoxin) fusion rekombinant proteinleri eklenmesi ve yüksek verim ve saflıkta üretimin sağlanması,
- Tez çalışmasının ilk olarak gerçekleşmesiyle ulusal ve uluslararası literatüre kaynak oluşturacaktır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Büyüme Faktörleri

Ağırlıkları 4000-60000 dalton arasında değişen, çok az miktarları bile hücrel aktivitelere etkileyebilen proteinlerdir. Farklı faktörlerin görevleri ve etkileri ile ilgili yeni buluşlar sürmektedir (Brown vd., 1989).

Büyüme faktörlerinin herhangi bir hücreyi etkileyebilmesi, o hücrenin, o faktör için reseptöre sahip olup olmamasına bağlıdır. Reseptöre bağlanma sonucu hücre içinde özgün bir cevaba neden olan bir seri sinyal ortaya çıkar. Etki, çoğunlukla tirozin kinaz uyarılarak sağlanır. Her hücrenin farklı büyüme faktörleri için farklı sayıda reseptörü bulunur. Büyüme faktörlerinin o bölgedeki konsantrasyonu ve reseptöre bağlanan miktarı, elde edilecek sonucu belirler. Matriks de, büyüme faktörlerinin çözünebilirliğini değiştirerek, hücrel aktivitelere düzenleyecek faktör konsantrasyonunun değişmesini sağlayabilir. Ayrıca matriks, büyüme faktörlerinin bağlanıp çözülmesini ayarlayarak, ortamdaki faktörler için rezervuar görevi görür.

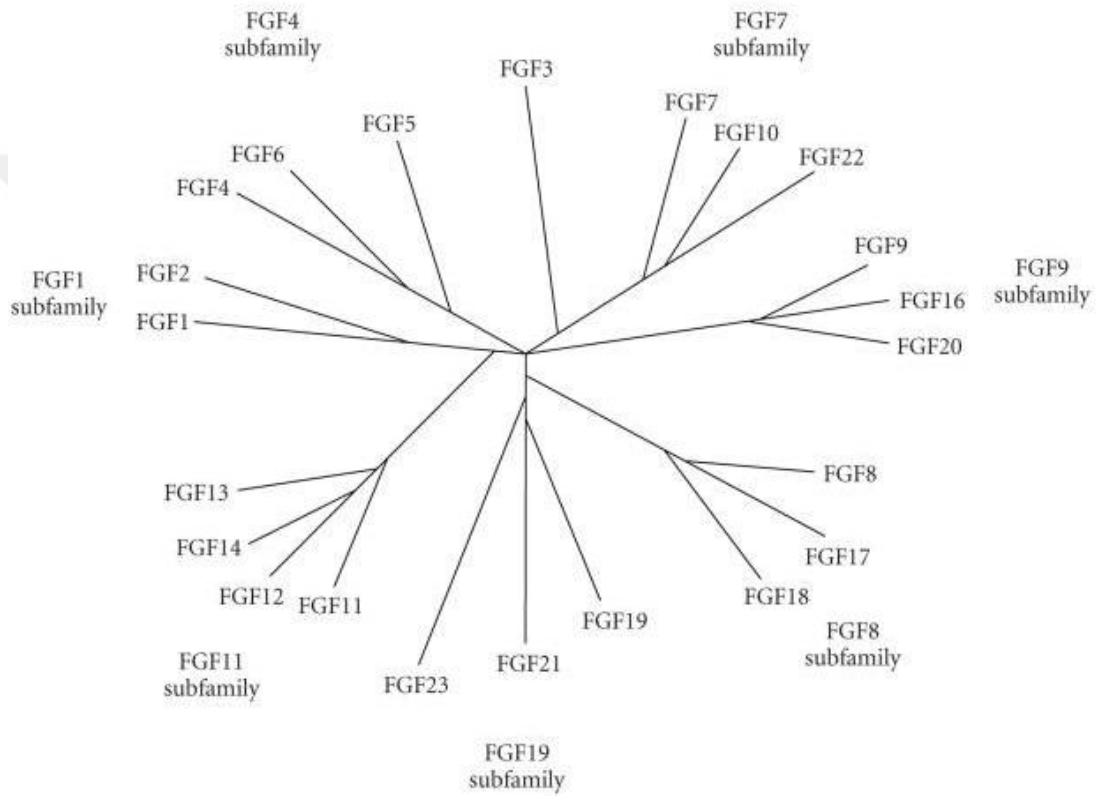
Yine matriks, herhangi bir hücrenin, herhangi bir büyüme faktörüne vereceği yanıtı belirleyebilir.

Büyüme faktörleri, hücrel fonksiyonları endokrin, parakrin, otokrin veya intrakrin mekanizmalarla sağlar.

- Endokrin yolla etkileyen faktörler hedef hücreye kan yoluyla gider ve uzaktaki hücreleri de etkiler.
- Parakrin yolla etki eden faktörler salgılandıkları bölgede etkilidirler.
- Otokrin faktörler, tarafından salgılandıkları hücrenin fonksiyonlarını etkiler.
- Bazı transforme fibroblastlar, hiç salgılanmamış faktörlere hücrenin kendi içinde, intrakrin mekanizma ile yanıt verirler (McKay vd., 1993).

### 2.1.1. Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast growth factor, FGF)

İlk olarak 1973 yılında hipofiz ekstraktlarında keşfedilen FGF, hücre ve dokularda yaygın şekilde eksprese edilir. Asidik FGF (FGF1) ve bazik FGF (FGF2), başlangıçta fibroblastlar için büyüme faktörü olarak beyin ve hipofiz bezinden izole edildi. İnsanda şimdiye kadar 22 farklı FGF tanımlanmış (FGF 15 hariç) ve FGF1-23 arasında isimlendirilmiştir (Şekil 2.1) (Itoh, 2007).



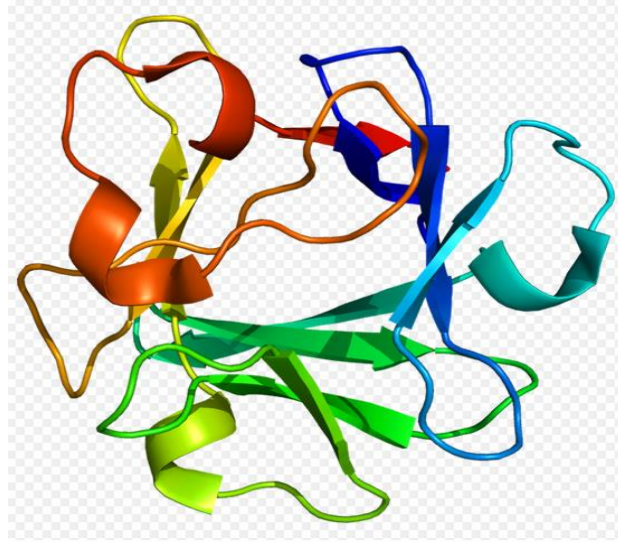
Şekil 2.1. İnsan FGF ailesinin filogenetik ağacı (Itoh, 2007).

FGF'ler fizyolojik rollerini FGFR'yi (reseptör FGF) bağlayarak uygulayarak ve erken embriyoda mezoderm paterni gibi olayları çoklu organ sistemlerinin geliştirilmesi yoluyla kontrol ederek gelişimsel yolları düzenlerler. Memeli FGF familyası, etkilerini dört yüksek oranda korunmuş transmembran tirozin kinaz reseptörü (FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4) ile ortaya çıkaran 18 ligandan oluşur (Turner ve Grose, 2010). İnsanlarda ve farelerde dört FGFR tanımlanmış ve üç immüno globülin alanı (I, II ve III), bir transmembran alanı ve bölünmüş bir hücre ile hücre dışı bir ligand bağlama alanı içeren reseptör tirozin kinazları

(yaklaşık 800 amino asit) kodlamıştır (Jaye vd., 1992). FGFR'ler birçok farklı hücre tipinde eksprese edilir ve çoğalma, farklılaşma ve sağkalım gibi ana hücre davranışlarını düzenler; bu da FGF sinyalini kanser hücreleri tarafından bozulmaya duyarlı hale getirir. Diğer büyüme faktörlerinin aksine, FGF'ler, FGFR'leri aktive etmek ve bu geniş büyüme faktörü ailesinin indüklediği çeşitli hücrel tepkilere yol açan pleiotropik tepkileri indüklemek için heparin veya heparan sülfat proteoglikanla (HSPG) birlikte hareket eder (Eswarakumar vd., 2005).

FGF veya FGFR'nin yakın zamandaki çalışmaları hastalıklarla ilgili mutasyonlara odaklanmıştır. İnsan hastalıklarında, fonksiyon kaybı mutasyonları ve fonksiyon kazancı mutasyonları dahil olmak üzere çeşitli germ hattı FGF mutasyonları tanımlanmıştır. Örneğin, FGF3'teki fonksiyon kaybı, insanlarda toplam iç kulak agenezisine yol açan kalıtsal sağırlıkla ilişkilidir (Tekin vd., 2007). FGF8'in fonksiyon kaybıyla bozulması anosmi ve hipogonadizm ile karakterize gelişimsel bir bozukluk olan kallmann sendromuna (KAL1) yol açar (Falardeau vd., 2008). FGF10 fonksiyon kaybı, işitme kaybı, diş anomalileri, lakrimal ve tükürük bezi hipoplazisi ile karakterize olan lakrimo-işitsel-dento-dijital (LADD) sendromuna neden olur (Milunsky vd., 2006). FGF23'teki fonksiyon kazancı mutasyonları hipofosfataemik raşitizmde tanımlanmıştır.

FGF proteinlerinin boyu yaklaşık 150-250 aminoasit arasındadır ve bunun yaklaşık 120 aminoasitlik kısmı tüm FGF'lerde birbirine benzer. FGF proteinleri, büyük çoğunluğu amino ucunda kesilebilen bir sinyal peptide sahip, salınan proteinlerdir. Bu dizi olgunlaşmak üzere proteinin endoplazmik retikuluma girmesini sağlamaktadır. (Goldfarb, 2005). FGF proteinleri etkilerini hücre zarında bulunan dört adet (FGFR1-4) tirozin kinaz reseptör üzerinden gösterirler. Bu reseptörler, hücre dışında kalan FGF proteininin yapısı Şekil 2.2' de gösterilmektedir (Itoh 2007).



Şekil 2.2. FGF proteininin yapısı (Itoh 2007).

#### 2.1.1.1. FGF2 - bFGF ( Temel FGF)

FGF-2 veya bFGF-2 ilk kez hipofiz bezinden ayrılmış bir 146 amino asit protein olarak keşfedilmiştir (Gospodarowicz vd., 1984). 155 amino asit proteininin okunması için FGF-2 cDNAs (Tamamlayıcı DNA) klonlanmış ve başlangıç kodonu bölgeye yerleştirilmiştir (Abraham vd., 1986). İşlem öncesi başlangıç kodonu bulunmadığı için bu bahsi geçen başlangıç kodonu okuma için tahmin edilen başlangıç kodonu kabul edilmiştir (Abraham vd., 1986). Bir diğer deyişle FGF-2 proteinleri cDNA dizisinde umulan uzunluktan uzun veya kısa boylarda olabilmektedirler (Florkiewicz vd., 1989).

Uzun veya yüksek moleküler ağırlığına sahip proteinler (196, 201 ve 210 amino asitleri) in vitro uyarılma ve dönüşüm analizleri sayesinde yaratılmıştır. Bu da CUG kodonlarını böyle büyük parçaların dönüşümünde başlangıç alanı olarak kullandıklarını ortaya çıkarmıştır (Prats vd., 1989). Daha kısa proteinler proteolitik bozunmaların sonuçlarında ortaya çıkarılmıştır (Klagsbrun vd., 1987).

Diğer okuma ise FGF-2 mRNA da bulunan Ribozom Tanıma Bölgesinde oluşur. Tek FGF-2 cDNA hücrelerde tek bir AUG ve 3 CUG başlangıç kodonları gözlenmiştir (Quarto vd., 1991). 22, 22,5 ve 24 kDa (kilo dalton) boyutlarında

proteinler CUG start kodununun içinde başlarlar. (Quarto vd., 1991). 18 kDa protein ise AUG start kodonu içinde başlar ki bu da işlem sırasından da sonradır. Bu da 18 kDa proteininin diğerlerinden niçin çok daha küçük olduğunu izah etmektedir (Quarto vd., 1991). Yakın zamanda 34kDa izoformun FGF-2 mRNA 5'in sonundan 86 nükleotid uzaklıkta bulunan bir CUG start kodonuna sahip olduğu belirlenmiştir (Arnaud vd., 1999).

Aynı zamanda 18kDa boyutunda olanlar stoplazmaya yerleşmişken 22, 22,5 ve 24 kDa boyutlarındaki proteinler nükleusa yerleşmiştir (Bugler vd., 1991). 18kDa FGF-2 nin 3 boyutlu kristalin yapısı rekombinant proteinlerin kullanımıyla yaratılmıştır (Zhu vd., 1991).

FGF-2, 3 köşeli piramit yapıya sahip 12 adet ters paralel beta yaprak içerir. Reseptör bağlayıcı alanların 13-30 ve 106-129'un kalıntıları oldukları düşünülür ( Baird vd., 1988). Ayrıca serine 64 ve threonine 112 isimli iki potansiyel fosforilasyon alanı da vardır. Protein kinaz A ve protein kinaz C, FGF-2'nin fosforilasyonuna sebeptir ve bunlar hücre yüzeyinde ve nükleus da bulunabilirler ( Feige ve Baird, 1989). Yüksek moleküler ağırlığa sahip FGF-2 izoformlarının ayırıcı bir özelliği de aminoterminal genişlemedir. (Quarto vd., 1991).

Bazik FGF, ayrıca kollajen sentezini de uyarır; yara kontraksiyonunu, epitelizasyonu, fibronektin ve proteoglikan sentezini uyarır. Heparinin etkilerini güçlendirir. Çok sayıda hücre, doku ve organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür. Bu sistemler Çizelge 2.1'de özetlenmiştir. bFGF öncelikle fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır. bFGF dokuların rejenerasyonunda etkilidir (Okada vd., 2000).

Çizelge 2.1. Farklı organ sistemleri üzerinde bFGF'nin fonksiyonları. (Okada vd., 2000).

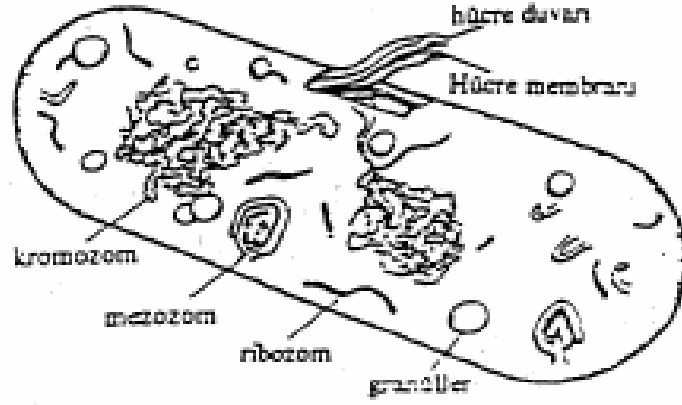
Organ	Fonksiyonlar
Beyin	Sinir hücre farklılaşması ve yaşaması
Kan Damarı	Damar gelişimi (anjiogenez), düz kas hücre çoğalması, atherogenez, kan basınç kontrolü
Akciğer	Nefes yollarının morfojenezi, fibrozit
Kol ve Bacaklar	Kol ve bacak gelişimi
Kas	Miyojenez
Kemik	Kemik iyileşmesi, kırıldak dokunun oluşumu
Hematopoez	Granülositlerin oluşum ve gelişimi, megakaryosit oluşumu ve kök hücre yaşamının uyarılması
Üreme Sistemi	Spermatojenez
Göz	Fotoreseptör yaşamı
Deri	Melanojeniz, doku tamiri, keratinosit morfojenezi

## 2.2. Bakteriler

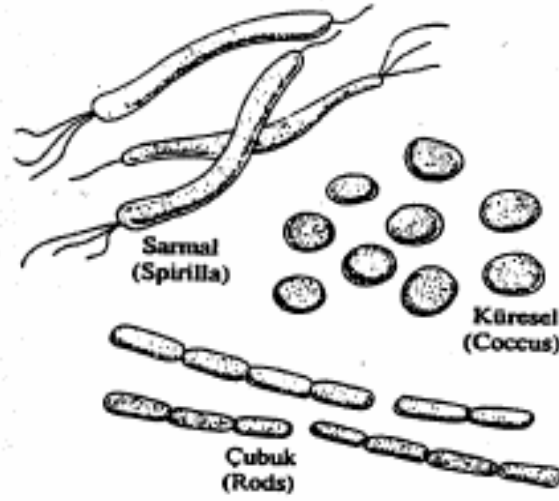
Bakterilerin tam olarak tanımlanması güçtür; prokaryotlar grubunda, tek hücreli ve bölünen mikroorganizmalar şeklinde tanımlanabilirler. Bakteriler dış taraftan sert bir hücre duvarı ile çevrilidirler; türlerinin çoğunun hücre duvarının dış yüzeyi *kapsül* veya *slime-layer* olarak adlandırılan yapışkan, jelatinimsi bir tabaka ile kaplanmıştır. Tipik bir bakteri hücresi Şekil 2.3' de gösterilmiştir. Basit bakteriler spor, kamçı ve kapsül içermezler. 0.5-2.0 mikron çapındadırlar. İnce ipliksi bir ağ şeklinde görünen çekirdeği doğrudan doğruya sitoplazma ile sınırlanmış olan bakteriler Şekil 2.4' de görünen üç temel morfolojik şekilde bulunabilirler (Bailey ve Ollis 1986).

- Çubuk (rod): Genel olarak 0.5-4.0  $\mu\text{m}$  uzunluk ve 0.5-4.0  $\mu\text{m}$  genişliktedirler. *Bacillus* bu gruba girmektedir.
- Küresel (coccus): Çapları 0.5-4.0  $\mu\text{m}$  arasında değişmektedir.
- Sarmal (spirilla): Yaklaşık 1  $\mu\text{m}$  uzunluk ve 0.5  $\mu\text{m}$  genişliktedir.





Şekil 2.3 Bakteri hücresi (Bailey ve Ollis 1986).



Şekil 2.4 Bakterilerin üç farklı formu (Bailey ve Ollis 1986).

Bakteriler tür ve çevresel koşullara göre tek, ikili, kümeli ya da uzun zincirli gruplar halinde bulunabilirler. Hücre zarı besinlere karşı yarı geçirgen özellikte olup, kuru hücre ağırlığının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Bu zar başlıca %50 protein, %28 yağ ve %15-20 karbonhidrat içeren çift katmanlı bir yapı gösterir. Gram pozitif bakterilerin hücre zarında aromatik ve kükürt içeren amino asitler, arginin ve prolin bulunmaz. Gram negatif hücrelerin zarları ise lipitçe daha zengindir. Hücre zarında elektron aktaran ve oksidatif fosfatlanmayı sağlayan enzimler bulunmaktadır.

Bakteri hücrelerinde; endoplazmik retikulum, mitokondri, golgi kompleksi bulunmaz. Bakterilerdeki temel genetik bilgiler kromozomda bulunur. Bakterilerin çoğu kromozomal DNA'larına ek olarak, bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, sitoplazmada serbest olarak bulunan, kendi kendilerini replike edebilen 1-100 kb büyüklüğünde *plasmid* adı verilen dairesel DNA moleküllerini içermektedir (Bailey ve Ollis 1986).

### **2.2.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)**

*E. coli* günümüzde en fazla bilinen ve araştırmalarda en yaygın olarak kullanılan bakteri türüdür desek sanırım abartmış olmayız. 1884 yılında mikrobiyolog ve çocuk doktoru Theodor Escherich, çocukların bağırsaklarında yaşayan mikropları ve bunların sindirim sistemi hastalıklarındaki rollerini araştıran bir çalışma başlattı (Escherich, 1885; Shulman vd., 2007; Zimmer, 2008).

Bu çalışmada Escherich (1885); hızlı büyüyen bir bakteri türünü saflaştırdı ve buna *Bacterium coli commune* ismini verdi. Bugün bilinen adıyla *Escherichia coli* (*E. coli*) idi. *E. coli*'nin bu kadar tanınmasını ve laboratuvar araştırmalarında kullanımının yaygınlaşmasını sağlayan şey, onun kolayca bulunur oluşu ve laboratuvar ortamında kolayca büyütülebilmesiydi. Patojen (hastalık yapıcı) olmayan, herhangi bir besiyerinde hızlıca büyüyen *E. coli* suşları hemen hemen her insandan elde edilebiliyordu. Farklı üniversitelerin, araştırma enstitülerinin mikrobiyoloji eğitimi için oluşturdukları kültür koleksiyonlarının ayrılmaz bir parçası idi *E. coli*. Dolayısıyla 20. ve 21. yüzyılın model organizması olmasını da bu özelliklerine borçlu. Moleküler biyoloji ve genetik alanlarının önemli kilometre taşı bulguları, bu model organizmada yapılan deneylerle ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgular, model organizma olarak *E. coli*'yi daha iyi anlamamıza olanak tanırken onu yaşam bilimlerinin yıldızı haline getirdi. Bugün ilaç olarak kullandığımız insülin, interlökin-2, insan interferon-beta proteini, eritropoietin, insan büyüme hormonu, pıhtılaşma faktörleri, taxol gibi proteinlerin çoğu *E. coli*'de üretilmektedir.

