

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

REKOMBİNANT İNSAN İNTERFERON GAMA PEPTİDİNİN BAKTERİ EKSPRESYON
SİSTEMLERİ KULLANARAK ÜRETİMİ

Pelin KOLÇAK

Mayıs

2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

PROGRAMINIZI YAZINIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

REKOMBİNANT İNSAN İNTERFERON GAMA PEPTİDİNİN BAKTERİ EKSPRESYON
SİSTEMLERİ KULLANARAK ÜRETİMİ

Pelin KOLÇAK

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

Mayıs

2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Yüksek Lisans Öğrencisinin Adı Soyadı

Pelin KOLÇAK

İmzası

ONAY

Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN danışmanlığında Pelin KOLÇAK tarafından hazırlanan bu çalışma 22/05/2105 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

REKOMBİNANT İNSAN İNTERFERON GAMA PEPTİDİNİN BAKTERİ EKSPRESYON SİSTEMLERİ KULLANARAK ÜRETİMİ

Pelin KOLÇAK

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

İnterferon gama (IFN- γ), hücre-içi bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı ve tümör kontrolünde doğuştan ve kazanılmış bağışık yanıtta oldukça etkili olan aynı zamanda bağışık yanıtı düzenleyici fonksiyonları bulunan tip-2 interferon sınıfında yer alan sitokindir. Bu sitokin ağırlıklı olarak bağışık yanıt hücreleri olan NK hücreleri, T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlar üzerindeki düzenleyici etkisi ile bilinmektedir. Özellikle IFN- γ pozitif geri bildirim mekanizmasıyla Th0 hücrelerinin Th1'e farklılaşmasını destekleyerek kendi salınımını artırmaktadır. Bu durum IFN- γ nın bağışık yanıt düzenleyici özelliği ile kilit bir molekül olduğunu göstermektedir. IFN- γ ile yapılan sayısız klinik çalışmalarda kanser, tüberküloz, kronik granülomatoz ve osteopetrosis tedavisinde oldukça etkili bir terapötik ajan olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, IFN- γ nın terapötik ajan olarak kullanımındaki olumlu etkileri göz önünde bulundurulduğunda bakteri üretici sistemleri kullanılarak endüstrinin talep ettiği bu ve benzeri rekombinant protein üretim süreçlerinin iyileştirilmesi ve kaliteli rekombinant peptid üretimi hedeflenmiştir. Bu amaçla, üretimi hedeflenen insan İnterferon Gama geninin tüm sekansını kodlayan vektörler oluşturulmuştur. Bu vektörler aracılığıyla elimizde bulunan prokaryotik üretici sistem; *Escherichia coli* K12-JM109 ve BL21 (DE3) ile hedef protein üretimi istatistiksel deneysel yaklaşım olan deney tasarım yöntemleriyle kapsamlı

alışmalar yapılmış ve saflaştırma yöntemleri optimize edilmiştir. Son olarak, prokaryotik üretici sistemden elde edilip saflaştırılan rekombinant insan IFN- γ proteini etkinlik deneyi amacıyla IFN- γ ile muamele edilmiş SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanarak süpernatantlardaki C1q dzeyeleri sandviç ELISA tekniği ile tayin edilmiş aynı zamanda MTT testi uygulanmıştır.

2015, 140 sayfa

Anahtar kelimeler: İnterferon Gama, rekombinant protein üretimi, bakteri ekspresyon sistemleri.

ABSTRACT

EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN INTERFERON GAMMA IN BACTERIAL EXPRESSION SYSTEMS

Pelin KOLÇAK

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

Interferon- γ (IFN- γ) is the only member of type II class interferon with antimicrobial, immunoregulatory and anti-tumor activities during innate and adaptive immune response. This cytokine has well known promoting effect on NK cells, T-cells, B-cells and macrophages. IFN- γ favor Th1 differentiation from un differentiated Th0 cells, which in turn cause more IFN- γ secretion in a positive feedback manner.

IFN- γ has been shown to be a key immunoregulatory molecule. There are numerous studies that IFN- γ has been used in various clinical indications including cancer, tuberculosis, hepatitis, chronic granulomatous disease, osteopetrosis, scleroderma as an effective therapeutic agent.

In this study, when considering IFN- γ positive effects in the use as therapeutic agents we aim to improve recombinant protein production processes and produce quality recombinant protein demanded in the bio-tech/pharmaceutical industry by the use of bacterial expression systems. For this purpose, we design and construct an expression plasmid encoding full coding sequence of IFN- γ and optimize the expression and purification conditions. In order to determine optimized protein production in *Escherichia coli* K12-JM109 and BL21 (DE3) as a prokaryotic expression system and purification techniques the experimental design techniques are applied.

We conduct activity assay in IFN- γ treated SH-SY5Y human neuroblast cell line. After collecting culture supernatant, C1q level is measured by using sandwich ELISA (also called direct ELISA). Also MTT assay is used for the detection of healthy cells and the measure of metabolic activity.

2015, 140 pages

Keywords: Interferon Gamma, recombinant protein production, bacterial expression systems.

TEŞEKKÜR

Bana yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir desteğini esirgemeyen ve mikrobiyolojiye adım atmamı sağlayan ve beni en iyi şekilde yetiştiren, akademik dünyaya giriş yapmama önyak olup bana her türlü desteği sağlayan, her zaman sabırla ve mizahla yaklaşan, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN'e,

Yüksek lisans eğitimimin tez aşamasında bana çok büyük yardımları dokunan ve ne kadar teşekkür etsem az olan Doç. Dr. Ayşe Başak ENGİN'e,

2210-C Öncelikli Aalanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında yüksek lisans eğitimimde sağladığı maddi destek için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu – Bilim İnsanları Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK - BİDEB)

Yüksek lisans eğitimimde tanıştığım, ancak ömür boyu yanımda olmasını arzu ettiğim, çalışmalarımda bana her zaman yardımcı olan ve 2C Biyoteknoloji gibi güzel bir şirkette birlikte çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum mükemmel dostum Ceren CAN'a,

Hayatıma güzellik ve sevinç katan sevgili dostlarım Zeynep ÇAKAR, Burak AVCI ve Burak CAN'a,

Benim iyi bir eğitim ve hayata sahip olabilmem için benden hiçbir desteğini esirgemeyen ve hayatta sahip olabileceğim en değerli varlıklar olan sevgili babam Turgay KOLÇAK'a, sevgili annem Suzan KOLÇAK'a, biricik ablam Selin KOLÇAK'a ve dünyanın en mükemmel papağanı Çiko'ya,

Ve, teşekkür etmeye asla sayfaların yetmeyeceği, beni her daim gülümseten biricik erkek arkadaşım Göktuğ BEZCİ'ye teşekkürü borç bilirim.

Pelin KOLÇAK

Ankara 2015

• İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	i
ONAY.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
1.GİRİŞ.....	1
2.KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1.İnterferon Sitokin Ailesi.....	4
2.1.1.İnterferon gama gen yapısı ve lokalizasyonu.....	4
2.1.2.İnterferon gama reseptör sistemi ve sinyal iletim mekanizması.....	5
2.1.3.İmmün sistemin gelişimi ve farklılaşmasında interferon gama etkileri.....	7
2.1.3.1.B-hücreleri.....	7
2.1.3.2.T-hücreleri.....	8
2.1.3.3.Monosit / makrofajlar.....	11
2.1.3.4.Doğal öldürücü hücreler.....	13
2.1.3.5.Hematopoetik öncül hücreler.....	13
2.1.3.6.Polimorfonükleer nötrofiller.....	14
2.2.Rekombinant Protein Üretimi.....	16
2.2.1.Protein modifikasyonlarının rekombinant proteinler üzerine etkileri.....	17
2.2.1.1.Endoplazmik retikulum modifikasyonları.....	19
2.2.1.2.Golgi aygıtı modifikasyonları.....	21
2.2.1.3.Hücre dışı modifikasyonlar.....	24
2.2.2.Rekombinant protein üretici sistemler ve klonlama ve vektör seçimi.....	25
2.2.2.1.Rekombinant protein üretici sistemler.....	25
2.2.2.2.Klonlama ve vektör seçimi.....	31