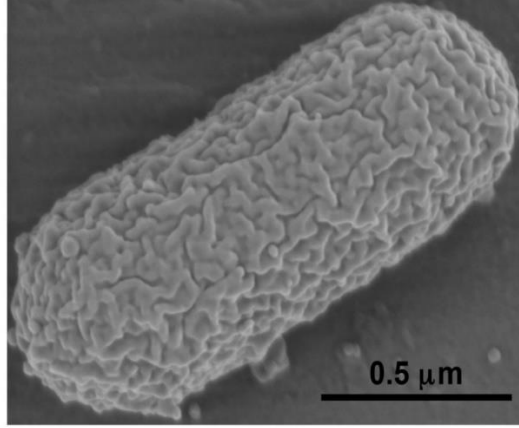
*E. coli* biyoteknolojinin, rekombinant DNA teknolojilerinin, gen manipölasyonu teknolojilerinin hızlıca gelişmesiyle ortaya çıkan sentetik biyolojinin de model organizması olarak rolünü sürdürmektedir.

Cristopher Voigt vd. (2005), yaptıkları çalışmada *E. coli* hücrelerini ve sentetik biyoloji yöntemlerini kullanarak kırmızı ışıkla bazı genlerini ifade eden yeni bir bakteriyel sistem tasarlamayı başarmışlardır. Bunun için, bakteri hücrelerine bir sensor kinaz proteini kodlayan geni aktardılar ( Voigt vd., 2005).

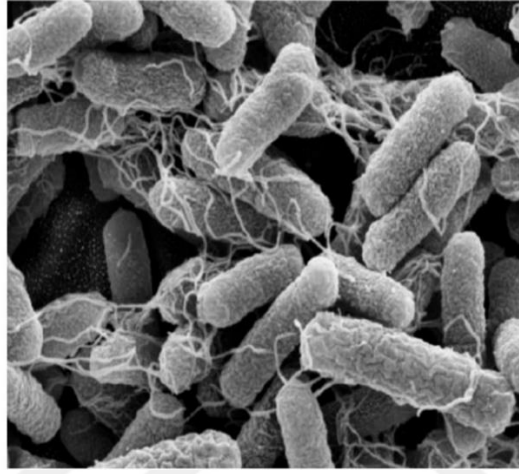
Normalde bitkilerde ve bazı bakterilerde protein yapıda fotoreseptörler bulunur. Bu fotoreseptörler ışık alıcı proteinler olarak işlev görürler ve bitkinin ya da bakterinin ışığa yöneliminde görev alırlar. *E. coli*'de ise bu mekanizma bulunmaz. Voigt ve ekibi bu mekanizmada görev alan bazı genleri aktararak bakterinin siyah beyaz kimyasal fotoğraflar oluşturmasını sağladı. O günden bugüne yaklaşık 12 yıl geçti. Gen manipölasyonu yöntemlerimiz gelişti. CRISPR-Cas9 gibi çoklu gen manipölasyonlarına daha kısa sürelerde olanak tanıyan teknolojilerin geliştirilmesi ve rutin kullanımları, Voigt ve ekibinin daha fazla sayıda sentetik geni bakteriye aktarmasına olanak sağladı (Fernandez-Rodriguez vd., 2017).

Cristopher Voigt vd. (2005), 18 gen, 14 promoter, 18 terminatör ve 4 plazmidden oluşan, toplamda 46.198 baz çiftinden oluşan sentetik DNA'yı bakteriye aktardı ve bakterinin kırmızı, yeşil ve mavi ışığı algılayıp ayırt etmesini sağladı. Üzerine kırmızı, yeşil ve mavi dalga boyunda ışık düşürülen bakteri hücreleri, farklı sentetik enzimleri üretti ve bu enzimler farklı substratları parçalayarak kırmızı, yeşil ve mavi ışık düşürülen bölgelerde, kırmızı, yeşil ve mavi pigmentleri oluşturdu. Böylece bakteriler, üzerlerine düşen farklı renklerdeki ışık resimlerini besiyeri üzerine kopyalamış oldu. *E. coli*' nin cam lamel üzerindeki SEM görüntüleri Şekil 2.5' de verilmiştir.

A.



B.



Şekil 2.5. (A) *E. coli* B suşu REL606, tipik bir sosis şeklinde morfolojisine sahip bir Laboratuvar suşu. (B) *E. coli* O119: HND suşu A111, saç benzeri pili üreten bir enteropatojenik suş (*E.coli* SEM görüntüsü) (Nascimento vd., 2004).

### 2.3. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA'nın oluşturulması ve rekombinant DNA'nın hücre içinde replikasyonunu belirten ilk yayın 1972 ve 1973 yıllarında Kethleen Danna ve Daniel Nathans tarafından yayınlanmıştır (Jackson vd., 1972; Katartaş, 2011).

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak geliştirilen genetiği değiştirilmiş (GD) ilk DNA molekülü ise; 1972 yılında Paul Berg tarafından oluşturulmuştur (Hughes, 2001). Günümüzde bilinen ilk genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) olarak, 1973 yılında üretilen bir bakteri kabul edilir. Bu çalışmada; orijinalinde bir *E. coli* olan bir bakteriye, *Salmonella* genleri eklenerek, bakterinin daha önce sahip olmadığı yeni özellikleri geliştirebilmesi sağlanmıştır (Bakırcı, 2012).

Rekombinant DNA teknolojisinin öneminin anlaşılması ile bu teknolojiyi kullanan şirketler (Genentec, Eli Lilly and Company) de kurulmuştur. Çalışmalar sonucunda, ilk olarak 1978 yılında *E. coli* bakterisi üzerinde yapılan bir genetik manipülasyon ile insülin üretebilen yeni bir türün sentezlendiği açıklanmıştır (Ladisich ve Kohlmann, 1992).

Rekombinant DNA teknolojisi, bir genomdaki binlerce ya da onbinlerce gen arasından tek bir genin;

- Ayrıştırılmasını,
- Tanımlanmasını
- Bu genin klonlanmış DNA molekülü olarak büyük miktarlarda üretilmesini mümkün kılmaktadır.

Ayrıca klonlanmış gen, şifrelediği ürünü sentezleyecek hücrelere de aktarılabilir.

Bu ürün daha sonraki araştırmalarda, tıpta ya da endüstride kullanılmak üzere ayrıştırılarak saflaştırılır. Klonlar, tek bir atadan kök alan, birbirine özdeş organizmalar, hücreler ya da moleküllerdir.

Bir genin klonlanması; Bir genin yapısının ve organizasyonunun araştırılması ya da söz konusu genin şifrelediği proteinin ticari üretimi gibi sayısız amaçlar için kullanılmak üzere, o genin birçok özdeş kopyasının üretilmesidir. Rekombinant DNA teknolojisi çeşitli deneysel teknikleri kapsar.

Rekombinant DNA terimi, doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin kombinasyonunu ifade eder. Crossing over gibi genetik süreçlerde de rekombinant DNA molekülleri oluşturulabilir. Ancak rekombinant DNA terimi daha çok, farklı biyolojik kaynaklardan elde edilen DNA'ların birleştirilmesiyle elde edilen moleküller için kullanılır. Rekombinant DNA teknolojisi, bakteri ve virüslerle yapılan çalışmalarda geliştirilen genetik

teknikleri ve nükleik asit biyokimyası metotlarını birlikte kullanır (Demirtaş, 1996).

### **2.3.1. Rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları**

Bu teknoloji, bir genin potansiyel olarak sınırsız miktarda üretilmesi için güçlü bir araçtır. İşin içinde birçok yöntem olsa da, temel işlem aşağıdaki basamakları içerir.

1. Klonlanacak DNA doku ya da hücrelerden izole edilir.
  2. Özgül DNA parçalarının oluşturulması için restriksiyon enzimleri denilen proteinler kullanılır. Bu enzimler DNA moleküllerini özgül nükleotit dizilerinden tanır ve keser.
  3. Restriksiyon enzimleri ile oluşturulan DNA parçaları, vektör ya da taşıyıcı molekül adı verilen diğer DNA molekülleri ile birleştirilir. Bir DNA parçasıyla birleşmiş olan vektör, bir rekombinant DNA molekülüdür.
  4. Rekombinant DNA molekülü, bir konak hücreye aktarılır. Konak içerisinde rekombinant molekül kendini eşler ve rekombinant molekülün birbirine özdeş düzinelerce kopyası ya da klonları oluşur.
  5. Konak hücre kendisini eşlerken, rekombinant DNAmolekülleri de tüm yavru hücrelere geçer. Her biri klonlanmış DNA dizisinin kopyalarını taşıyan konak hücre topluluğu oluşur.
  6. Klonlanmış DNA konak hücrelerden izole edilebilir ve incelenebilir.
  7. Klonlanmış DNA daha sonra transkripsiyona uğratılabilir. mRNA'sı translasyona sokulabilir. Kodlanan gen ürünü izole edilerek araştırma için ya da ticari amaçlarla satılmak için kullanılabilir (Klug vd., 2003).
- Rekombinant DNA ve gen-klonlama teknolojisi, bilim adamlarına;

- Büyük ve karmaşık genomlardan özgül genleri;
- Ya da diğer DNA dizilerini çeşitli yöntemlerle büyük miktarlarda elde etme olanağı tanır.

Örneğin, insan genomu, üç milyarın üzerinde nükleotit ve 25.000 ila 30.000 civarında gen içerir (Klug vd., 2003).

### **2.3.2. Rekombinant DNA Teknolojisinin Başlıca Kullanım Alanları**

Canlı hücre veya organizmanın, hücre içi mekanizma ile moleküler bileşenlerin kullanıldığı biyolojik süreçler, biyoteknolojinin en eski vasıtarındandır. Hayvan, bitki veya mikroorganizma kaynaklı üretilen ve saflaştırılan özgül proteinler çeşitli amaçlar için kullanılır. Rekombinant DNA teknolojisiyle elde edilen en önemli ürünler; üretilen koruyucu aşular (hepatit B gibi.) ile rekombinant tedavi proteinleridir (büyüme hormonu, insülin gb.). Son yıllarda hayvancılık ve veteriner hekimlik alanında kullanılan bu biyoteknoloji özellikle üç temel başlık altında ilerleme gösterir. Bunlar; hastalıkların erken tanı ve teşhisi ile tedavisi; hastalıklardan korunma (aşı), hayvanlarda süt, et, bal, yumurta gibi hayvansal ürün veriminin arttırılması ve hastalıklara direnç gelişimi gibi alanlardır (Yurdusev, 2002).

Belirtilen bu alanlardan hareketle günümüzde rekombinant DNA teknolojisi; birçok hastalığın(ailesel hiperkolesterolemi, orak hücre anemisi, talassemi, kistik fibroz, müsküler distrofi gibi) moleküler temelini anlaşılmaması ve tedavisinde; protein, farmasötik ürün, antibiyotik ve aşı üretiminde; tarım alanında verimin arttırılması ve maliyetin düşürülmesinde; hava, toprak ve suda çevresel kirliliğin azaltılmasında; gıda katkı maddesi üretimi ve gıda kalitesinin arttırılmasında; çeşitli hastalıklara yönelik gen tedavisinde ve biyolojik ürünlerin hızlı, güvenilir yollarla üretiminde kullanılır (Katartaş, 2011; Kiper, 2013; Ulutin, 2017).

## 2.4. Restriksiyon Enzimleri (Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri)

Belirli bir gen dizininden hedef DNA parçasının ayrılmasını gerçekleştirmek üzere kullanılan yöntem DNA moleküllerinin uygun restriksiyon enzimleri ile enzimatik tepkimelerle kesilmesidir. Bakteriler tarafından virüs istilasına karşı bir çeşit savunma mekanizması olarak sentezlenen bu enzimlerin diğer enzimlerden en önemli farkları DNA'da daima belli hedef dizinleri seçebilmeleri ve hep aynı dizinde özgül ve özgün kesme yapabilmeleridir. Etkilerine göre üç farklı restriksiyon enzim sınıfı bulunmaktadır. Tüm endonükleaz enzimleri, nükleik asitler arasındaki fosfodiester bağlarını keserler. Bunlardan endonükleaz enzimi II grubunda olanlar gen klonlamasında kullanılmaktadır. Bu enzimler DNA'nın genellikle 4 ile 8 adet baz içeren kısmını seçerler ve hedef dizini tanıyarak kesme yaparlar. Spesifik DNA'ları kesen 150' den fazla endonükleaz enzimi izole edilmiş durumdadır (Klug vd., 2003).

Restriksiyon enzimleri DNA'yı iki şekilde keserler;

- Bazı restriksiyon enzimleri DNA'nın 2 ipliğini birden tanıma bölgesinin ortasından keserler ve küt uçlar oluştururlar.
- Bazıları ise dsDNA (çift sarmallı DNA)'yı aynı pozisyondan kesmezler, uç bölgedeki bir zincir, diğerine göre uzun olabilir; bunlar da yapışkan uçlardır ve birbirlerine bağlanma eğilimindedirler.

Aynı restriksiyon enzimleri kesilmiş farklı kaynaklı DNA parçaları bu yapışkan uçlar sayesinde baz eşleşmesi yaparak birleşir ve rekombinant DNA'lar oluşur. (Cooper, 2007).

Restriksiyon enzimleri nasıl çalışır?

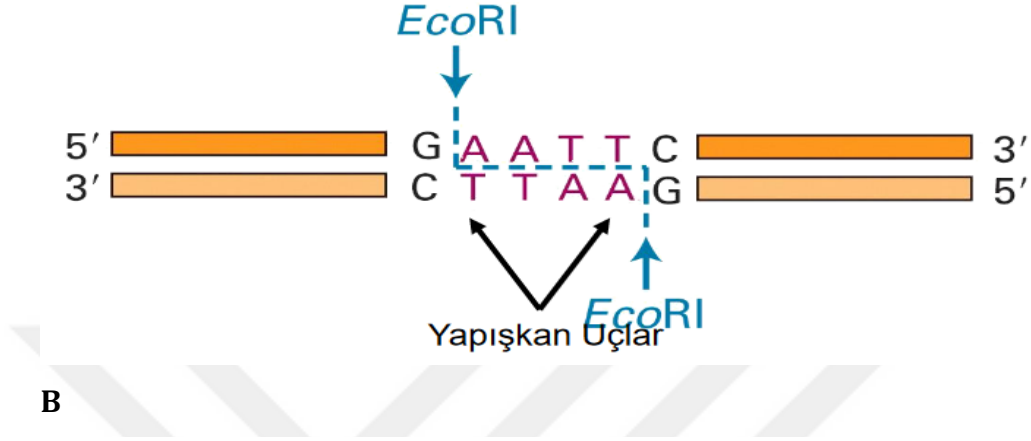
- Restriksiyon enzimleri DNA sekansını tarar.
- Spesifik bir nükleotid dizisinin olduğu bölgeyi bulur.



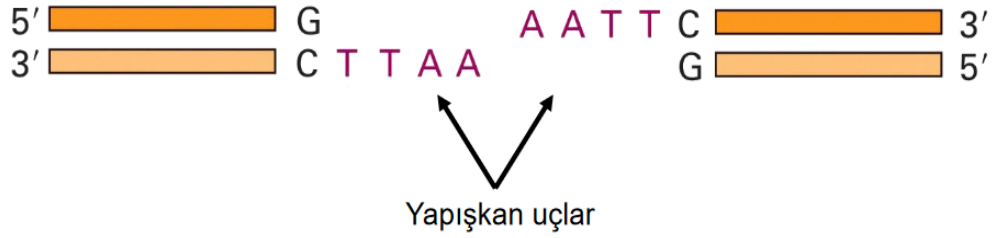
- Bu dizilimlere yakın bölgelerden ya da bu dizilimler içindeki özgül bölgelerden DNA'yı keserler.

EcoRI restriksiyon enzimi ile kesim Şekil 2.6' da gösterilmiştir.

A



B



Şekil 2.6. Restriksiyon enzimi ile kesim (Cooper, 2007).

Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Bazı restriksiyon enzimleri ve kesme biçimleri (Cooper, 2007).

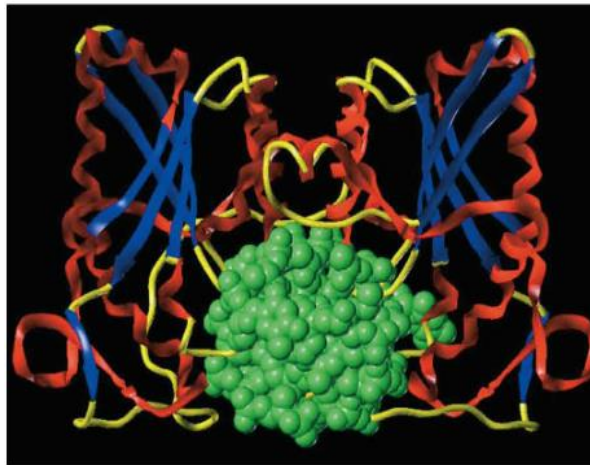
Enzim	Mikroorganizma	Hedef dizin	Yapışkan/Küt UçKesim
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	GAATTC	Yapışkan
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GGATCC	Yapışkan
<i>BglII</i>	<i>Bacillus globigii</i>	AGATCT	Yapışkan
<i>PvuI</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CGATCG	Yapışkan
<i>PvuII</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	CAGCTG	Küt
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae Ra</i>	AAGCTT	Yapışkan
<i>HinI</i>	<i>Haemophilus influenzae Ra</i>	GANTC	Yapışkan
<i>Sau3A</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	GATC	Yapışkan
<i>AluI</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AGCT	Küt
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	TCGA	Yapışkan
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	Küt
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	GCGGCCGC	Yapışkan

Bazı restriksiyon enzimlerinin, çift sarmallı DNA' da restriksiyon tanıma alanları ve kesilmiş yapıları Şekil 2.7' de gösterilmiştir (Güneş, 2003).

Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		
(b) <i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>		
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		

Şekil 2.7. Bazı restriksiyon enzimlerinin, çift sarmallı DNA da restriksiyon tanıma alanları ve kesilmiş yapıları (Güneş, 2003).

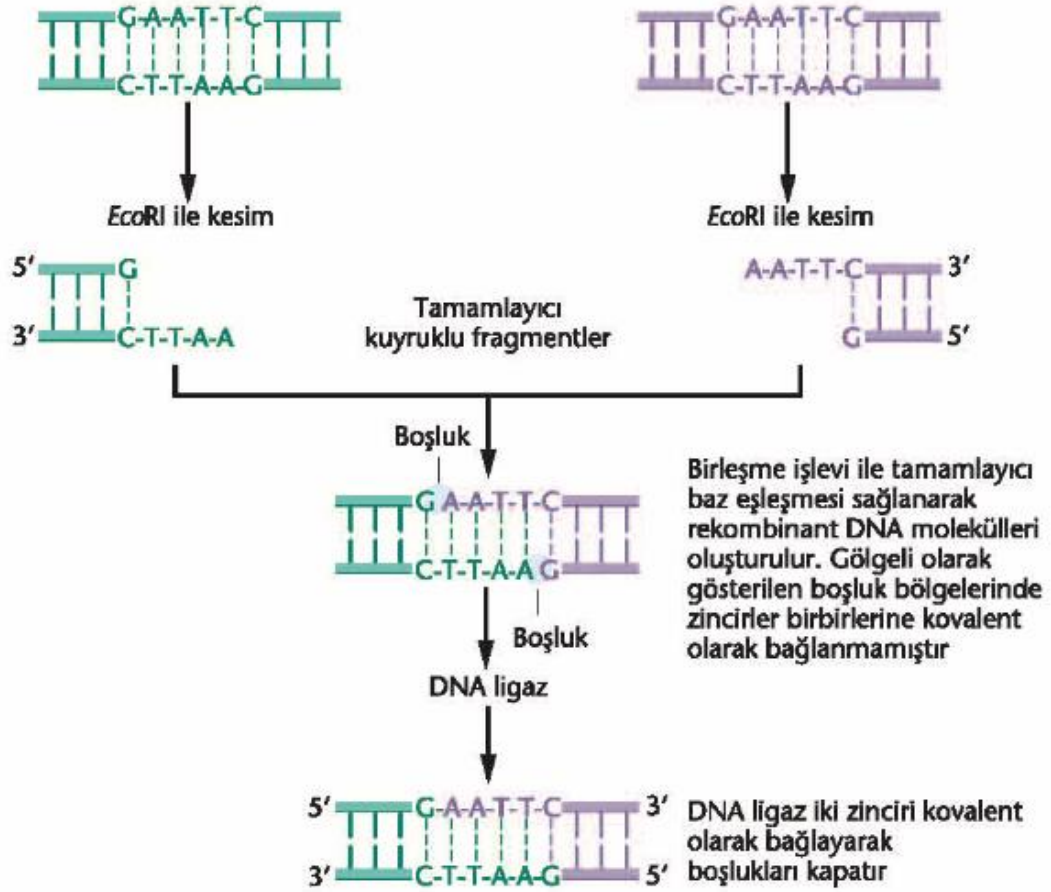
DNA molekülüne bağlanmış restriksiyon enzimi BamHI Şekil 2.8' de gösterilmektedir (Demirtaş, 1996).



Şekil 2.8. DNA molekülüne bağlanmış (yeşil) restriksiyon enzimi BamHI (Demirtaş, 1996).

## EcoRI

- Tanımlanan ilk restriksiyon enzimlerinden biri *E. coli*'nin R suşundan izole edilmiş olan EcoRI'dir.
- Yapışkan uçların birleşmesi kolaydır.
- EcoRI kesimi ile ortaya çıkan DNA parçalarının çıkıntı yapan tek zincirli uçları (yapışkan uçlar), herhangi bir kaynaktan gelen DNA parçalarının komplementer tek zincirli kuyruklarıyla hidrojen bağları oluşturulabilir.
- Eğer farklı iki kaynaktan gelen bu parçalar uygun koşullarda karıştırılırsa, yapışkan uçlar arasındaki hidrojen bağlardan ötürü rekombinant (yeni bileşen) moleküller ortaya çıkar.
- Parçalar DNA ligaz enzimi ile kovalent olarak bağlanarak rekombinant DNA molekülleri oluşturulur.
- Şekil 2.9' da yapışkan uçlu EcoRI 'la kesim ile 3' ve 5' tamamlayıcı fragmentler oluşturma gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Yapışkan uçlu EcoRI 'la kesim ile 3' ve 5' tamamlayıcı fragmentler oluşturma (Klug vd., 2003).

## 2.5. Vektörler

Vektörler klonlanacak DNA parçalarını taşırlar. Kopyalanacak olan DNA restriksiyon parçaları konak hücrelerine doğrudan giremezler. Ancak bir restriksiyon parçası, vektör adı verilen başka bir DNA molekülü ile birleşirse, klonlanmış birçok kopyasının oluşabileceği konak hücreye girebilir. Vektörler, kendilerine takılan DNA parçasını nakleden ve replike eden taşıyıcı DNA molekülleridir.

Bir DNA molekülünün vektör olarak kullanılabilmesi için, kendini ve taşıdığı herhangi bir DNA parçasını bağımsız olarak replike edebilmesi gerekir. Vektör ayrıca, klonlanacak DNA parçasının insersiyonuna olanak tanıyan birçok tanıma dizisi de içermelidir (Klug vd., 2003).

### 2.5.1. Vektöre gen insersiyonu

Bir DNA parçasını vektöre takmak için;

- Vektör, restriksiyon enzimi ile kesilir ve aynı enzimle kesilerek oluşturulmuş DNA parçaları ile karıştırılır.
- Araya eklenen fragmenti taşıyan vektörler rekombinant vektör olarak adlandırılır.
- Bu yapı, her biri farklı iki kaynaktan gelen DNA'ların birleşmesi ile oluşmuş rekombinant DNA molekülüne bir örnektir.

Rekombinant DNA vektörlerinin seçimi;

Vektörleri taşıyan konak hücrelerini, vektör taşımayanlardan ayırmak için,

Vektörde, seçicilik sağlayan bir marker gen (genellikle antibiyotik direnç genleri ya da konakta bulunmayan enzimlere ait genler) bulunmalıdır (Klug vd., 2003).

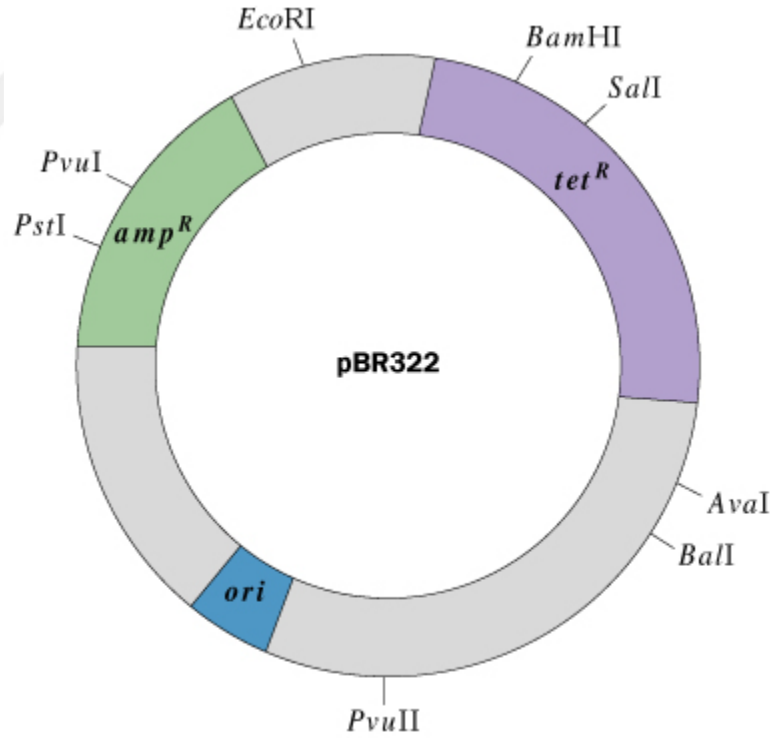
### 2.5.2. Plazmit vektörler ve özellikleri

İlk geliştirilen vektörler, genetik olarak değişikliğe uğratılmış plazmitlerdir. 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 1-100kb büyüklüğünde plazmit adı verilen dairesel DNA molekülleri içerir (Şekil 2.10).

Plazmitler, içinde buldukları konakçı hücre ile uyum içinde yaşarlar. Plazmitlerin en önemli özelliği, bakteri kromozomundan bağımsız olarak replike olabilmeleri ve kendi replikasyonlarını kontrol edebilmeleridir (Kalender 2000).

Plazmitlerin büyüklüğü idealde 10 kb'ı geçmemelidir. Çünkü büyük DNA moleküllerinin saflaştırma sırasında kırılma olasılığı vardır, ayrıca büyük plazmit molekülleri çok zor yönlendirilirler. Plazmitler genellikle bir veya bir kaç gen taşırlar ve bu genler konakçı bakterinin belirli tipik özellikleri göstermesine neden olurlar. Örneğin; kloramfenikol veya ampisilin gibi antibiyotiklerin toksik derişimlerinde bakterilerin yaşamlarını sürdürebilme yetenekleri genellikle bakterilerde bulunan plazmitlerin taşıdığı antibiyotik direnç genleri ile sağlanmaktadır.

Plazmitler hücrede sabit ve karakteristik bir kopyalama sayısında korunurlar. Yani bu sayı nesilden nesile sabit olarak aktarılır. Kopyalama sayısı plazmitlerde bulunan genler tarafından belirlenir fakat konakçı hücre ve çoğalma koşullarından etkilenir (Kalender, 2000).



Şekil 2.10. Plazmitlerin (vektörlerin) genel yapıları (Kalender, 2000).

Genellikle bakteriyel plazmitler hücre-içinde dairesel DNA molekülleri olarak bulunurlar. Plazmitler kopyalama sayısına göre düşük (low) ve yüksek (high) kopyalama sayılı olarak iki gruba ayrılır. Bu sınıflandırma oldukça geniştir.

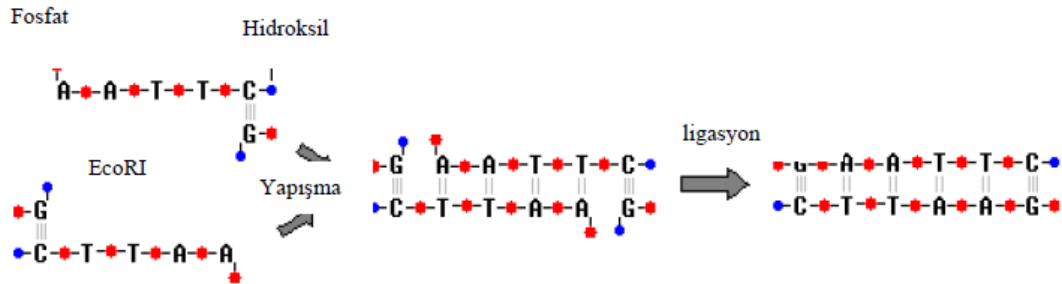
Plazmitlerin transfer şekli, sıklığı, antibiyotik dirençliliği gibi bazı özelliklerine göre daha detaylı bir sınıflandırma yapmak mümkündür.

## 2.6. Klonlama: Ligasyon Tepkimesi

İstenilen DNA parçasının konakçı bir hücrede bağımsız olarak çoğalabilme kapasitesine sahip DNA molekülüne eklenmesine moleküler klonlama denir. Bu şekilde rekombinant DNA elde edilir ve rDNA (ribozomal DNA) uygun bir konakçıya yerleştirildiği zaman istediğimiz gen bölgesinin klonlanması sağlanır. rDNA tekniği ile sadece DNA parçaları klonlanmaz, mRNA'lar (mesajcı RNA) da klonlanabilmektedir. mRNA'nın klonlanması için revers-transkriptaz enzimine ihtiyaç vardır. Bu enzim aracılığı ile mRNA'dan DNA sentezlenir sentezlenen bu DNA'ya da cDNA (temel DNA) denir.

Klonlama işlemi, mikro reaktörlerde sıvı ortamda Taq DNA polimeraz enzimi ile DNA molekülleri arasında fosfodiester bağı oluşturularak gerçekleştirilir (Şekil 2.11). Bu tepkimenin oluşması için ortamda aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş aynı uçlara sahip plazmit DNA ve klonlanmak istenen genin bulunması gerekmektedir.

Ligasyon tepkimesi sonunda oluşan ürünler lineer ve gevşemiş (relaxed) plazmit oldukları için bunların transformasyonu süperhelis (supercoiled) plazmide kıyasla daha güç olur. Ligasyon tepkimesi sonunda elde edilen ürünler gen transfer teknikleri ile uygun konak hücrelere transfer edilirler (Çalık, 1998; Bloom vd., 1996).



Şekil 2.11. Ligasyon tepkimesi (Çalık, 1998; Bloom vd., 1996).

## **2.7. Genin Hücreye Transferi**

Bakteriler sadece laboratuvar koşullarında değil, doğada da genetik yapılarını değiştirirler. Bakterilere gen transferi aşağıdaki üç şekilde gerçekleşmektedir. Bunlar;

1. Transformasyon,
2. Konjugasyon,
3. Transdüksiyondur.

Bakterinin cinsine göre yukarıdaki gen transfer yöntemlerinden biri kullanılmaktadır. Örneğin, konjugasyon, sadece gram negatif hücrelerde gerçekleştirilirken, gram pozitif bakterilerde gerçekleşmez. Bazı bakterilerde transformasyon doğal olarak gerçekleşirken, bazılarında ise gen transferi için ön işlemlerin uygulanması gerekir. Doğada meydana gelen transformasyonlar ise, bakterilerin yabancı DNA'lara karşı kendilerini korumak için ürettikleri enzimler sayesinde sınırlıdır (Glazer 1995).

### **2.7.1. Transformasyon**

Bu yöntem genetik çalışmalarda en çok kullanılan yöntemler grubudur (Şekil 2.12). Bu yöntemde bakteri hücreleri DNA molekülünü içine alırlar. Dört farklı yöntem vardır. Bunlar;

1. Doğal aktarım
2. İndüklenmiş aktarım
3. Protoplast transformasyonu
4. Elektroporasyon

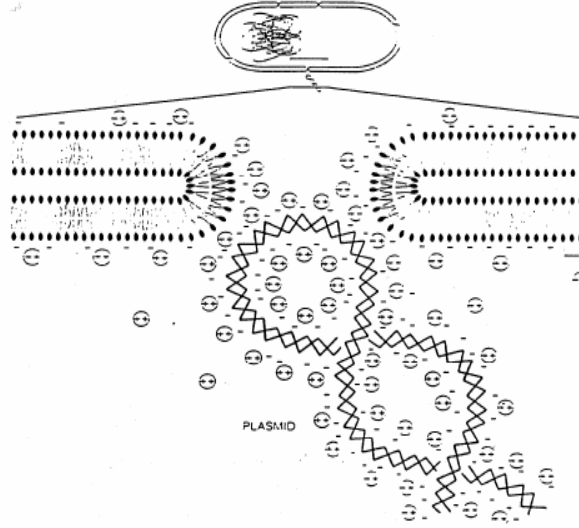


Doğal aktarım y3nteminde bakteri kendiliğinden yabancı DNA'yı 3stel artma fazının başında içine alır. Bakterinin içine aldığı DNA parçası, kromozomal DNA'nın bir b3l3m3yle aynı dizine sahipse, kromozoma b3t3nleşmiş olur ve kromozom ile birlikte artarak varlığını s3rd3r3r. *Bacillus* t3r3 bakterilere gen bu y3ntemle aktarılabilir.

İnd3klenmiş aktarım y3nteminde bakteri h3creleri 3n işlemlerden geçirildikten sonra DNA aktarımı yapılır. Bu y3ntem ile ilgili birçok y3ntem (protokol) bulunmaktadır. Bunlardan en uygunu ve en çok kullanılanı, *E. coli* h3crelerinin CaCl<sub>2</sub> ile yıkanması ve +4°C' de bekletildikten sonra plazmit DNA ile aynı ortama konulup, 42°C' de 1-2 dakika bekletilerek ısı şokuyla plazmit DNA'nın h3creye aktarımıdır. Aktarım yapıldıktan sonra h3creler katı ortamda uygun bir işaretle-yici antibiyotik kullanılarak oğaltılırlar. Bu y3ntemde h3crenin, istenen DNA molek3l3n3 hangi sistem ile içine aldığı halen bilinmemektedir.

Protoplast transformasyon y3nteminde bakterilerin h3cre duvarı kısmen lizozim enzimi ile enzimatik olarak hidroliz edilir. Ortamda osmotik dengeleyici sakkaroz gibi bulunması durumunda, h3crelerin parçalanmaları 3nlenir. Transformasyon sırasında ortamda h3cre ve DNA ile birlikte uygun oranda PEG (poli etilen glikol) kullanılması durumunda, y3ksek oranda transformasyon gerçekleşir ve istenen DNA parçası istenen mikroorganizmanın kromozomal DNA' sına girmiş (fused edilmiş) olur. Transformasyon basamağından sonra h3creler santrif3jlenerek PEG uzaklaştırılır fakat h3cre çoğalması dengeleyici varlığında gerçekleştirilir.

Transformasyon için diğer bir teknik de elektroporasyondur. Bu y3ntemde titreşim etkisiyle y3ksek gerilim uygulanarak DNA istenen h3creye transfer edilir. Bu y3ntemde de h3crenin hangi sistem ile DNA'yı aldığı hen3z bilinmemektedir (Glazer 1995).



Şekil 2.12. İndüklenmiş transformasyon sırasında hücre ve plazmidin durumu (Glazer 1995).

## 2.8. Geni Taşıyan Plazmitlerin Bulunması

Transformasyon işleminden sonra, istenen geni taşıyan hücrelerin uygun yöntemlerle seçimi gerekir. Transformasyon sonunda ortamda çok fazla koloni bulunacağı için ortama seçici işaretleyici (selective marker) gereklidir. En yaygın yöntem antibiyotiklere karşı direnç sağlayabilecek gen taşıyan plazmitlerin klonlamada kullanılmasıdır.

*E. coli* ile yapılan çalışmalarda genellikle ampisilini etkisiz hale getirecek geni ampR taşıyan plazmitler tercih edilmektedir. Transformasyon işleminden sonra koloniler seçici işaretleyici görevini yapacak antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar.

Plazmidi taşıyan hücrelerin hepsi bu ortamda yaşama kapasitesine sahiptir. Antibiyotik içeren ortamda yaşayabilen hücrelerin hepsi klonlamada kullanılan plazmidi taşımalarına rağmen klonlanması amaçlanan geni taşıma olasılıkları çok düşüktür. Kontrol amacı ile her bir hücre tekrar çoğaltılır ve hücrelerden plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra plazmitler uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek istenen geni taşıyıp taşımadıkları kontrol edilir.

Plazmidin özelliklerine bağlı olarak geni taşıyacak olan plasmidi seçme yöntemleri de değişir.

İki antibiyotiğe karşı direnç sağlayan plazmit kullanımudur. Bu yöntemde klonlanmak istenen gen, antibiyotiğe karşı direnç sağlayan genlerden birini pertürbe edecek şekilde klonlanır. İstenen geni taşıyan mikroorganizma ise aşağıdaki yöntemle seçilir (Atabey vd., 2006).

Transformasyondan sonra hücreler, klonlamadan etkilenmemiş antibiyotiği içeren ortamda çoğaltılırlar.

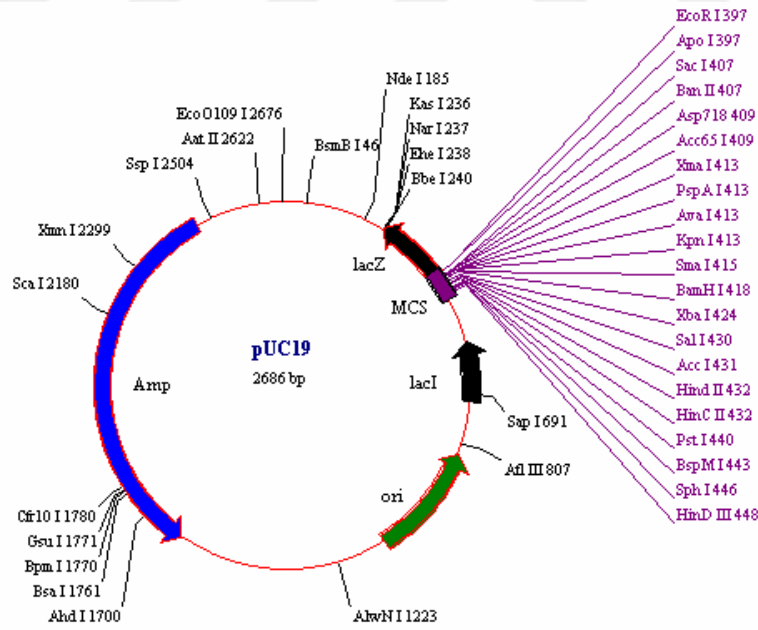
İkinci aşamada, bu hücreler iki ayrı ortamda çoğaltılırlar.

1. Birinci ortam altüst edilen antibiyotiği içerir, ikinci ortam ise klonlamadan etkilenmemiş genin antibiyotiğini içerir.
2. Birinci ortamda çoğalmayan, ikinci ortamda çoğalabilen hücrelere klonlama gerçekleşmiştir. Çünkü birinci antibiyotikli ortamda hücrenin çoğalmaması antibiyotiği etkisiz kılacak genin işlev göstermemesi demektir.

Klonlanmış plazmidi taşıyan koloninin seçiminde en çok kullanılan yöntemlerden biri, *lac Z* genini taşıyan plazmitlerin kullanımudur. Genin ürettiği  $\beta$ -galaktosidaz enziminin galaktozu parçalama işlevinden yararlanılmaktadır. Bu yöntemde galaktozun benzeri X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktosid) substrat olarak kullanılmaktadır. Plazmit tarafından  $\beta$ -galaktosidaz üretilip ve substrat hidroliz edildiğinde hücrelerin rengi bu substrat benzerinin kromatografik özelliklerinden dolayı mavi olmaktadır (Şekil 2.15). *Lac Z* geni, gen yapısına herhangi bir nükleik asit dizininin sokulmasıyla altüst edildiğinde  $\beta$ -galaktosidaz enzimi sentezlenemeyeceği ve substrat benzerini parçalayamayacağı için kolonilerin rengi beyaz olacaktır. Bu işaretleyici içeren plazmitlerde *lac Z* geni içinde bir poliklonlama konumu bulunur ve klonlama işlemleri bu bölgeye yapılır. Koloniler bu yöntemle renklerine göre seçilir ve tüm yöntemlerdeki gibi restriksiyon analizleriyle genin varlığı kontrol edilir. Şekil 2.13' de pUC19 plazmit

vektörü gösterilmiştir. Bu vektör, hem ampisilin direnç genini taşımakta hem de *lac Z* genini taşımaktadır. Bu vektöre benzer çok sayıda vektör temin edilebilir.

Verimi en yüksek olan yöntem ise koloni hibridizasyon (hybridisation) yöntemidir. Bu yöntemde radyoaktif izotop içeren dNTP'ler (deoxynucleoside triphosphate) kullanılarak, klonlanması istenen gen radyoaktif olarak işaretlenerek sonda hazırlanır. Sonda hazırlamak için ssDNA (tek sarmallı DNA) kalıp olarak kullanılır. ssDNA'nın karşılık gelen zinciri klenow enzimi ile oluşturulur. Ortamdaki nükleik asitlerden birisi radyoaktif izotop taşır. Geni taşıyan plazmidi içeren mikroorganizmalar nitroselüloz filtreler üzerine adsorplanır ve bu filtre radyoaktif sonda ile hibridize edilir ve bir sonraki aşamada ya X-ray filmine radyoaktif maddenin ışınları aktarılır veya özel bir görüntü analiz (Molecular Imager) cihazında radyoaktif ışınla oluşan sinyalden yararlanarak klonlanmış geni içeren plazmidin aktarıldığı mikroorganizma seçilir (Sambrook 2001).



Şekil 2.13. pUC19 plazmit vektörü (Sambrook 2001).

Petri kabındaki üreme ortamı X-gal bileşiği içermektedir. pUC18 veya pUC19 vektöründeki araya eklenen (insert) DNA, mavi kolonilerin oluşmasını sağlayan

geni bozmuştur. Beyaz koloniler DNA parçasını taşıyan vektörü içerirken, mavi koloniler herhangi bir insert DNA parçasını taşımamaktadır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Rekombinant plazmidi almış olan bakteri hücrelerinin bulunduğu petri kabı (Klug vd., 2003).

## 2.9. PET Sistemler

PET Sistem, *E. coli*' de rekombinant proteinlerin klonlanması ve ekspresyonu için geliştirilen en güçlü sistemdir. Hedef proteinlerin daha kolay alt-klonlanmasını, saptanmasını ve saflaştırılmasını sağlamak için geliştirilmiş özelliklerle tasarlanmıştır.

Hedef genler, güçlü bakteriyofaj T7 transkripsiyonunun ve (isteğe bağlı olarak) translasyon sinyallerinin kontrolü altında pET plazmitlerinde klonlanır; ekspresyon, konak hücrede bir T7 RNA polimeraz ( T7 bakteriyofajına ait RNA polimerazdır. Bu enzim, faj genlerindeki genetik bilginin mesajcı RNA molekülü şeklinde transkripsiyonunu katalizler) kaynağı sağlanarak indüklenir. T7 RNA polimeraz o kadar seçici ve aktif ki, hücre kaynaklarının neredeyse tamamı hedef gen ekspresyonuna dönüştürülür; indüksiyondan birkaç saat sonra toplam hücre proteinin % 50'sinden fazlasını içerebilir. Bu sistemin bir diğer önemli faydası, hedef genleri, indirgenmemiş durumda transkripsiyonel olarak sessiz tutma kabiliyetidir.