2.2.2.3. Protein saflaştırma yöntemleri.....	37
2.3. Deney Tasarımı.....	39
2.3.1. Plackett-Burman tasarımı.....	40
2.3.2. Box-Behnken tasarımı.....	41
3. GEREKÇE VE AMAÇ.....	43
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	46
4.1. Materyal.....	46
4.1.1. Bakteri suşları ve plazmit.....	46
4.1.2. Tampon ve çözeltiler.....	47
4.1.2.1. Bakteri kültür ortamı, besiyerleri.....	47
4.1.2.2. Nükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması.....	51
4.1.2.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.....	53
4.1.2.4. Transformasyon çözeltileri.....	54
4.1.2.5. Poliakrilamid jel elektroforezinde ve sonrasında kullanılan tamponlar.....	55
4.1.2.6. Western blot yönteminde kullanılan tampon ve çözeltiler.....	57
4.1.2.7. Protein ekstraksiyon tamponları.....	61
4.1.2.8. Protein saflaştırma tampon ve çözeltileri.....	62
4.1.2.9. Protein miktar tayininde kullanılan çözeltiler.....	63
4.1.2.10. Hücre kültüründe kullanılan hücre hattı ve besiyeri.....	64
4.1.2.11. Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) analizinde kullanılan çözeltiler.....	66
4.2. Yöntem.....	67
4.2.1. Cam ve plastik malzemelerin ve çalışılacak alanın hazırlanması.....	67
4.2.2. Mikrobiyolojik yöntemler.....	67
4.2.2.1. Kültürlerin hazırlanması.....	67
4.2.2.2. Kültürlerin stoklanması.....	67
4.2.3. U937 ve NK 3.3 hücre hatlarının ko-kültürü ve indüksiyonu.....	68
4.2.4. Nükleik asit izolasyonları ve kalite kontrolleri.....	68
4.2.4.1. U937 ve NK 3.3 ko-kültür hücrelerinden Trizol ile RNA izolasyonu.....	68
4.2.4.2. Alkalen lizis yöntemi (mini/midi prep).....	70

4.2.4.3.Spektrofotometrik ölçüm.....	71
4.2.4.4.Agaroz jel elektroforezi.....	72
4.2.5.Moleküler klonlama yöntemleri.....	73
4.2.5.1.Moleküler klonlama.....	73
4.2.5.2.cDNA eldesi (ters transkripsiyon).....	73
4.2.5.3.Polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR/PZT).....	76
4.2.5.4.Restriksiyon endonükleazlarla kesim.....	79
4.2.5.5.Ürünlerin saflaştırılması.....	80
4.2.5.6.Ligasyon.....	82
4.2.6.İnterferon gama dizi analizi.....	83
4.2.7.Bakteriyel transformasyon.....	85
4.2.8.İnterferon gama üretiminde gerçekleştirilen deney tasarımı.....	87
4.2.9. Bakteriyel protein ekspresyonu ve kontrolü.....	87
4.2.10.Ekspresyon suşlarının üreme eğrilerinin belirlenmesi.....	88
4.2.11.Poliakrilamid jel elektroforezi.....	89
4.2.12.Protein izolasyonu ve saflaştırılması.....	90
4.2.12.1.Protein izolasyonu.....	90
4.2.12.2.Protein saflaştırması.....	91
4.2.13.Hücre kültürlerinin hazırlanması ve stoklanması.....	92
4.2.13.1.Hücrelerin çözülmesi ve kültürü.....	92
4.2.13.2.Hücre pasajlama/tazeleme ve stoklanması.....	93
4.2.14.Rekombinant interferon gama etkinlik ölçümü.....	93
5.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	96
5.1.Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyonu, Komplementer DNA eldesi ve Doğrulanması.....	96
5.2.IFN-γ Geni Eldesi, Klonlanması ve Klonlamanın Doğrulanması.....	98
5.3.IFN-γ'nın Bakteriyel Ekspresyon Analizi.....	104
5.4.Protein İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	115
5.5.Protein Üretiminin Doğrulanması ve Miktar Tayini.....	117
5.6.Rekombinant İnterferon Gama Etkinlik Sonuçları.....	118