Hedef genler başlangıçta T7 RNA polimeraz genini içermeyen konaklar kullanılarak klonlanır, böylece konakçı hücre için potansiyel olarak toksik olan

proteinlerin üretimi nedeniyle plazmit kararsızlığı ortadan kaldırılır. Ekspresyon yapılmayan bir konakta oluşturulduktan sonra plazmitler, bir kromozomal içeren ekspresyon konaklarına aktarılır.

İki tür T7 promotörü ve bazal ekspresyon seviyelerini baskılama sıklıklarında farklı olan çeşitli konaklar mevcuttur, bu da büyük esneklik ve çok çeşitli hedef genlerin ekspresyonunu optimize etme yeteneği sağlar. Tüm pET vektörleri ve tamamlayıcı ürünler, hedef proteinlerin uygun klonlanması, ekspresyonu, tespiti ve saflaştırılması için tasarlanmış kitler halinde mevcuttur. PET sistemi gerekli çekirdek reaktifleri sağlar. Sistem Bileşenlerini izleyen arka plan bilgileri, uygulamanız için en iyi vektör / konak kombinasyonunu belirlemenize yardımcı olacaktır (Şekil 2.15) (Novagen, 1999).

Control	Vector	Host strain	Selection	Promoter	N-terminal fusion	Protease site	Insert (protein size)	Included with vector/series	Cat. No.
A	pET-14b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7	His•Tag	T	β-gal 118kDa	pET-3, 5, 12, 14b, 17b, 17xb, 20b, 23	69674-3
B	pET-15b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	T	β-gal 118kDa	pET-11, 15b, 21, 22b, 25b	69257-3
C	pET-16b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	X	β-gal 119kDa	pET-16b	69675-3
D	pET-19b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7lac	His•Tag	E	β-gal 119kDa	pET-19b	69676-3
E	pET-28b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag T7•Tag	T	β-gal 119kDa	pET-9, 24, 26b, 27b, 28	69258-3
F	pET-29b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	S•Tag	T	β-gal 119kDa	pET-29	69259-3
G	pET-30b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag S•Tag	T, E	β-gal 121kDa	pET-30	69554-3
H	pET-31b(+)	BLR(DE3)pLysS	amp cam, tet	T7lac	KSI		none 14.8kDa	pET-31b	69966-3
J	pET-32a(+)	BL21(DE3)	amp	T7lac	Trx•Tag His•Tag S•Tag	T, E	none 20.4kDa	pET-32	69030-3
K	pET-34b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	CBD <sub>den</sub> •Tag S•Tag	T, E	β-gal 138kDa	pET-34b, 35b, 36b, 37b, 38b	70125-3
L	pET-39b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	DsbA His•Tag S•Tag	T, E	none 32.2kDa	pET-39b, 40b	70463-3
M	pET-33b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	His•Tag PKA site T7•Tag	T	β-gal 120kDa	pET-33b	70514-3
N	pET-41b(+)	BL21(DE3)	kan	T7lac	GST•Tag His•Tag S•Tag	T, E	none 35.6kDa	pET-41, 42	70535-3

Şekil 2.15. pET vektör ve konakçı türe göre kullanılacak füzyon proteinler. Kısaltmalar: amp = ampisilin veya karbenisilin, kan = kanamisin, cam = kloramfenikol, tet=tetrasiklin T = trombin, X = Faktör Xa, E = enterokinaz (Novagen, 1999).

## 2.10. Füzyon Proteinler

Füzyon proteinler veya kimerik proteinler (kelimenin tam anlamıyla, farklı kaynaklardan kısımlardan yapılmış), başlangıçta ayrı proteinler için kodlanmış iki veya daha fazla genin birleştirilmesiyle oluşturulan proteinlerdir. Bu füzyon geninin çevirisi, orijinal proteinlerin her birinden türetilen fonksiyonel özelliklere sahip tekli veya çoklu polipeptitlerle sonuçlanır. (Schmid vd., 1996)

Füzyon genleri, kromozomlar arasında DNA transferiyle vücutta doğal olarak oluşabilir. Örneğin, bazı lösemi tiplerinde bulunan BCR-ABL geni, BCR-ABL füzyon proteinini yapan bir füzyon genidir. Füzyon genleri ve proteinleri biyolojik araştırmalarda veya terapötiklerde kullanım için aynı veya farklı organizmalardan gelen genlerin veya gen parçalarının, rekombinant DNA teknolojisi ile birleştirilmesiyle yapay olarak laboratuarda da yapılabilir. Füzyon proteinleri ayrıca hastalık gelişimini incelemek için toksinler veya bunlara eklenmiş antikorlarla üretilebilir (Koepke vd., 1996). Füzyon proteinlerin en önemli kullanım alanları şunlardır;

- Proteinlere afinite tag'ının ilavesiyle (His<sub>n</sub> Tag, GST (glutasyon -S-transferaz), MBP(maltoz bağlanma proteini) gibi) proteinin saflaştırma işlemini kolaylaştırmak (Raggett vd., 2000).
- Thioredoxin(TRX) gibi proteinlerin ilavesiyle proteinlerin çözünürlüğünü artırmak veya disülfid bağlarının oluşumunu kolaylaştırmak.
- Füzyon proteinlerini periplazmik (iki membran arası) boşluğa taşımak ki orada disülfid bağ oluşumunu ve proteinin doğru katlanmasını kolaylaştırmak.
- GFP (yeşil flüoresant protein) gibi reporter proteinlerin ilavesiyle de proteinin üretilmesini ve üretildiği bölgenin gözlenmesi için kullanılmaktadır (Judger vd., 2016) (Anderluh vd., 2003).

## 2.11. Füzyon Etiketleri (Tags)

Füzyon etiketleri, genetik olarak bir rekombinant protein üzerine aşılmiş peptid dizileridir. Genellikle bu etiketler, kimyasal maddelerle proteoliz veya intein eklenmesi gibi enzimatik yollarla çıkarılabilir. Etiketler çeşitli amaçlarla proteinlere yapıştırılır. Afinite etiketleri proteinlere eklenir, böylece bir afinite tekniği kullanılarak ham biyolojik kaynaklarından saflaştırılabilirler. Bunlar, kitin bağlayıcı protein (CBP), maltoz bağlayıcı protein (MBP), Strep-tag ve glutation-S-transferaz (GST) içerir. Poli (His) etiketi, metal matrislere bağlanan yaygın olarak kullanılan bir protein etiketidir.

Çözünürlük etiketleri, özellikle *E. coli* gibi şaperon eksikliği olan türlerde eksprese edilen rekombinant proteinler için, proteinlerde uygun katlanmaya yardımcı olmak ve bunların çökmesini önlemek için kullanılır. Bunlar arasında tioredoksin (TRX) ve poli (NANP) bulunur. Bazı afinite etiketlerinin MBP ve GST gibi bir çözündürme ajanı olarak ikili bir rolü vardır.

Füzyon etiketleri, spesifik enzimatik modifikasyona (örneğin, biotin ligaz ile biotinilasyon gibi) veya kimyasal modifikasyona (flüoresans görüntüleme için FLAsH-EDT2 ile reaksiyon gibi) izin verebilir. Genellikle etiketler, proteinleri diğer birçok bileşene bağlamak için birleştirilir. Bununla birlikte, her bir etiketin eklenmesiyle, proteinin doğal fonksiyonunun, etiket ile etkileşimler yoluyla ortadan kaldırılması veya tehlikeye atılması riski vardır. Bu nedenle, saflaştırma işleminden sonra, etiketler bazen spesifik proteolizle (örneğin TEV proteaz, Thrombin, Factor Xa veya Enteropeptidase) çıkarılır (McAllister, 1993).

Füzyon etiketleri ifade edilen proteinlerin çözünürlüğünü geliştirir. Heterolog proteinlerin çözünürlüğü, protein üretiminde ciddi bir tıkanıklık olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, ifade koşullarının değiştirilmesi bazen sorunu çözebilse de, bu çözünürlük füzyonlarının kullanımının sistematik analizi zor olmuştur ve birçok proteinin farklı çözünürlük etiketlerinin varlığına farklı tepki gösterdiği anlaşılmaktadır.



Günümüzde, proteinleri eksprese etmek için kullanılan bir dizi ortak çözünürlük arttırıcı füzyon etiketi vardır. Bazı durumlarda, bu etiketler afinite etiketleri olarak iki katına çıkar, yalnızca çözünür ifadeyi kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda protein saflaştırmasının verimini de arttırır. Diğer durumlarda, bu çözünürlük etiketleri, füzyon ortağının çözünme işlevselliğini sürdürmesine ve ayrıca bir afinite etiketi olarak ikiye katlanmasına izin veren basit bir His-etiketi ile birleştirilmiştir. Bu çözünürlük arttırıcı etiketlerin birçoğuyla birleştirilebilen ilave afinite etiketleri de mevcuttur ve saflaştırılmış proteinleri üretmek için başarıyla kullanılmıştır (Vallejo vd., 2004).

### 2.11.1. S. Tag

S. Tag dizisi, Western blotlarda hızlı, hassas homojen bir deney veya kolorimetrik algılama ile tespit edilmesine izin veren bir füzyon-peptid etiketidir. Sistem, her ikisi de RNase A'dan türetilen, 15-aminoasit S-etiketi (Şekil 2.16) ve 103-amino-asit S-proteini arasındaki güçlü etkileşime dayanmaktadır. (Karpeisky vd., 1994; Kim ve Raines 1994). S-protein / S-etiket kompleksi, pH, sıcaklık ve iyon gücüne bağlı olarak ~ 0.1 M kd'ye sahiptir (Connelly vd., 1990).

Tag	Residues	Sequence	Size (kDa)
Poly-Arg	5-6 (usually 5)	RRRRR	0.80
Poly-His	2-10 (usually 6)	HHHHHH	0.84
FLAG	8	DYKDDDDK	1.01
Strep-tag II	8	WSHPQFEK	1.06
c-myc	11	EQKLISEEDL	1.20
S-	15	KETAAAKFERQHMS	1.75
HAT-	19	KDHLIHNVHKEFHAAHANK	2.31
3x FLAG	22	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK	2.73
Calmodulin-binding peptide	26	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSGAL	2.96
Cellulose-binding domains	27-189	Domains	3.00- 20.00
SBP	38	MDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQQQREP	4.03
Chitin-binding domain	51	TNPGVSAWQVNTAYTAGQLVTYNGKTYKCLQPHTSLAGWEPSNVPALWQLQ	5.59
Glutathione S-transferase	211	Protein	26.00
Maltose-binding protein	396	Protein	40.00

Şekil 2.16. Afinite etiketlerinin sırası ve boyutu (Connelly vd., 1990).

Etiket, dört katyonik, üç anyonik, üç yüksüz polar ve beş polar olmayan kalıntıdan oluşur. Bu kompozisyon, S-etiketini çözülebilir hale getirir. S. Tag hızlı tahlili, ribonükleolitik aktivitenin sulandırılmasına dayanır. Tagged proteinler S-protein matrislerine bağlanabilir. Elüsyon koşulları çok sert, örn. pH 2 olan tampon (Şekil 2.17); ancak, fonksiyonel proteinler elde etmek için etiketi proteazla ayırmak önerilir. Sistem, rekombinant proteinleri bakterilerden (Lellouch ve Geremia, 1999), memeli hücrelerinden ve bakulovirüs bulaşmış böcek hücresi özlerinden arındırmak için işlevseldir. Sistem genellikle ikinci bir etiketle birlikte kullanılır. RNase A için aşırı duyarlı bir florojenik substratın keşfi, sistemi yüksek verimli tarama ile kombinasyon halinde saptama için ilginç kılar (Kelemen vd., 1999).

Affinity tag	Matrix	Elution condition
Poly-Arg	Cation-exchange resin	NaCl linear gradient from 0 to 400 mM at alkaline pH>8.0
Poly-His	Ni <sup>2+</sup> -NTA, Co <sup>2+</sup> -CMA (Talon)	Imidazole 20–250 mM or low pH
FLAG	Anti-FLAG monoclonal antibody	pH 3.0 or 2–5 mM EDTA
Strep-tag II	Strep-Tactin (modified streptavidin)	2.5 mM desthiobiotin
c-myc	Monoclonal antibody	Low pH
S	S-fragment of RNaseA	3 M guanidine thiocyanate, 0.2 M citrate pH 2, 3 M magnesium chloride
HAT (natural histidine affinity tag)	Co <sup>2+</sup> -CMA (Talon)	150 mM imidazole or low pH
Calmodulin-binding peptide	Calmodulin	EGTA or EGTA with 1 M NaCl
Cellulose-binding domain	Cellulose	Family I: guanidine HCl or urea>4 M Family II/III: ethylene glycol
SBP	Streptavidin	2 mM Biotin
Chitin-binding domain	Chitin	Fused with intein: 30–50 mM dithiothreitol, $\beta$ -mercaptoethanol or cysteine
Glutathione S-transferase	Glutathione	5–10 mM reduced glutathione
Maltose-binding protein	Cross-linked amylose	10 mM maltose

Şekil 2.17. Afinitite etiketlerinin matrisleri ve elüsyon koşulları (Kelemen vd., 1999).

## 2.12. Büyüme Ortamı

Geniş bir büyüme ortamı aralığı, suşların büyümesi ve pET Sistemindeki hedef DNA'ların ifadesi için uygundur. Uygun büyüme ortamı M9, M9ZB, LB ve TB sıvı besiyeridir. Farklı besiyeri ortamlarının içerikleri Şekil 2.18' de gösterilmiştir.

LB*	M9	M9ZB (Studier et al., 1990)
Per liter: 10 g Bacto tryptone 5 g Yeast extract 10 g NaCl • Adjust pH to 7.5 with 1N NaOH • Autoclave	Per liter: 50 ml 20X M9 salts 20 ml 20% glucose 1 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> 0.5 g NaCl 930 ml autoclaved deionized H <sub>2</sub> O	Per liter: 10 g N-Z-amine A (Quest) 5 g NaCl • Autoclave and cool • Add 100 ml 10X M9 salts, 1 ml 1M MgSO <sub>4</sub> , 10 ml 40% glucose (from autoclaved stocks)

10X M9 salts	20X M9 salts	K phosphate
Per liter: 10 g NH <sub>4</sub> Cl 30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 60 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O • Autoclave	Per liter: 20 g NH <sub>4</sub> Cl 60 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 120 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O • Autoclave	Per liter: 23.1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 125.4 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • Autoclave

TB* (Sambrook et al., 1989)
Per liter: 900 ml deionized water 12 g Bacto tryptone 24 g Yeast extract 4 ml glycerol • Autoclave, cool to 60°C • Add 100 ml sterile K phosphate

Şekil 2.18. Büyüme ortamları için kullanılan besiyerleri (Novagen, 1999).

## 2.13. Moleküler Klonlama

Moleküler klonlama; DNA fragmanlarını çoğaltmak ve kopyalamak için kullanılan bir tekniktir.

Moleküler klonlama; bir DNA ve RNA dizisinin belirli bir bölgesinin diğer bölümlerden ayrılarak sınırsız miktarlarda üretilmesini sağlar.

İlgilenilen DNA fragmanının konak hücreye aktarımı için bir vektör kullanılır.

### 2.13.1. Polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) gen derişiminin arttırılması

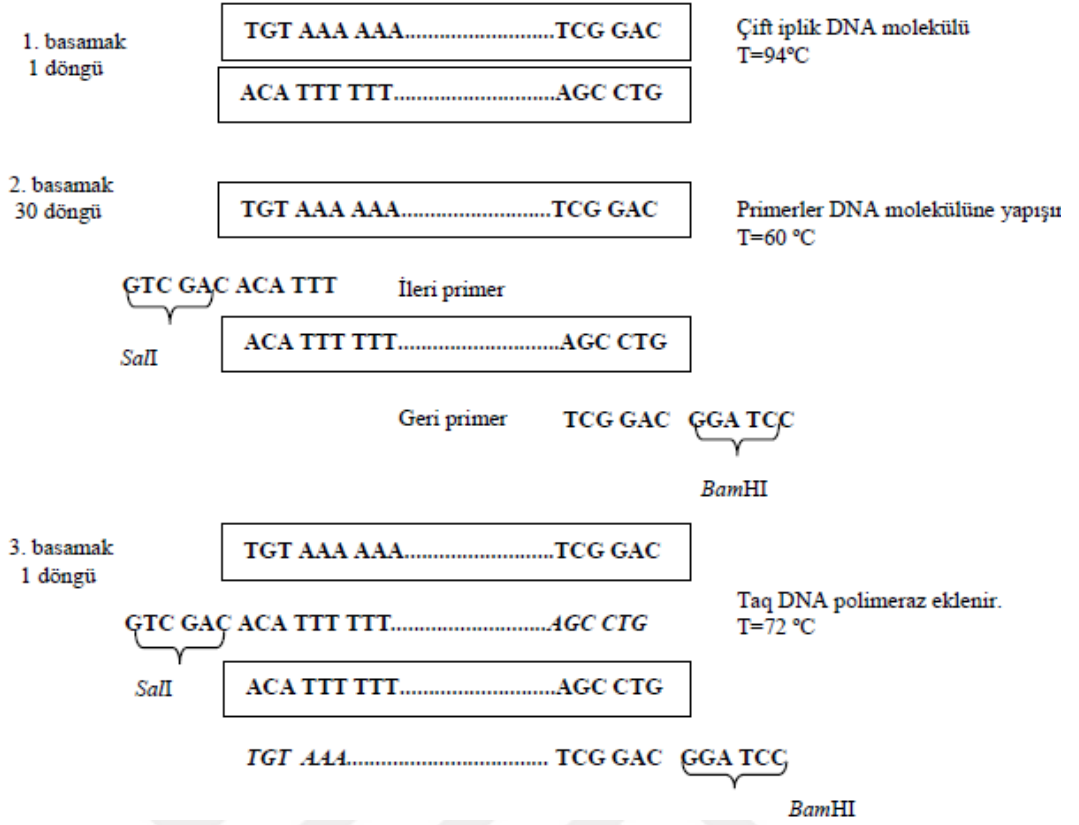
Polimeraz zincir tepkimesi (PCR: Polymerase Chain Reaction) özellikli bir DNA'nın belirli uzunluktaki bir hedef bölgesinin dizinini (kalıp) hücre dışında yüksek konsantrasyonda çoğaltmak için etkili bir yöntemdir. Hedef DNA

dizininin konsantrasyonu, PCR tepkimesi ile her döngüsü üç basamaktan oluşan çok sayıda (30-60 döngü) ardışık döngü ile üstel olarak arttırılır. PCR ile gen konsantrasyonunun arttırılmasının temeli DNA polimeraz enzimi ile ssDNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla DNA parçasının konsantrasyonunun arttırılmasıdır. PCR ile hedef genin konsantrasyonunun erişiminin arttırılabilmesi 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 ve klonlama için uygun restriksiyon enzim konumlarını içeren yaklaşık 20-30 nükleotitten oluşan iki sentetik oligonükleotit primer (ileri primer ve geri primer) tasarlanır (Şekil 2.19). Birbirinden ısı etkisiyle ayrılmış iki DNA zinciri de primerler yardımıyla çoğaltılması sırasında kalıp olarak kullanılabilir. Bir PCR prosesindeki her döngü üç önemli basamaktan oluşmaktadır. Bunlar:

**1. dsDNA'dan ssDNA oluşması:** PCR sisteminde ilk basamak, reaksiyon 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 reaksiyon kabı 1dk bu sıcaklıkta bekletilir.

**2. Primerlerin bağlanması:** İkinci basamakta, sıcaklık 94°C' den primerlerin yapışma sıcaklığına (~50-60°C) düşürülür. Böylece primerler hedef DNA üzerindeki özellikli 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 her bir primerin 3'-hidroksil grubundan DNA sentezi başlar. DNA sentezinin tamamlanması için gerekli süre hedef DNA'nın büyüklüğüne (1dk/kb) bağlı olarak değişir (Sambrook ve Russell 2001).



Şekil 2.19. PCR ile gen konsantrasyonunun artırılması (Sambrook ve Russell 2001).

PCR tekniği, temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır.

1. Denatürasyon:  $92-98^{\circ}\text{C}$ ' de 3-5 dakika DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir.
2. Bağlanma (Annealing):  $50-52^{\circ}\text{C}$ ' de, 3-5 dakika
3. Uzama (Extension-Elongation):  $70-74^{\circ}\text{C}$ ' de, 2 dakika PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır.

3 basamaktan (denaturation, annealing, primerextension) oluşan işlem, bir PCR döngüsünü temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçasığı çoğaltılır. PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde

yürütüldükten sonra, ethidium bromür (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenir. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu, iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.

Matematiksel olarak amplifikasyon;

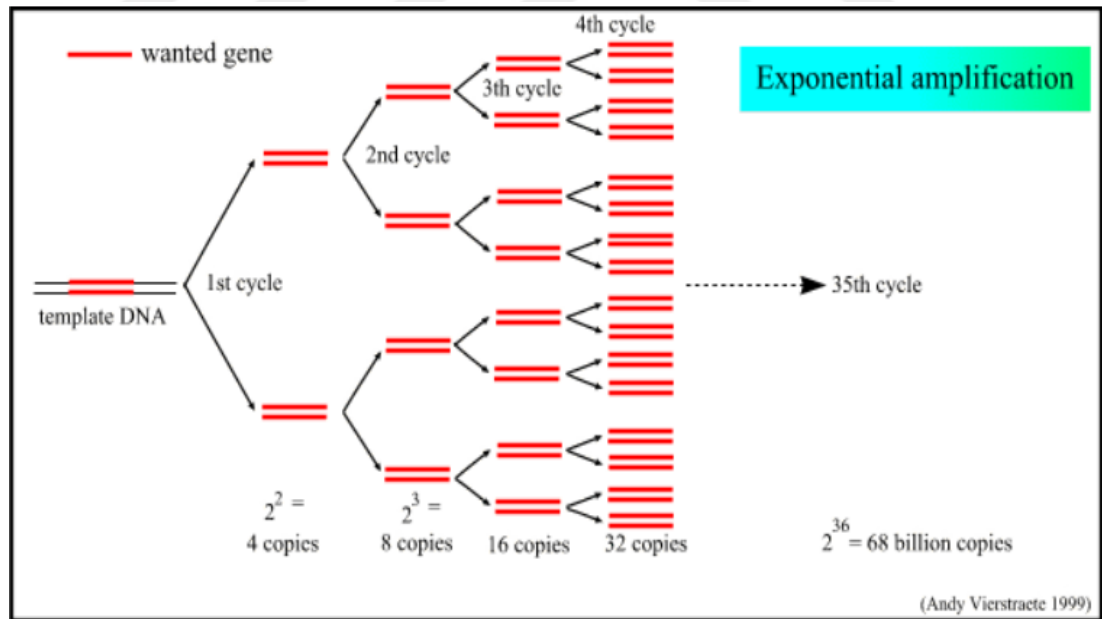
$(2^n - 2n)X$  ile hesaplanır.

$n$ =döngü sayısı.

$2n$ =birinci ve ikinci döngü sonucunda oluşan boyları bilinmeyen ürünler.

$X$ =orijinal kalıbın kopya sayısı.

Her döngü %100 verimle çalışsa 20 döngü sonunda 220 kat ürün oluşur (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. PCR ile matematiksel artış (Sambrook ve Russell 2001).

## 2.14. Protein saflaştırması

*In vitro* analizler yapabilmek için bir proteinin diğer hücre bileşkelerinden saflaştırılması gerekir. Bu süreç genelde önce hücrenin parçalanmasıyla

(sitoliz ile) başlar; hücre zarı bozulur ve hücrenin içeriği ham lizat (*crude lysate*) olarak adlandırılan bir sıvı halinde salınır. Bu karışım ultrasantrifigasyon ile hücrenin farklı kısımlarından oluşmuş bölümlere ayrılır; çözünen proteinler, membran lipitleri ve proteinler, hücre organelleri ve nükleik asitler bu şekilde birbirlerinden ayrılırlar. Tuzla çökeltme (*salting out*) yöntemi ile lizattaki proteinlerin konsantrasyonu artırılabilir. Bunun ardından, arzu edilen proteini saflaştırmak için onun büyüklüğü, elektrik yükü ve bağlanma afinitesi gibi özelliklerine dayanarak çeşitli kromatografi teknikleri kullanılır. Saflaştırmanın derecesini takip etmek için jel elektroforezi (eğer proteinin büyüklüğü biliniyorsa), spektroskopi (eğer proteinin ayırdedici spektroskopik özellikleri varsa) veya enzim ölçmeleri ile (eğer proteinin enzim etkinliği varsa) kullanılır.

Doğal bir proteinin laboratuvar uygulamaları için yeterince saf olarak elde edilebilmesi için bir seri saflaştırma aşamasından geçmesi gerekebilir. Bu süreci basitleştirmek için çoğu zaman genetik mühendislik kullanılarak proteinin yapı ve etkinliğine etki etmeden saflaştırılmasını kolaylaştıracak kimyasal özellikler eklenir. Belli bir amino asit dizisinden oluşan bir işaret (tag, çoğu zaman bir seri histidin kalıntısı (His-tag), proteinin bir ucuna eklenir. Bunun sonucunda, nikel içeren bir kromatografi kolonundan lizat geçirilince histidin kalıntıları nikel bağlanır ve kolonda tutulur, lizattaki işaretlenmemiş diğer her şey kolondan geçip gider.

### **2.14.1. Gen derişiminin ölçümü**

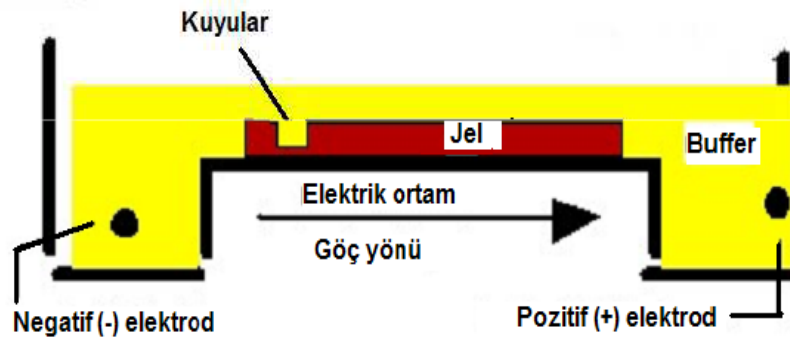
Gen derişimi;

1. Jel elektroforezi,
2. UV spektrofotometrik yöntemleriyle belirlenebilir.

DNA molekülünün net yükü yapısındaki fosfat iyonları nedeniyle negatiftir. DNA molekülleri molekül ağırlıklarındaki farklar nedeni ile jel elektroforezi cihazıyla (Şekil 2.21), bir elektrik alan uygulanarak ayrılırlar. Uygulanan elektrik alan

içinde molekül ağırlığı en küçük olan DNA en hızlı, en büyük olan da en yavaş hareket eder. DNA moleküllerinin ayrılmasında jel olarak agaroz kullanılır ve çok küçük DNA parçalarının ayrılması için de poliakrilamid kullanılır. Agaroz derişimi %0.7-1.2 (a/h) arasında amaca göre değişir. Jel elektroforezin yapılması sırasında voltaj 125 V'u geçmemelidir. Bu değerin üzerinde jelin yapısı bozulur ve elektroforez çözeltilisinde buharlaşma meydana gelir. Jel elektroforez cihazında jelin örnek haznelerinden birine işaretleyici (marker) yüklenir. İşaretleyicide bulunan bantlar ve büyüklükleri bellidir. Bu sayede yürütülen jel için uzaklığa karşı molekül ağırlığı grafiğe geçirilerek ölçümleme yapılır ve istenen genin molekül ağırlığı yapılan bu ölçümleme ile bulunur.

Örnekleri jele yüklerken, yükleme boyasının kullanılması gerekmektedir. Çünkü yükleme boyasındaki bromofenol mavisi 300bp DNA ile aynı hızla hareket eder ve böylece DNA bantlarının yaklaşık yerleri ve cihazın işletme süresi belirlenir. Jelde DNA parçalarının elektroforetik yürütülmesi tamamlandıktan sonra jel EtBr çözeltilisinde bekletilir ve DNA parçaları EtBr ile boyanır; böylece UV ışığı altında bantlar gözlenebilir. Genin veya DNA parçalarının konsantrasyonu ve molekül ağırlıkları, bilinen işaretleyici DNA parçalarının bant üzerindeki yerleri ve yansıttıkları ışık şiddeti ile kıyaslanarak hesaplanır (Çalık, 1998). Hem DNA hem de RNA konsantrasyonu spektrofotometre ile belirlenebilir. Nükleik asitler, UV-spektrofotometrede 260nm dalga boyunda en yüksek oranda ışık absorpsiyonu yaparlar. Konsantrasyon tayin edilirken DNA'nın veya RNA'nın saflaştırılmış olmasına dikkat edilmelidir; çünkü bulunan konsantrasyon ortamda bulunan tüm DNA ve RNA'nın konsantrasyonu olacaktır (Smith ve Wood 1991).



Şekil 2.21. Jel elektroforezi



## 2.15. SDS-Page Protein Analiz Yöntemi

Elektroforez, yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlendiği tekniğe verilen isimdir. Proteinlerin ayrılmasında ve analizinde kullanılır. Moleküllerin hareketi, moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğe ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır. Jel elektroforezi en çok kullanılan elektroforez yöntemidir (Alberts vd., 2002).

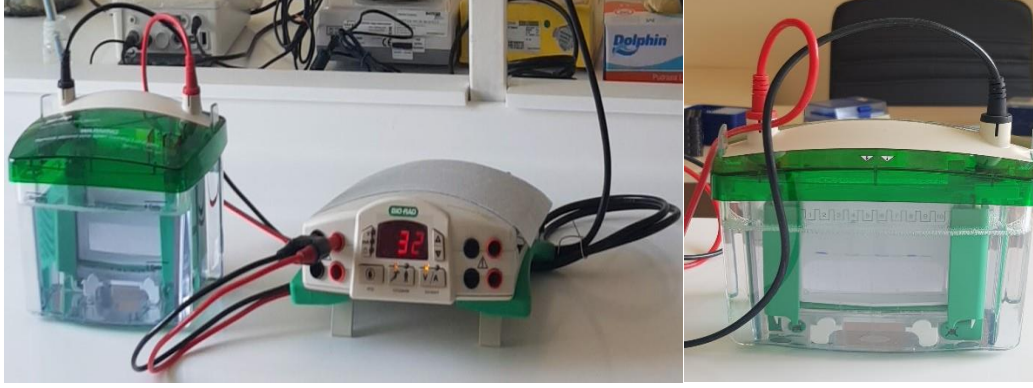
Jel elektroforez yöntemleri

- Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)
- Agaroz jel elektroforezi olarak ikiye ayrılmaktadır.

SDS (ayrıca lauril sülfat olarak da bilinir) bir anyonik deterjandır, yani çözüldüğünde moleküllerinin geniş bir pH aralığında net negatif yüke sahip olduğu anlamına gelir. Proteinler içerdikleri amino asitlere bağlı olarak genellikle bir artı veya eksi yüke sahiptir. Protein molekülü bulunan bir çözeltiye elektrik alan uygulandığında protein yüküne, büyüklüğüne ve biçimine bağlı olarak belirli bir hızla hareket eder. SDS' deki negatif yükler, proteinlerin karmaşık yapısının çoğunu tahrip eder ve elektrik alanındaki bir anoda (pozitif yüklü elektrot) kuvvetle çekilir (Şekil 2.22).

SDS-PAGE yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü, molekül ağırlıklarının bulunması ve konsantrasyon çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemde proteinlerin içinde hareket ettiği ortam olarak çok sayıda çapraz bağı bulunan poliakrilamid jel kullanılır. Jel monomerlerin polimerleşmesi ile hazırlanır, gözeneklerin boyutu istenilen proteinin ilerlemesini geciktirecek ölçüde küçük olarak ayarlanır. Jel sentetik bir madde olan akrilamid ile akrilamid türevi olan N-N'-metilen bis-akrilamidin polimerleşmesiyle oluşturulur ve örnekler bu jel üzerinde yürütülür. Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yan yana bağlanarak düz zincirler oluştururlar. Bis-akrilamid molekülleri ise iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Böylece ağimsı bir yapı meydana gelir. Polimerleşme derecesi sıcaklık, pH, amonyum per sülfat (APS) ve N,N,N',N'-

tetrametil-etilendiamin (TEMED) miktarına göre farklılık gösterir. Polimerleşme için serbest radikal oluşumuna sebep olan APS reaksiyon başlatıcı, TEMED ise katalizör olarak rol oynar (Cooper ve Hausman, 2004).



Şekil 2.22. SDS-Page yöntemi

## 2.16. Literatür Çalışmaları

Literatür incelendiğinde Rekombinant FGF-2 üretimi için farklı biyoinformatik yöntemlerle gerçekleştirilen çalışmalara rastlanmaktadır.

Gasparian ve arkadaşları (2009), tarafından çalışmada, FGF-2'nin (513 bp) amino asit dizilimini DNA gen profili ile çalışmalar yapılmıştır.

Sterling ve arkadaşları (2011), rekombinant FGF-2 proteinin üretimini sağlamak için memeli hücre kültürlerine farklı gen profillerini transfekte edilmesinin yanı sıra, ayrı rekombinant ekspresyon vektörlerine klonlamaya çalışmışlardır. Bunun için *E. coli* DH5a bakterisi kullanmışlardır. Bu projede, 22.5, 24 ve 34 kDa izoformları için memeli ekspresyon vektörleri oluşturulmuş ve 22.5 kDa ve 34 kDa izoformlarının protein üretimi CHO-K1 hücrelerinde doğrulanmıştır.

Patry ve arkadaşları (1994) yaptıkları çalışmada aktif FGF-2'nin homojenliğine ilişkin üretimi, saflaştırmayı araştırmışlardır. Bunun için FGF-2'nin sentezi için plazmit pET3a ve *E. coli* BL21(DE3) bakterisini kullanmışlardır. Ayrıca saflaştırılmış rekombinant FGF-2'nin saflaştırılmış formunun biyolojik aktivitesini değerlendirmişlerdir.

Zhu ve arkadaşları tarafından FGF-2'nin stabilitesini sağlamak amacı ile milisilindir formülasyonu geliştirilmiştir. Bunun için PLGA polimeri kullanılmış ve öncelikle FGF-2'nin stabil olmadığı durumlar belirlenmiştir. Daha sonra stabilizeyi artırmak için çeşitli ilave maddeler kullanılmıştır. FGF-2'nin stabilitesi için heparin (pH değişimine ve sıcaklık artışına karşı), EDTA (ortamdaki ağır metaller ile şelat yapması için), Mg(OH)<sub>2</sub>/BSA kombinasyonu (asidik mikroçevreyi nötralize etmesi için) ve sükröz (FGF-2'yi katı halde tutması için) kullanılmıştır. FGF-2 bu ek maddeler ile milisilindirler içine enkapsüle edilmiştir. FGF-2 salını fosfat salın tamponu (PBS) içinde izlenmiş ve salım çalışmasının 28. gününün sonunda FGF-2'nin % 71'i milisilindir formülasyonundan salınmıştır. Ortama salınmış olan bFGF'nin yapısal bütünlüğü sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak incelenmiş ve bu çalışma sonucunda FGF-2'nin yapısal bütünlüğünü koruduğu tespit edilmiştir.

Soleyman ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmalarda, en iyi ortamın seçilmesi için rekombinant FGF-2' nin üretkenliğini, farklı inkübasyon sıcaklıklarında (25°C, 30°C, 37°C ve 42°C) ve farklı besiyeri ortamında; lizojenik besiyeri (LB), müthiş besiyeri (TB), süper optimal besiyeri (SOB) ve 2xYT dahil 4 farklı ortamda test etmişlerdir ve optimum ekspresyon süresini belirlemek için sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizi yapmışlardır. Her ekspresyon kültürü için indüksiyondan 2, 4, 6 ve 24 saat sonra örnekler toplamışlar ve optimum bir üretimin 37°C'de elde edildiğini tesbit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında da optimum üretim 37°C'de olarak belirlenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Sarf ve Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf ve kimyasal malzemeler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Sarf ve Kimyasal Malzemeler

Kimyasal Madde/Malzeme	Firma
Agar	MERC, Almanya
Yeast Extract	Fluka, Almanya
Bacto Tryptone	OXOID, Birleşik Krallık
NaCl	SIGMA, ABD
Etidyum Bromür	SIGMA, ABD
Terrific Broth(TB)	SIGMA, ABD
Water(PCR için)	SIGMA, ABD
Agarose	AppliChem, Almanya
DNA Ladder	Fermentas, ABD
DNA Jel Ekstraksiyon Kiti	BioLabs, İngiltere
X-Gal	Fermentas, ABD

Çalışmada kullanılan enzimler Çizelge 3.2’ de ve oligonükleotitler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma
T4 DNA ligaz	Fermentas
Taq DNA Polimeraz	Fermentas
EcoRI	Fermentas
BamH1	Fermentas

Çizelge 3.3. Oligonükleotitler

Oligo İsmi	Baz Dizisi 5’-3’	Baz Sayısı
M13-F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	17
M13-R	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	19
M20-F	5'-TCAGTGGTGGTGGTGGTG-3'	18
M20-R	5'-GGGAATTGTGAGCGGATAAC-3'	20

Klonlama ve ekspresyon işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 3.4'de ve plazmitler Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Klonlama işlemlerinde kullanılan 2 farklı mikroorganizma

Tür	Suş	Firma
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)	Novagen

Çizelge 3.5. Klonlamada ve ekspresyonda kullanılan plazmitler

Plazmit	Kullanım Amacı	Firma
pET-32a(+)	Klonlama ve ekspresyon vektörü	Novagen

### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Firma
Mikrodalga Fırın	Arçelik
Buzdolabı	Profilo
Mikro Santrifüj	BIO-RAD
Dondurucu (-80°C)	Thermo Scientific
İnkübatör (orbital çalkalayıcı)	JEIO TECH
Otoklav	HIRAYAMA
Distile su cihazı	Nükleon
pH Metre	METTLER TOLEDO
Derece	Elite
Vorteks	yellow line
Hassas terazi	AND GH-257
Kuru Isı Bloğu	Clifton
Isıtıcı-Manyetik karıştırıcı	yellow line
PCR Makinesi	BIO-RAD
Agaroz Jel Elektroforezi	BIO-RAD
Jel Görüntüleme Sistemi	BIO-RAD
UV/VIS Spektrofotometresi	mySPEC
Western blot	BIO-RAD

### 3.2. Yöntem

Rekombinant DNA yöntemi ile *E. coli* bakterisinin ile FGF-2 rekombinant protein üretimini gerçekleştirebilmesi için yapılan deneysel çalışmalar farklı aşamalardan oluşmaktadır.

1. Restriksiyon endonükleazlarla istenilen DNA bölgesinin kesilip çıkartılması,
2. Aynı restriksiyon endonükleazla vektör DNA'sının kesilmesi,
3. Vektör DNA'sı ile hücresel DNA'nın birleştirilmesi (rekombinant DNA),
4. Hücresel DNA+vektör DNA'sının konakçı organizmaya aktarılarak çoğaltılması,
4. Organizmadan özel DNA parçalarını içeren klonların seçilmesi.

### 3.3. Kodon Seçimi ve Gen Sentezi

Kodon optimizasyonu için FGF-2 genine S. Tag genine ait protein sekansı '<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>' FGF-2 ve S. Tag'a ait mRNA dizisi "<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>" databaseinden FASTA formatında alıntılandı.

Söz Konusu gene ait mRNA sekans dizisi 'Jawa kodon adaptasyon tool (JCAT)' da işlenerek ilgili aminoasit sekansları NCBI protein database de 'FGF -2 protein sekansı' dizisinin FASTA formatı ile karşılaştırılıp Jcat ve NCBI sekans dizileri ile ilgili aminoasitlerin sentezlenmesine aracılık eden mRNA dizisi belirlendi. 288aa'e kalıplık eden mRNA gen dizisi olarak 864bp uzunluğunda mRNA sekansı belirlendi .

Vektör pET-32a(+) ve konakçı BL21(DE3) için uygun olan füzyon proteinleri Şekil 2.16'daki tabloda da gösterildiği gibi Trx tag, His Tag ve S. Tagdır. Yüksek saflıkta ve verimde üretim yapmayı sağlayan S.Tag kullanılmıştır.

FGF-2 Geninin insan genomundan izolasyon ve amplifikasyonunu sağlayacak PCR primer dizileri dizayn edilerek dizilere esas sekanslar <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> online software ile blastlanarak bölge spesivitesini sağlayacak özellikte ve uzunlukta primerler dizayn edildi.

### 3.3.1. Restriksiyon Enzimleriyle Kesim

pET-32a(+) vektörü EcoRI ve BamHI yapışkan uçlu restriksiyon enzimleriyle Çizelge 3.7' deki çeşitli deney çalışmaları ve protokoller kullanılarak optimum ortam koşulları sağlanmış ve kesilmiştir (Şekil 3.1).

Çizelge 3.7. pET-32a(+) vektörü için kesim optimum koşulu

Pet-32a(+) vektörü için Kesim	Firma
3 µl pet vektör	Novagen
3 µl 10x EcoRI enzyme buffer	Roche
3 µl 10x BamHI enzyme buffer	Roche
0,5 µl EcoRI	Roche
2 µl BamH1	Roche

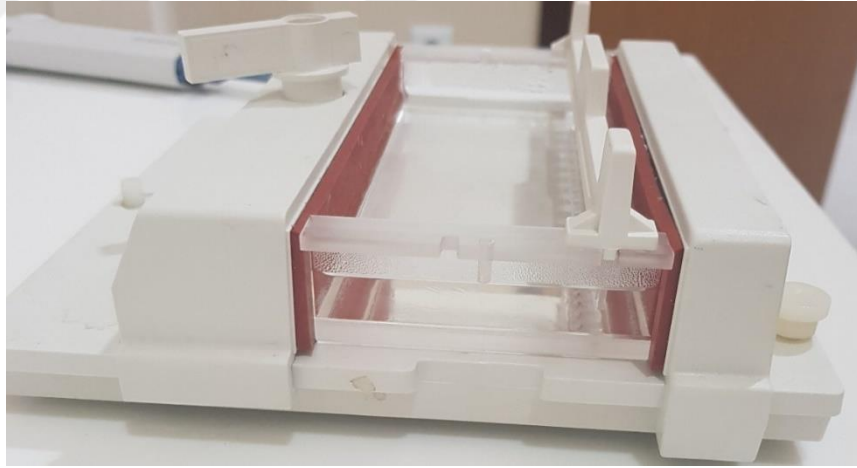
- Kesim reaksiyonları 37 °C' de 3 saat kuru ısı bloğunda 45 dakikada bir karıştırılarak işlem tamamlandı.



Şekil 3.1. Kuru ısı bloğunda 37°C' de

### 3.3.2. EcoRI, BamHI kesim işlemi sonrasında Agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme

- 1g agaroz tartıldı, 100ml 1x TBE solüsyonu içerisine konuldu ve üzerine stok etidyum bromür eklendi.
- Mikrodalga içerisine çözünmesi için karıştırılarak konuldu ve kaynatıldı.
- Mikrodalgadan çıkartılıp karıştırıldı (dibinde çökmeler olduğu için) ve tekrar mikrodalga içerisine konulup kaynatıldı jel haline geldi.
- Jel küvete döküldü, üzerine küvetin tarağı eklendi ve donması için beklenildi (Şekil 3.2).
- Jel küvetten çıkartılıp jel elektroforez küvetine konuldu ve üzeri 1xTBE solüsyonu ile max seviyesine kadar dolduruldu. 3 saat sonunda kesimi biten vektör sırasıyla Çizelge 3.8' deki gibi küvetlere konuldu.



Şekil 3.2. Küvete kuruması için dökülen jel.

Çizelge 3.8. Jel elektroforezinde kullanılan malzemeler

<b>Elektroforez Küveti İçerisine</b>	<b>Firma</b>
3 µl kesim yapılan pet-32a(+)	Novagen
3 µl kontrol	Novagen
3 µl DNA ladder	Fermentas



- 220V'da 20dk jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 3.3).
- EcoRI, BamHI kesimi ile klonlandığı vektörden çıkartılmış bir gen olan pET-32a(+), jel görüntüleme sisteminde (Şekil 3.4), jelin boyanan kısmı ve jelin boyasız kısmı olarak kolaylıkla görülebildi ve fotoğrafı alındı.



Şekil 3.3. Jel elektroforezi



Şekil 3.4. Jel görüntüleme sistemi.

### 3.3.3. Vektör DNA'sının jelden ekstraksiyonu

Kesim sonrası vektör ve gen parçasının enzimlerden ve içerisinde bulunan tampon sisteminden kurtulması için %1' lik agaroz jel üzerinden kesilmiş pET-

32a(+) vektörünü geri almak için DNA Jel Ekstraksiyon Kiti (BioLabs) kit protokolüne göre kullanılarak DNA'nın izolasyonu ile temizleme işlemi (jel ekstraksiyonu) yapıldı. İzolasyonu gerçekleştiren Vektör DNA'sı 260nm' de spektrofotometrede OD ölçümü yapıldı ( Şekil 3.5).



Şekil 3.5. UV spektrofotometre ile mikroorganizma yoğunluğu ölçümü

### 3.3.4. Besiyerlerinin hazırlanması

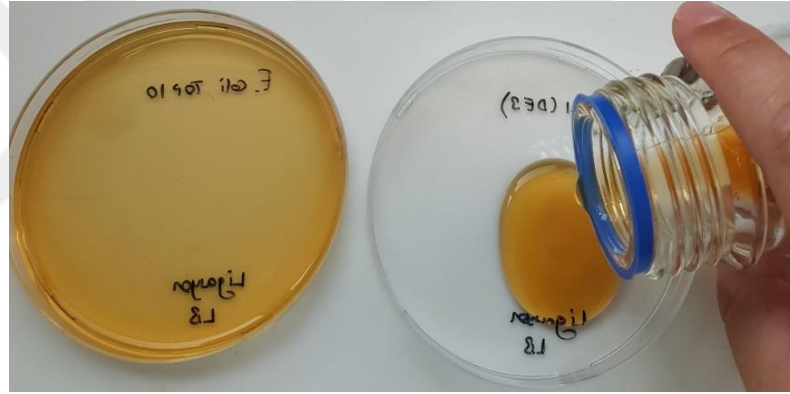
#### TB agar

TB sıvı besiyerini (SIGMA) katı besi yeri haline getirmek için;

- 100ml' lik 30ml' lik TB sıvı besiyeri konuldu.
- 0,3g agar (AppliChem) hassas terazide tartılıp TB sıvı besiyerine ilave edildi ve (Şekil 3.6) otoklavlandı.
- TB besiyeri 50°C' ye soğutulup içerisine 0,003g toz ampisilin ve kolonilerin gözükmesi için (mavi/beyaz) 2 µl X-Gal (Fermentas) ilave edildi çalkalandıktan sonra 2 adet petri kabına 15 µl kadar döküm yapıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Otoklav ile sterilizasyon işlemi



Şekil 3.7. Petri kaplarına besiyeri dökümü

### 3.3.5. LB agar

LB agar hazırlamak için Çizelge 3.9 'daki yer alan malzemeler kullanıldı, otoklavlandı ve petri kutularına döküldü.

Çizelge 3.9. LB agar hazırlamak için kullanılan malzemeler.

LB Agar	Miktar
Bacto-trptone	5g
Yeast extract	2,5g
NaCl	10g
Distile H <sub>2</sub> O	400ml

- Bu maddeler distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözüldü. Besiyerinin pH'sı 7,5'e ayarlandıktan sonra 7,5g agar ilave edildi ve manyetik karıştırıcıyla tamamen çözüldükten sonra son hacim 500mL' ye tamamlanarak ve sterilizasyon için otoklava konuldu.
- Otoklavlama işlemi sonrası LB besiyeri 30ml alınarak ve 50°C' ye soğutulup içerisine 0,003g toz ampisilin ve kolonilerin gözükmeye için (mavi/beyaz) 2 µl X-Gal ilave edildi çalkalandıktan sonra 2 adet petri kabına 15µl kadar döküm yapıldı.
- Soğuması beklendi ve daha sonra kullanılmak üzere +4°C'ye buzdolabına konuldu.

### 3.2.5. Ligasyon (Bağlama) İşlemi

- Ligasyon işlemi 2 farklı protokol uygulanarak yapıldı (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. İki farklı ligasyon işlemi protokolü

<b>Ligasyon1 (Fermentas)</b>	<b>Ligasyon 2 (Sigma)</b>
5 µl vektör	1 µl vektör
5 µl insert (sentetik gen)	1 µl insert
2 µl Ligasyon buffer	1 µl DNA Ligase from T4-infected <i>E.coli</i>
2 µl T4 DNA Ligaz	0,5 µl 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (M13-F)
0,5µl 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (M13-F)	0,5 µl 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' (M13-R)
0,5 µl 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' (M13-R)	6 µl dH <sub>2</sub> O
5 µl dH <sub>2</sub> O	

- Ligasyon 1, toplamda 20 µl; ligasyon 2 ise toplamda 10 µl olacak şekilde 16°C' de 2 saat buzlu su banyosunda Şekil 3.8' deki gibi bekletildi. Böylece transformasyon için hazır hale getirildi.



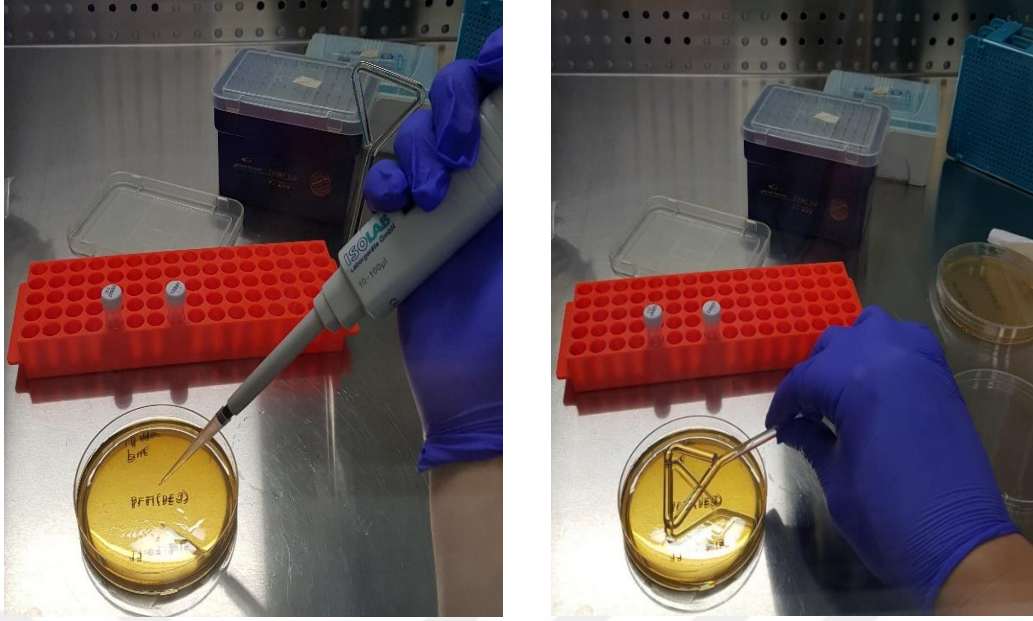
Şekil 3.8. Ligasyon 16°C'de buz banyosunda

- Ligasyon 1 ve ligasyon 2 ile ayrı ayrı yapılan ligasyonların olup olmadığı, PCR ve jel elektroforeziyle bakıldı görüntüsü alındı.
- Ligasyon 1 ile yapılan Jel görüntüsünde DNA yoğunluğu daha çok olduğu için deneylere Ligasyon 1 ile devam edildi.

### 3.3.6. Transformasyon (*E. coli* TOP10)

- *E. coli* TOP10'lu (Invitrogen), birisi ligasyon ve diğeri kontrol amacıyla kullanılan pUC19 DNA için 2 ayrı ependorf tüp alındı.
- Ligasyon yapılan plazmit DNA, kısa süreliğine hızlı santrüflendi ve buz küveti içerisine konuldu.
- Ligasyon karışımından 5 µl alınıp ligasyon yazan *E. coli* TOP10'lu tüpe konuldu ve sadece dibine parmakla vurarak karışması sağlandı.

- PUC19'dan 5 µl alınıp ligasyon yazan *E. coli* TOP10'lu tüpe konuldu ve aynı şekilde dibine parmakla vurarak karışması sağlandı.
- 30 dk buz küvetinde bekletildi.
- Hemen 42°C' lik kuru ısı bloğunda tüpler sıcakla 30sn şoklandı ve hemen tekrardan buz küveti üzerine konuldu.
- S.O.C. besiyeri oda sıcaklığına getirildi.
- S.O.C. besiyerinden 250' şer µl alınıp ligasyon tüpüne ve pUC19 DNA tüpüne konuldu.
- Çalkalamalı inkübatöre 2 tüp, 37°C' de 225rpm' de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- TB besiyeri ısıtıldı 37°C' ye getirildi.
- Ligasyon ve pUC19 DNA 2 ayrı TB besiyerli petri kutusuna ekim yapıldı. Cam öze yardımıyla *E.coli'* lerin yayılması sağlandı (Şekil 3.9).
- Petri kutuları 37°C' de gece boyunca inkübatörde inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.9. TB besiyeri ortamına ekim yapılması.

### 3.3.7. Transformasyon BL21(DE3)

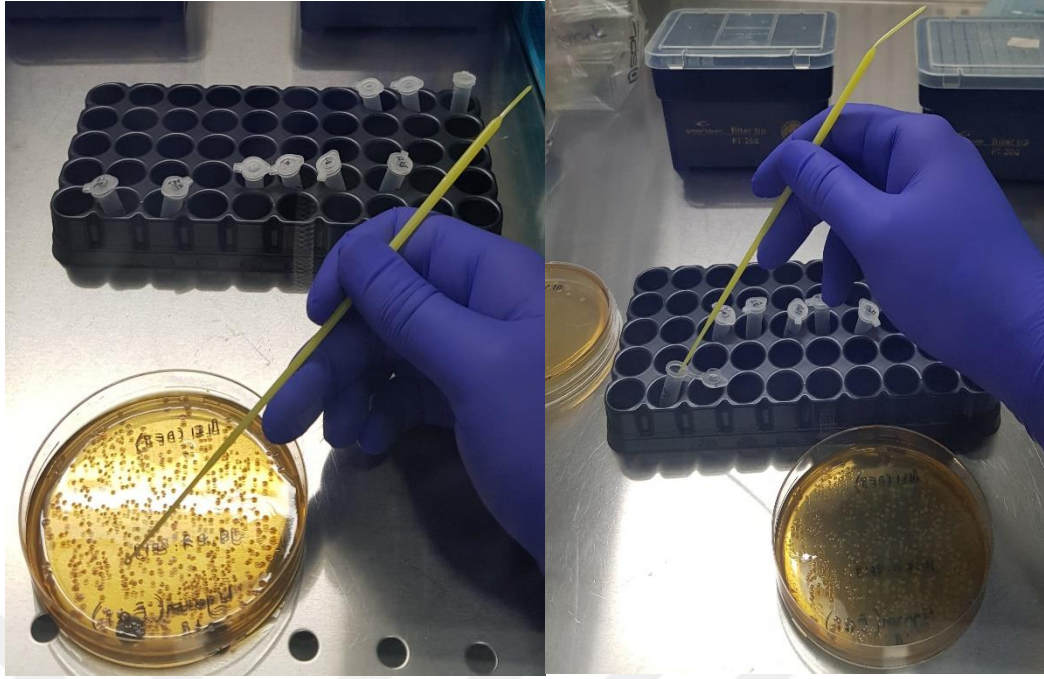
- *E. coli* BL21(DE3)' den (Invitrogen) birisi ligasyon ve diğeri kontrol amacıyla kullanılan pUC19 DNA için 2 ayrı ependorf tüpler alındı.
- Ligasyon yapılan plazmit DNA, kısa süreliğine hızlı santrüfüjlendi ve buz küveti içerisine konuldu.
- Ligasyon karışımından 5 µl alınıp 2 farklı tüpe konuldu ve sadece dibine parmakla vurarak karışması sağlandı. Kesinlikle çalkalanmayacak!
- PUC19'dan 5 µl alınıp ligasyon yazan *E. coli* TOP 10'lu tüpe konuldu ve aynı şekilde dibine parmakla vurarak karışması sağlandı.
- 30 dk buz küvetinde karıştırmadan inkübe edildi.
- Hemen 42°C' lik kuru ısı bloğunda tüpler sıcakla 30sn şoklandı ve hemen tekrardan 5 dk boyunca buz küveti üzerinde karıştırmadan bekletildi.
- S.O.C. besiyeri oda sıcaklığına getirildi.

- S.O.C. besiyerinden 950' şer µl alınıp ligasyon tüpüne ve pUC19 DNA tüpüne konuldu.
- Çalkalamalı inkübatöre 2 tüp, 37°C de 250rpm' de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- TB besiyerli petri kutuları ısıtıldı 37°C' ye getirildi.
- Ligasyon ve pUC19 DNA, 2 ayrı TB besiyerli petri kutusuna ekim yapıldı. Cam öze yardımıyla *E. coli*'lerin yayılması sağlandı.
- Petri kutuları 37°C' de gece boyunca inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

### **3.3.8. Klonlama işleminin test edilmesi amacıyla PCR Analizi**

- Steril öze kullanarak üreme olan *E. coli* TOP10 (TB besiyeri) ve *E. coli* BL21(DE3)(LB besiyeri)'lü agar plakalarından en az 1mm çapında olan ve mümkün olduğunca çok sayıda hücre alınmaya çalışıldı (Şekil 3.10).
- 0,5 ml' lik tüplere 50 µl distile su konuldu bunun içerisine öze yardımıyla aldığımız koloniler steril bir şekilde konuldu.
- Tüplerden kullanılmayanların ağızları parafinlenerek -20°C' ye buzluğa konuldu.
- PCR için kullanılanlar ise, 5 dk boyunca 99°C' de kuru ısı bloğunda bekletildi.
- Hücre kalıntılarını gidermek için 1 dakika boyunca 12.000rpm' de santrifüjlendi.
- Ardından hemen, kullanana kadar buz üzerinde bırakıldı.
- PCR yapılarak jel elektroforeziyle görüntüsü alındı.





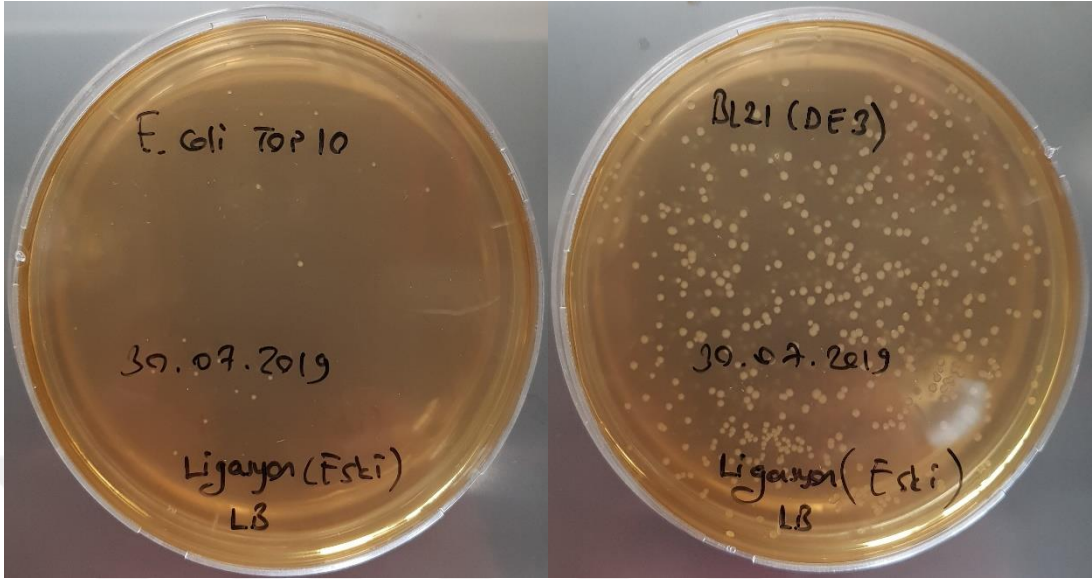
Şekil 3.10. Steril öze yardımıyla toplanıp distile suya konulan koloniler.

### 3.3.9. SDS-Page Analizi

- SDS-Page için tekrardan besiyerlerine ekim yapıldı. Çünkü *E. coli* bakterisi tarafından yeni üretilen protein lazımdı ve bakterilerin iyice üreyerek çoğalması isteniyordu. Bunun için, etüvde 37° C'de 1,5-2 gün boyunca *E. coli*' ler bekletildi.
- *E. coli*' ler öze yardımıyla alındı ve SDS-Page solüsyonuna konuldu.
- 3 defa SDS-Page yapıldı ve jel görüntüleme sistemiyle fotoğrafları alındı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. TB ve LB besiyeri ortamlarının karşılaştırılması

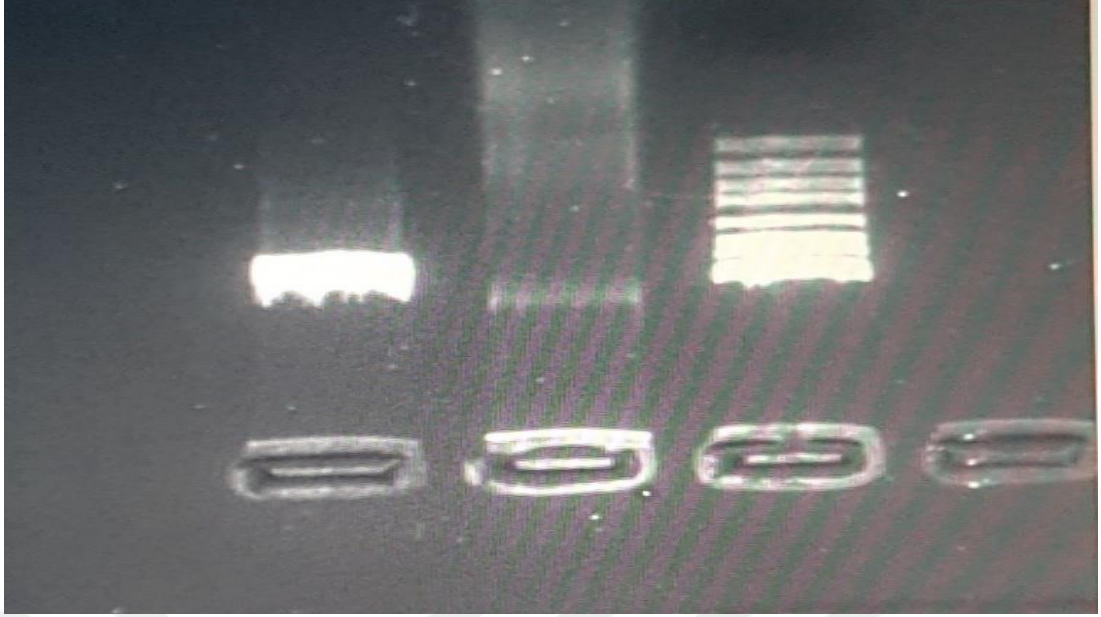


Şekil 4.1. *E. coli* TOP10 ve *E. coli* BL21(DE3)'ün LB besiyeri ortamında 19 saatsonunda oluşan koloni görüntüsü.

TB (Şekil 4.5) ve LB besiyeri ortamlarına ayrı ayrı ekim yapıldı ve 19 saatin sonunda özellikle *E.coli* TOP10 bakterisinin bulunduğu LB besiyeri ortamında daha az üreme olduğu sonucuna ulaşıldı. TB besiyeri ortamının *E.coli* bakterisinin üretilmesi için daha uygun potansiyele sahip olduğu sonucuna varıldı.

### 4.2. pET-32a(+) Kesim Reksiyonu Bulguları

Vektör pET-32a(+)'nın kesim reaksiyonunun olup olmadığını anlamak için jel elektroforezi yapıldı ve jel görüntüleme sistemiyle fotoğrafı alındı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Jel görüntüleme sisteminden çıkan fotoğraf soldan sağa sırasıyla 1.kuyucuk, kontrol, 2. kuyucuk, kesilmiş vektör, 3. kuyucuk, DNA ladder.

pET-32a(+)'nın kesimi yapıldıktan sonra içerisindeki jelden ayırma işlemi yapıldı ve spektrofotometrede 260nm' de OD okuması yapıldı. OD: 0,729.

### 4.3. Ligasyon Öncesi OD Ölçümleri

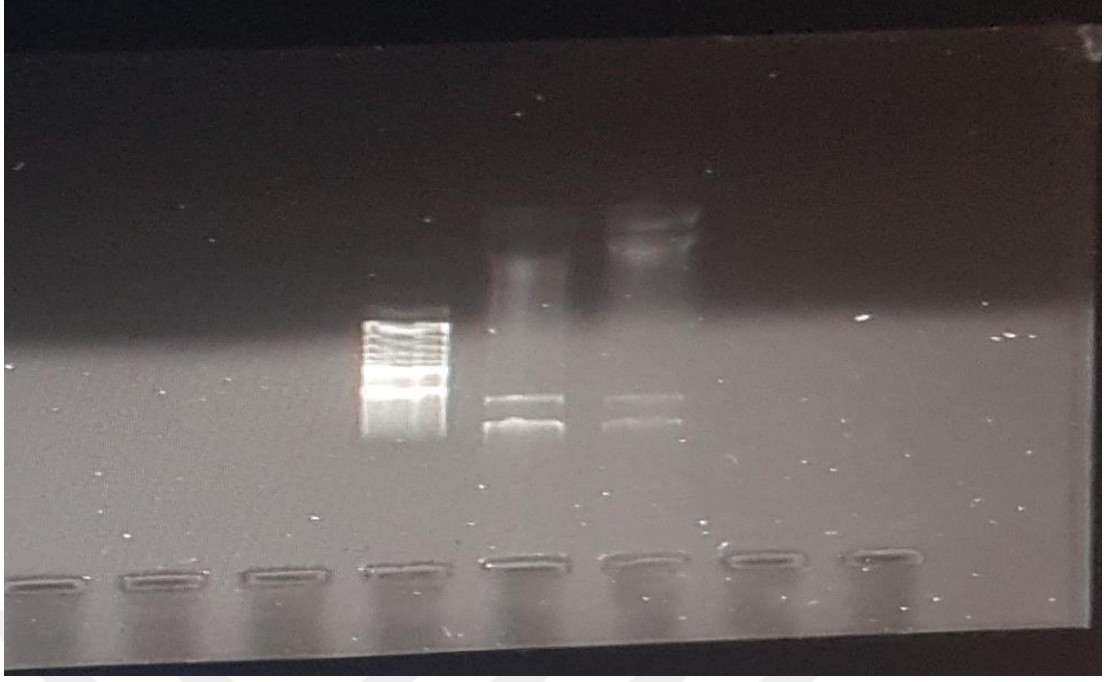
Ligasyon öncesi, FGF-2 sentetik gen ve oligonükleotit dizileri hazırlanarak spektrofotometrede 260nm' de OD okumaları yapıldı.

Çizelge 4.1. Ligasyon öncesi UV ölçümleri

İsim	Eklenen su oranları( $\mu$ l)	OD Sonuçları
FGF(ATG+TRX+S.Tag+DDDK+(Gly <sub>4</sub> Se) <sub>2</sub> +FGF-2+UAA)	100	0,826
M13-F	511	4,194
M13-R	623	6,230
M20-F	659	11,319
M20-R	652	12,591

### 4.4. Ligasyon Analiz Bulguları

Ligasyon1 ve Ligasyon2 olmak üzere 2 farklı firmanın ligasyon işlemi protokolleri uygulanarak yapıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. PCR görüntüsü soldan sağa; 1. kuyucuk DNA Ladder 2. kuyucuk ligasyon1 3. kuyucuk ligasyon2.

#### 4.5. Klonlama Sonrası Plazmit DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Analizi

Başlık 3.2.8' de anlatılan PCR reaksiyonu sonucunda FGF-2 proteininin amplifiye edildiği %1' lik agaroz jelinde gözlemlenmiştir.

Plazmit pET-32a(+)'nın kesilmesi ardından, İnsert DNA (ATG + TRX + S.TAG + DDDDK + (Gly<sub>4</sub>Se)<sub>2</sub> + FGF-2 + UAA), M13R ve M13F oligonükleotitleriyle ligasyon işlemi yapılmıştı. En son olarak da genin plazmite klonlanıp klonlanmadığını anlamak amacıyla M20R ve M20F oligonükleotitlerle PCR gerçekleştirildi.

- PCR ürünüyle Jel elektroforezi yapıldı ve protein yürütüldü (Şekil 4.4).
- Jel üzerinde yürütülen proteinin jel görüntüleme cihazıyla miktarı belirlendi.



Şekil 4.4. Soldan sağa 1. 50bp'lik DNA ladder 2. *E. coli* TOP10 3. ve 4. *E. coli* BL21 (DE3) 5. 200bp'lik ladder.

1.kuyucukta 20bp'lik ladder.

2. kuyucukta, *E. coli* TOP10 bulunan transformasyon sonucu oluşan protein miktarı 196bp.

3. kuyucukta, *E. coli* BL21(DE3) bulunan transformasyon sonucu oluşan protein miktarı195bp.

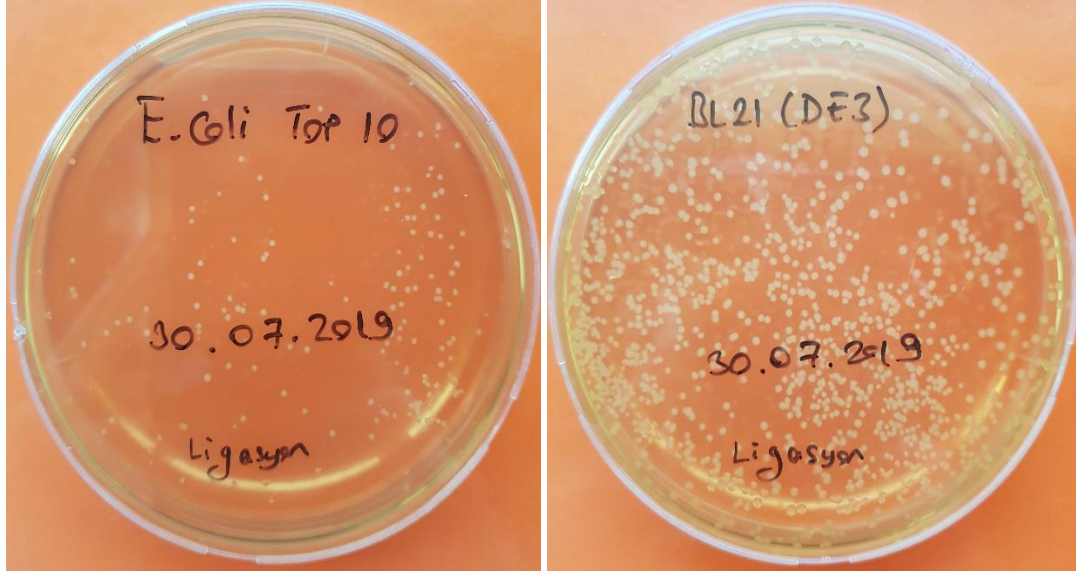
4. kuyucukta, *E. coli* BL21(DE3) bulunan transformasyon sonucu oluşan protein miktarı196bp.

5. 200bp'lik ladder.

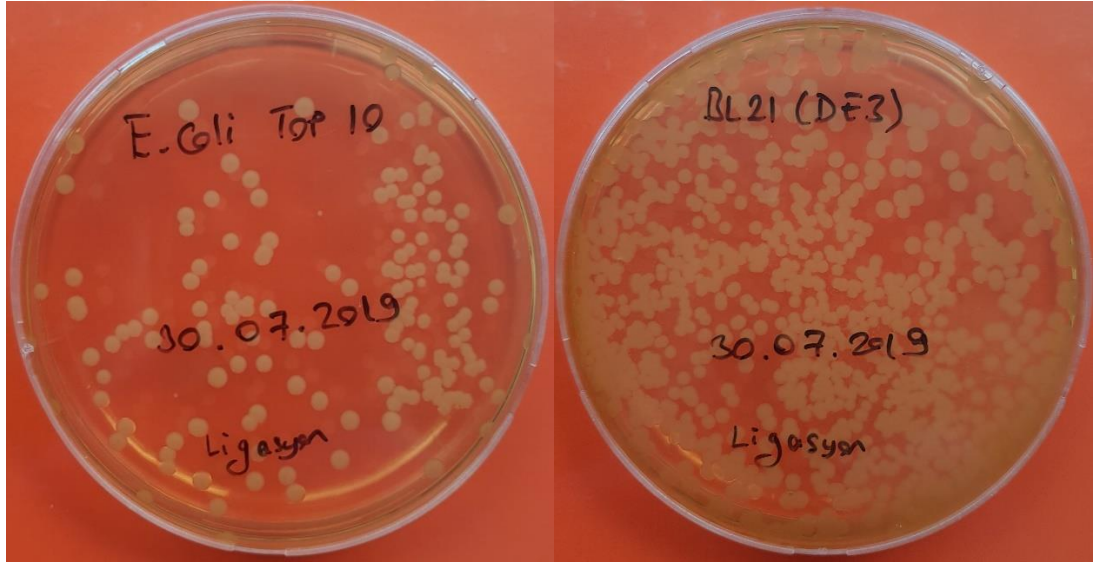
Çıkan sonuçlar M20F ve M20R oligonükleotitlerinin doğru birleştiği ve FGF-2 proteinini üretebildiğini ortaya koydu.

#### 4.6. SDS-Page Analiz Bulguları

- SDS-Page için, etüvde 37° C'de 1,5-2 gün boyunca *E. coli*' ler iyice üremesi için bekletildi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

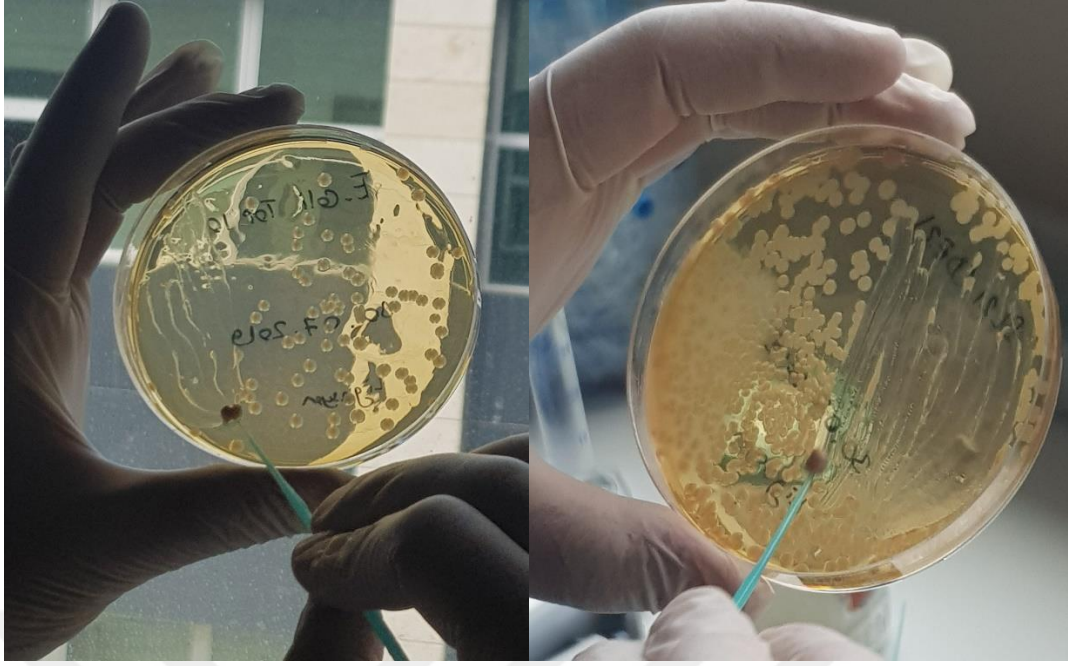


Şekil 4.5. *E. coli* TOP10 ve *E. coli* BL21(DE3)'ün TB besiyeri ortamında 19 saat sonunda oluşan koloni görüntüsü.



Şekil 4.6. *E. coli* TOP10 ve BL21(DE3)'ün TB besiyeri ortamında 44 saat sonunda oluşan koloni görüntüsü.

- Katı besiyerlerindeki *E. coli* (TOP10 ve BL21(DE3)) toplam koloni sayısı belirlendi. *E. coli* TOP10 bakterisi yaklaşık 200 koloni, *E. coli* BL21(DE3) bakterisi ise onun en az 2 katı kadar yaklaşık 450 civarında koloni sayımı yapıldı. BL21(DE3) bakterisinde daha çok kolonileşme olduğu gözlemlendi.
- Koloniler öze yardımıyla SDS-Page solüsyonu içerisine toplandı (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Koloniler öze yardımıyla toplanırken.

- Arta kalan koloniler distile sulu mikro tüpler içerisine öze yardımıyla alındı ve ağızları parafinlenerek -20° C' ye buzdolabına kaldırıldı.

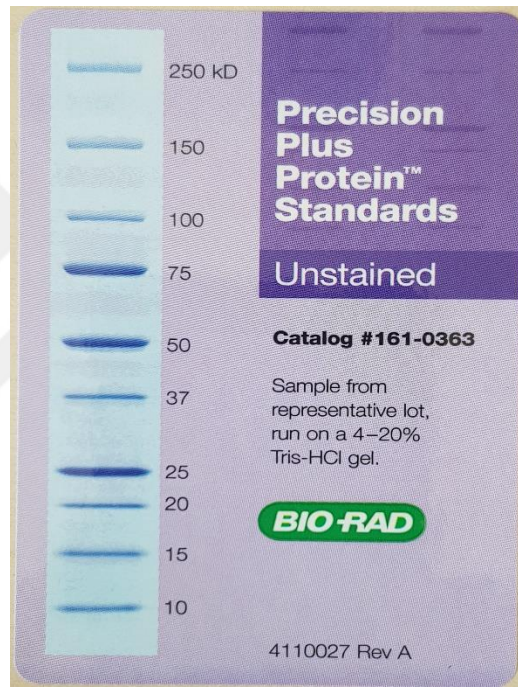


Şekil 4.8. SDS-Page solüsyonuna koloniler konuldu.

- Deney-1; SDS-Page kuyucuklarına sırasıyla 1. Kuyucuğa 5µl Precision Plus Protein All Blue Standarts konuldu. 2.kuyucuğa 20µl *E. coli* TOP10, 3. kuyucuğa 20µl *E. coli* BL21(DE3), 4.kuyucuğa 5µl yine Precision Plus Protein

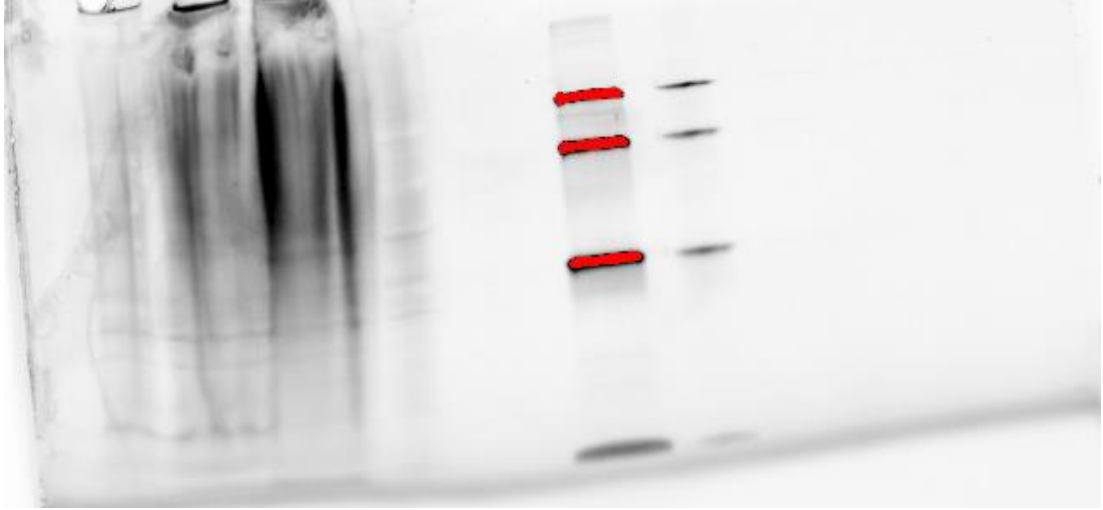
All Blue Standarts konuldu. 5. kuyucuğu boş bırakıp, 6. Kuyucuğa ise 5µl western C standart konuldu.

- 150V'da 20dk yürütme yapıldı.
- Jel görüntüleme sistemiyle görüntüsü alındı (Şekil 4.10).
- Kullanılan markera ve markaya göre protein boyutu (kd) belirlendi (Şekil 4.9).



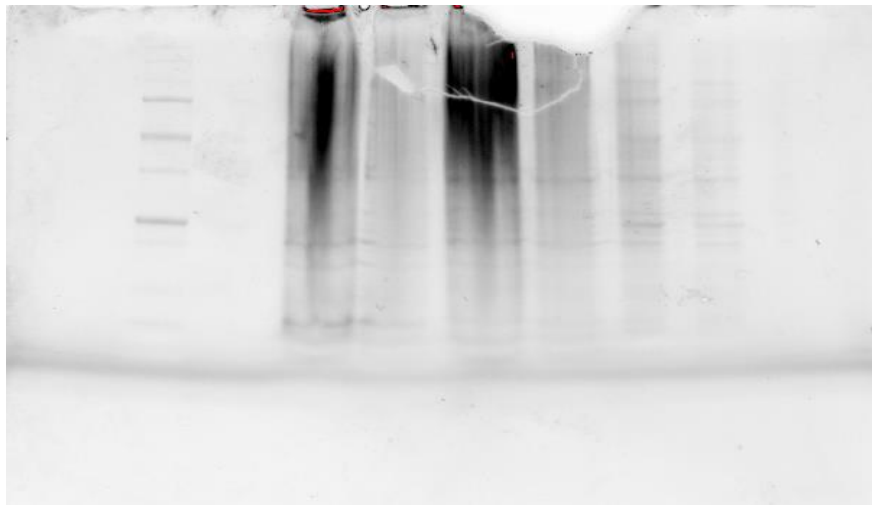
Şekil 4.9. Protein boyutunu gösteren çizelge





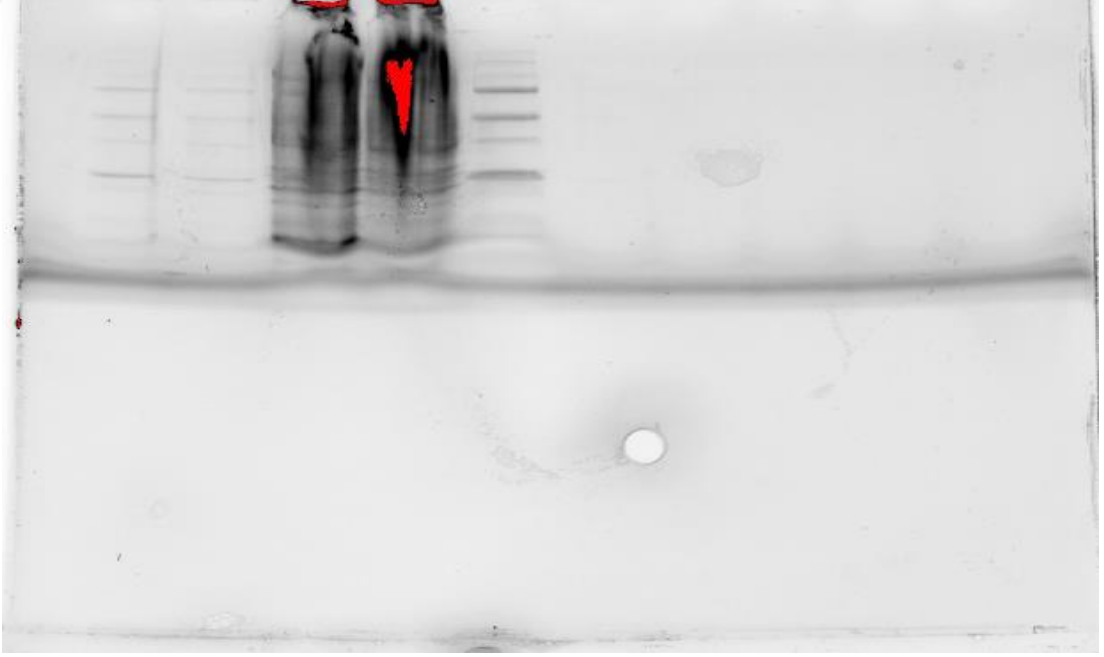
Şekil 4.10. SDS-Page yürütme sonucunda protein bandı ilk deneyde, en düşük 18kd ve en yüksek 24kd büyüklüğünde çıktı.

- Deney-2; SDS-Page kuyucuklarına daha iyi görüntü sağlanması için birer kuyucuk aralıklarla sırasıyla 1.kuyucuk boş bırakıldı, 2. Kuyucuğa 5µl Precision Plus Protein All Blue Standarts konuldu. 3. Kuyucuk boş, 4.kuyucuğa 17µl *E. coli* TOP10, 5. Kuyucuk boş, 6. kuyucuğa 17µl *E. coli* BL21(DE3), 7. Kuyucuk boş 8.kuyucuğa yine 5µl Precision Plus Protein All Blue Standarts konuldu.
- 140V'da 20dk yürütme yapıldı.
- Jel görüntüleme sistemiyle görüntüsü alındı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. SDS-Page yürütme sonucunda protein bandı 2. Deneyde en düşük 18kd ve en yüksek 24kd büyüklüğünde gözlemlendi.

- Deney-2' de protein bandı yırtıldığı için görüntü için 3. bir deney yapıldı.
- Deney-3; Bu denemede görüntü daha net çıksın diye standart daha fazla konuldu, *E. coli* TOP10 ve *E. coli* BL21(DE3) miktarları azaltıldı. 1.kuyucuk boş bırakıldı, 2.kuyucuğa, 15µl Precision Plus Protein All Blue Standarts konuldu, 3.kuyucuğa 10µl *E. coli* TOP10, 4.kuyucuğa 10µl *E. coli* BL21(DE3) ve 5.kuyucuğa 15µl Precision Plus Protein All Blue Standarts konuldu.
- 150V'da 11dk yürütme yapıldı.
- Jel görüntüleme sistemiyle görüntüsü alındı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. SDS-Page yürütme sonucunda protein bandı 3. Deneyde en düşük 18kd ve en yüksek 24kd büyüklüğünde gözlemlendi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Mitojenik bir polipeptit olan temel FGF başlangıçta sığır beyinindeki hipofiz bezinden tanımlanmıştır (Emoto vd., 1989). Sınırlı kaynak mevcudiyeti, izolasyon zorluğu ve büyük miktarlarda bFGF talebi, bu büyüme faktörünün yüksek düzeyde ekspresyonu ve saflaştırılmasından dolayı talep edilmektedir ve doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi ve kök hücre araştırması gibi farklı uygulamalar için gereklidir (Villanueva vd., 2014; Ma vd., 2014). Bir rekombinant bFGF'nin üretilmesi için, *E. coli*, *bacillus subtilis*, *pichia pastoris*, soya fasulyesi tohumları, ipekböceği (*bombyx mori L*) ve pirinç tohumları gibi çeşitli konaklar kullanılmıştır (Wu vd., 2001; Mu vd., 2008).

Bu çalışmada, FGF-2 rekombinant proteininin yüksek saflıkta ve miktarda üretimi için biyoinformatik çalışmalarla tasarlanan literatürde yer almayan yeni bir gen profili *E. coli* ekspresyon sistemi için kullanılmıştır. Bu sistem, maliyet etkinliği, zaman tasarrufu, kolay kültür, hızlı büyüme ve rekombinant proteinin kolay geri kazanımı dahil üzere heterolog bir rekombinant protein ifade ederken çeşitli avantajlar sunmaktadır (Broedel vd., 2001).

Bu tez çalışmasında FGF-2'nin çözünürlüğünü arttırmak için pET-32a (+) ekspresyon vektörü sisteminde bir Trx etiketi birlikte kullanılmıştır. Ayrıca Trx ve FGF-2 kodlama dizisi arasında, afinite kromatografisi ile tespit ve hızlı saflaştırma için S. Tag kullanılmıştır. S. Tag sistem, her ikisi de RNaz A'dan türetilen 15aa S. Tag ve 103aa S-proteini arasındaki güçlü etkileşime dayanmakta ve yeniden oluşturulmuş ribonükleolitik aktivite ile sonuçlanmaktadır. Çalışmada; Trx ve FGF-2 proteinini ayıran enterokinaz bölünme bölgesi (DDDDK) kullanılarak, FGF-2 proteininin füzyon proteininden enterokinaz sindirimi yoluyla geri kazanılmasında sağlanmıştır.

Soleyman ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmalarda, en iyi ortamın seçilmesi için rekombinant FGF-2' nin üretkenliğini, farklı inkübasyon sıcaklıklarında Rekombinant *E. coli* BL21 hücreleri ile farklı besiyerlerinde üretim yapmışlardır. Bu tez çalışmasına benzer şekilde en iyi inkübasyon sıcaklığının 37 °C'de olduğunu ortaya koymuşlardır. TB ve LB ortamının yeast extract, tripton, pepton

ve fosfatları yüksek üretkenlik sağlar, aynı zamanda karbon kaynağı takviyesi ve bir fosfat tamponu olarak gliserol kullanımını olumsuz pH değişikliklerini azaltır (Collins vd., 2013). Novagen (1999) protokolüne göre ise, pET sistemindeki hedef DNA' ların ifadesi için uygun büyüme ortamları; M9, M9ZB, LB suyu ve TB besiyeri ortamlarının olduğu belirtilmiştir (Şekil 2.19). Bu tez çalışmasında kullanılan TB besiyerinin, LB besiyerinden daha iyi üretim potansiyeline sahip olduğu tesbit edilmiştir.

Gasparian ve arkadaşları (2009), bu tez çalışmasından farklı olarak *BglIII* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri kullanmışlardır. *E. coli* suşu BL21 (DE3), DNA pET-32a / FGF-2 plazmidiyle dönüştürülmüştür ve bakteriler LB ve TB besiyeri ortamında büyütülüp, toplanıp, SDS-Page yapılmıştır. Füzyon protein olarak sadece Trx kullanılmış ve SDS-Page yapılmış, poliakrilamid jeli üzerinde sadece yaklaşık 17 kd'luk bir bant görünmesine neden olmuştur. Bu tez çalışmasında ise Trx ve ek olarak S. Tag füzyon proteinleri, ayrıca DDDDK ve (Gly<sub>4</sub> Se<sub>2</sub>) kullanılmıştır. FGF-2 proteini, PCR ile indüklendiğinde ve SDS-Page analizi sonucu üretim potansiyeli açısından 24kd boyutunda bant görüntüsü elde edilmiştir.

Bu tez çalışması sonucunda yeni gen profiline sahip ulusal düzeyde ticari olarak üretimi gerçekleştirilecek, patent alınabilecek, yüksek saflıkta ve verimde rekombinant FGF-2 proteini üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu proteini üretim yöntemi daha sonra yapılabilecek farklı rekombinat protein üretim yöntemlerinin geliştirilmesi açısından temel oluşturması ve üretilen proteinin sağlık, biyomedikal ve kozmetik alanlarda kullanılabilmesi tez çalışmasının önemini artırmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC., 1986. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*. 1;233(4763):545–548.
- Akman, M., 1983. Bakteri Genetiği. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını No:8,1-12, 337-371s, Sivas.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, Fourth Edition, Garland Science, 91(3): 401, New York.
- Anderluh, G, Gokce, I and Lakey, J. H., 2003. Expression proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. *Protein Expression and Purification* 28, 173-181.
- Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H, Prats AC., 1999. A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol* 19:505-514.
- Baird A, Schubert D, Ling N, Guillemin R., 1988. Receptor-and heparin-binding domains of basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2324–2328.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F. 1986., *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed. McGraw Hill. New York.
- Bakırcı ÇM., 2012. Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) nedir? Faydaları ve zararları nelerdir? GDO hakkında bilimsel gerçekler. <http://evrimagaci.org/article/tr/genetigi-degistirilmis-organizmalar-gdo-nedir-faydalari-ve-zararlari-nelerdir-gdo-hakkinda-bilimsel-gercekler>.
- Balderas Hernández VE, Paz Maldonado LMT, Medina Rivero E, Barba de la Rosa AP, Ordoñez Acevedo LG, De León Rodríguez A., 2008. Optimization of human interferon gamma production in *Escherichia coli* by response surface methodology. *Biotechnol Bioproc Engin.* 13(1):7–13. doi: 10.1007/s12257-007-0126-5.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB., 1997. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.*18(1):26–45.
- Bloom, V.M., Freyer, G.A. and Micklos, D.A., 1996. *Laboratory DNA Science*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC.

- Broedel S, Papciak SM, Jones WR., 2001. The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in *E. coli*. Athena Enzyme Systems . Technic Bull. **2**(1)
- Brown, S.T., K. Martin and A. K. Graves, 2003. Molecular basis of inner ear induction. *Curr Top Dev Biol* 57; 115-149.
- Bugler B, Amalric F, Prats H1991 Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol* 11:573–577.
- Burçak, G.C., 2002. Hormonların Genel Özellikleri İnsan Biyokimyası, Nobel Kitabevi, 345s, Ankara.
- Christopher A Voigt, A Levskaya, AA Chevalier, JJ Tabor, ZB Simpson, LA Lavery, M Levy, EA. Davidson, AS. Scouras, AD. Ellington, EM. Marcotte, 2005. Engineering *Escherichia coli* to see ligh. 438 (7067), 441.
- Collins T, Azevedo-Silva J, da Costa A, Branca F, Machado R, Casal M., 2013. Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimisation. *Microb Cell Fact.* 12:21. doi: 10.1186/1475-2859-12-21.
- Connelly PR, Varadarajan R, Sturtevant JM, Richards FM.,1990.Thermodynamics of protein-peptide interactions in the ribonuclease S system studied by titration calorimetry. *Biochemistry* 29:6108–6114.
- Cooper TF., 2007. Recombination speeds adaptation by reducing competition between beneficial mutations in populations of *Escherichia coli*. *PLOS Biology.* 2007;5:1899–1905. doi: 10.1371/journal.pbio.0050225.
- Cooper, Geoffrey M., and Robert E. Hausman, 2004. *The Cell: A Molecular Approach*. Third Edition, ASM Press, 713p., Washington, D.C.
- Çalık, P., 1998. Serin Alkali Proteaz Enzimi Üretimi için Biyoproses Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Çarhan A., Ercan E., Yalçınkaya T., 2016. Dijital PZR ve kullanım alanları. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 73(2): 183 -198.
- Demirtaş H., 1996. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ders Notları, Erciyes Üniversitesi Yayınları, 463s., Kayseri.
- Emoto N, Gonzalez AM, Walicke PA, Wada E, Simmons DM, Shimasaki S, et al., 1989. Basic fibroblast growth factor (FGF) in the central nervous system: identification of specific loci of basic FGF expression in the rat brain. *Growth Factors.* 2(1):21–9.

- Escherich, T. (1885). Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglinge. Fortschritte der Medizin, 3, 515-522.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2005;16(2):139-149.
- Feige JJ, Baird A, 1989. Basic fibroblast growth factor is a substrate for protein phosphorylation and is phosphorylated by capillary endothelial cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 86:3174-3178.
- Fernandez-Rodriguez et al., 2017. Engineering RGB color vision into *Escherichia coli*, Nature Chemical Biology 13, 706-708.
- Florkiewicz RZ, Sommer A 1989 Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. Proc Natl Acad Sci USA 86:3978-3981.
- Glazer, A. N. And Nikaido, H. 1995. Microbial biotechnology: Fundamentals Of Applied Biotechnology, W.H. Freeman And Company, USA.
- Goldfarb, M., 2005. Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. Cytokine Growth Factor Rev 16(2); 215-220.
- Gospodarowicz, D., Cheng, J., Lui, G.M., Baird, A., Bohlen, P. 1984. Isolation by heparin-sepharose affinity chromatography of brain fibroblast growth factor: Identity with pituitary fibroblast growth factor, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA ), 81, 6963-69671.
- Güneş H.V., 2003. Moleküler Hücre Biyolojisi, Kaan Kitabevi, 493s., İstanbul.
- Hanahan, D., 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. DNA cloning, A Practical Approach. IRL. Press Inc., Oxford. D.M.Glover (1):121-127.
- Hannig G. and Makrides SC., 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*, Trends Biotechnol, 16, 54-60
- Hughes SS., 2001. Making dollars out of DNA. The First Major Patent in biotechnology and the commercialization of molecular biology, 1974-1980. Isis., 92(3): 541-75.
- Itoh, N., 2007. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. Biol Pharm Bull 30(10); 1819- 1825.
- Itoh, N. and D. M. Ornitz, 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. Trends Genet 20(11); 563-569.

- Jackson D, Symons R, Berg P., 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into dna of simian virus 40: circular sv40 dna molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of escherichia coli. Proc Natl Acad Sci, 69(10): 2904-2909.
- Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. Biochimica et Biophysica Acta. 1992;1135(2):185-199.
- Jugder BE, Welch J, Braidy N, Marquis CP., 2016. Construction and use of a Cupriavidus necator H16 soluble hydrogenase promoter (PSH) fusion to gfp (green fluorescentprotein) PeerJ. 4:e2269. doi:10.7717/peerj.2269.
- Kahya S., Buyukcangaz E., Carlı K.T., 2013. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med. 32, 1: 31-38.
- Kalender, N. 2000. Serin alkali proteaz geni *subC Bacillus* plasmidlerine klonlanarak rekombinant biyokatalizör ile alkali proteaz üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Kane JF., 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol. 6(5):494-500.
- Karpeisky MY, Senchenko VN, Dianova MV, Kanevsky V ., 1994 Formation and properties of S-protein complex with S-peptidecontaining fusion protein. FEBS Lett 339:209-212.
- Kasap H., 2010. Tıbbi Biyoloji ve Genetik, Nobel Yayınevi,468s., İstanbul.
- Katartaş Z., 2011. Rekombinant DNA teknolojisi ile ilaç üretimi. Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji, Doktora Tezi, 102s, Kayseri.
- Kelemen BR, Klink TA, Behlke MA, Eubanks SR, Leland PA, Raines RT., 1999. Hypersensitive substrate for ribonucleases. Nucleic Acids Res 27:3696-3701.
- Kim JS, Raines RT., 1994. A misfolded but active dimer of bovine seminal ribonuclease. Eur J Biochem 224:109-114.
- Kiper M. 2013. Biyoteknoloji sektörle inovasyon sistemi kavramlar dünyadan örnekler türkiye’de durum ve çıkarımlar, Baskı Afşar Matbaacılık. Yayınno: TTGV-T/2013/001. Ankara.
- Klug William S., Cummings Michael R., Charlotte Spencer,. Palladino Michael, 2003. Concepts of Genetics. Pearson Education, 896p.



- Klagsbrun M, Smith S, Sullivan R, Shing Y, Davidson S, Smith JA, Sasse J., 1987. Multiple forms of basic fibroblast growth factor: amino-terminal cleavages by tumor cell- and brain cell-derived acidic proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1839–1843.
- Kurland C, Gallant J.,1996. Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol.* 7(5):489–93.
- Ladisch MR, Kohlmann KL. 1992. Recombinant human insülin. *Biotechnol. Prog.*, 8:469-478.
- Lawrence WT, Diegelmann RF.,1994. Growth Factors in Wound Healing. *Clinics Palme in Dermatology*, 12:157-169.
- Lellouch AC, Geremia RA., 1999. Expression and study of recombinant ExoM, a beta1–4 glucosyltransferase involved in succinoglycan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 181:1141–1148
- Ma F, Xiao Z, Chen B, Hou X, Han J, Zhao Y, et al., 2014. Accelerating proliferation of neural stem/progenitor cells in collagen sponges immobilized with engineered basic fibroblast growth factor for nervous system tissue engineering. *Biomacromolecules* 15(3):1062-8.doi:10.1021/ bm500062 n.
- McAllister WT., 1993. Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity). *Cell. Mol. Biol. Res.* 39 (4), s. 385–91.
- McKay, I. A. 1993. Types of growth factor activity: detection and characterization of new growth factor activities McKay, I., Leigh, I. (derleyenler), *Growth factors; A practical Approach*, New York, Oxford University Press, s. 1.
- McNulty DE, Claffee BA, Huddleston MJ, Porter ML, Cavnar KM, Kane JF. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2003;27(2):365– 74.
- Mignatti, P., T. Morimoto and D. B. Rifkin, 1992. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol* 151(1); 81-93.
- Miyakawa, K., K. Hatsuzawa, T. Kurokawa, M. Asada, T. Kuroiwa and T. Imamura, 1999. A hydrophobic region locating at the center of fibroblast growth factor-9 is crucial for its secretion. *J Biol Chem* 274(41); 29352-29357.

- Mu X, Kong N, Chen W, Zhang T, Shen M, Yan W., 2008. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human basic fibroblast growth factor in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 59(2):282–8. doi: 10.1016/j.pep.2008.02.009.
- Mullis KB., 1990. Recombinant DNA technology and molecular cloning. *Scientific disease. Annu Rev Cell Dev Biol* 20; 781-810.
- Nascimento Heloisa H., Silva Lucas EP., Souza Renata T., Silva Neusa P., Scaletsky Isabel CA., 2014. Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. *MC Microbiology* volume 14, Article number: 184 (2014)
- Neşe Atabey, Ersan Kalay, Meral Sakızlı, 2006. Hücre, Moleküler Yaklaşım. İzmir Tıp Kitabevi, 832s., İzmir.
- Nugent MA, Iozzo RV., 2000. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 32(2):115–20.
- Okada-Ban, M., Thiery, J.P., Jouanneau, J., 2000. Fibroblast growth factor-2, *IJBCB* 32(3):263-7.
- Prats H, Kaghad H, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Presta M, Rusnati M, Maier JA, Ragnotti G., 1988. Purification of basic fibroblast growth factor in the rat brain: identification of a Mr 22,000 immunoreactive form. *Biochem Biophys Res Commun* 155:1161–1172.
- Quarto N, Finger FP, Rifkin DB., 1991. The NH<sub>2</sub>-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal. *J Cell Physiol* 147:311–318.
- Raggett, E.M., Gokce, I., Hong, Q., Virden, R., Cooper, A., Lakey, J.H., 2000. The Tola recognition site of colicin N: ITC SPR and stopped flow fluorescence defines a crucial 27 residue segment'. *Journal of Molecular Biology* 304 (4), 621-632
- Revest, J. M., L. DeMoerlooze and C. Dickson, 2000. Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J Biol Chem* 275(11); 8083-8090.
- Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T., 1989. *In vitro* Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Chapter 14 .USA.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Schmidt, Thomas G.M., Koepke, Jürgen Frank, Ronald; Skerra, Arne, 1996. Molecular Interaction Between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target, Streptavidin. *Journal of Molecular Biology*. 255 (5): 753–66.
- Schmidt, Thomas G.M.; Koepke, Jürgen; Frank, Ronald; Skerra, Arne, 1996. Molecular Interaction Between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target, Streptavidin. *Journal of Molecular Biology*. 255 (5): 753–66.
- Shulman Stanford T., Herbert C. Friedmann, Ronald H. Sims, 2007. *Clinical Infectious Diseases*, Oxford Pages 1025–1029, 1673, İngiltere.
- Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci*. 2009;18(5):936–48. doi: 10.1002/pro.102.
- Smith, Wood, 1991. *Molecular Biology and Biotechnology*, Chapman and Hall Limited, Hong Kong.
- Soleyman M. R., M. Khalili, B. Khansarinejad and M. Baazm, 2016. High-level Expression and Purification of Active Human FGF-2 in *Escherichia coli* by Codon and Culture Condition Optimization. *Iran Red Crescent Med J*, 18(2):e21615.
- Sorensen HP, Mortensen KK., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 115(2):113–28.
- Sorensen, H.P., Laursen, B.S., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U., 2002. Bacterial Translation Initiation–Mechanism and regulation. *Recent Res. Dev. Biophys. Biochem*. 2, 243–270.
- Soydemir E, Aksoy ZB. 2017. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı. *Güncel Gastroenteroloji* 21(1): 14-17.
- Srivastava P, Bhattacharaya P, Pandey G, Mukherjee KJ., 2005. Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 41(2):313–22.
- Sultuybek G, Ulutin T ve Sayhan N. *Rekombinant DNA Teknolojisi ve Tıpta Kullanımı*, 1995, İstanbul.
- Temizkan G, Arda N., 2004. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Genetik Yayıncılık, 437s, Ankara.
- Thisse, B. and C. Thisse, 2005. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev Biol* 287(2); 390-402.

- Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(2):116–129
- Ulutin., 2017. Rekombinant DNA teknolojisi. Erişim Adresi: <http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/turgut-ulutin/rec-DNA-t.pdf>. Erişim Tarihi: 24.05.2017.
- Vallejo LF., 2004. Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact*. 3(1):11. doi: 10.1186/1475-2859-3-11.
- Villanueva S, Contreras F, Tapia A, Carreno JE, Vergara C, Ewertz E, et al., 2014. Basic fibroblast growth factor reduces functional and structural damage in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 306(4):F430–41. doi: 10.1152/ajprenal.00720.2012.
- William S. Klug , Michael R. Cummings , Charlotte A. Spencer , Charlotte A., 2003. Resktirksiyon-enzimleri-siniflandilmasi-cesitleri-ve-kesme, 764 s.
- Wu X, Kamei K, Sato H, Sato SI, Takano R, Ichida M, et al., 2001. High-level expression of human acidic fibroblast growth factor and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. *Protein Expr Purif*. 21(1):192–200. doi: 10.1006/prep.2000.1358.
- Yurdusev N. 2002. Hayvancılık ve Veteriner Hekimlikte Gen Teknolojileri ve Biyoteknoloji, Avrasya Dosyası, Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri Özel, Sonbahar, 8(3): 77-89.
- Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC1991 Three-dimensional structure of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251:90–93.
- Zimmer C. *Microcosm*. 2008. New York: Pantheon Books, [[Google Scholar](#)].

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlem KÜRKÇÜ  
Dogum Yeri ve Yılı : İstanbul - 1983  
Medeni Hali : Evli  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : yl1530150506@sdu.edu.tr

## Eğitim Durumu

Lise : İstanbul Nişantaşı Nuri Akın Lisesi, 2002  
Önlisan : Mersin Üniversitesi, Teknik Meslek Yüksekokulu, Kimya  
Teknikerliği, 2006  
Lisans : Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,  
Çevre Mühendisliği, 2014  
Yüksek Lisans : SDÜ, İş Sağlığı ve Güvenliği, 2018