6.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	119
6.1.Sonuç.....	123
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>125</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>131</u>
Ek 1 Tez Deneylerinde Kullanılan Malzemeler.....	131
Ek 2 Tez Deneylerinde Kullanılan Enzimler ve Kitler.....	133
Ek 3 Tez Deneylerinde Kullanılan Laboratuvar Cihazı ve Gereçleri.....	134
Ek 4 Tez Deneylerinde Kullanılan R-Kodları.....	136
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>138</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnterferon gama reseptör yapısı.....	6
Şekil 2.2. Post-translasyon çeşitleri.....	25
Şekil 2.3. Hücre-içi protein üretimi.....	27
Şekil 2.4. Birinci dereceden polinamiyal denklem.....	41
Şekil 2.5. İkinci derecede polinamiyal denklem.....	42
Şekil 4.1. pET-28a vektörü.....	47
Şekil 4.2. SDS-Page analizinde kullanılan inek süt tozu moleküler belirteç.....	90
Şekil 5.1. IFN- γ gen dizisi.....	96
Şekil 5.2. Total RNA miktarı.....	97
Şekil 5.3. Beta aktin PZT % 2'lik TAE agaroz jel görüntüsü MB: moleküler belirteç 1: Beta aktin.....	98
Şekil 5.4. IFN- γ gradient PZT % 1.5 TAE agaroz jel görüntüsü. İlk kuyuda 60°C'den başlayıp artan sıcaklıklarla 12. kuyuda 67°C'ye ulaşılmıştır. MB: moleküler belirteç 1: 60°C 2: 64°C (optimal bağlanma sıcaklığı) 3: 67°C derecelerini göstermektedir.....	99
Şekil 5.5. IFN- γ inen (touch down) PZT %1.5'luk jel görüntüsü MB: moleküler belirteç 1,2,3,4,5 :IFN- γ geni görüntüsünü göstermektedir.....	100
Şekil 5.6. Guanidin ile saflaştırılmış IFN- γ PZT ürünü % 1.5'luk agaroz jel görüntüsü MB: moleküler belirteç 1, 2 ve 3: saf IFN- γ PZT ürünü göstermektedir.....	101
Şekil 5.7. PEG ile saflaştırılmış pET28a plazmit vektörü 1 ve 2 numaraları saf pET28a vektörünü göstermektedir.....	101
Şekil 5.8. Moleküler klonlamada restriksiyon endonükleaz ile kesim kontrolü 1:kesilmemiş pET28a 2: EcoRI ile kesilmiş pET28a 3:NheI ile kesilmiş pET28a göstermektedir.....	102
Şekil 5.9. Klonlama sonrası T7 primerleriyle koloni tarama PZT'si %2'lik agaroz jel görüntüsü MB: moleküler belirteç 1:7 numaralı koloni 2:12 numaralı koloni göstermektedir.....	103
Şekil 5.10. Ekspresyon sonrası SDS-PAGE ile taranan koloniler B: belirteç 1, 2, 3, 4 numaraları boş pET28a içerikli BL21 hücrelerini ve 5, 6, 7, 8 numaraları IFN- γ içerikli pET28a içeren BL21/7-1 hücrelerini göstermektedir.....	105
Şekil 5.11. Ekspresyon sonrası SDS-PAGE ile taranan koloniler B: belirteç 1, 2, 3, 4 numaraları boş IFN- γ içerikli pET28a içeren BL21/7-2 ve 5, 6, 7, 8 numaraları IFN- γ içerikli pET28a içeren BL21/12 hücrelerini göstermektedir.....	105

Şekil 5.12. BL21 37°C' üreme eğrisi grafiği ve optimal indükleme zamanı ve bulanıklığı	106
Şekil 5.13. Plackett-Burman deney tasarımı matrisi ile elde edilen IFN- γ ifadenme yanıtlarının SDS-PAGE ile incelenmesi. B: belirteç 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 : deney sırasını göstermektedir.	108
Şekil 5.14. Plackett-Burman deney tasarımı matrisi ile elde edilen IFN- γ ifadenme yanıtlarının SDS-PAGE ile incelenmesi. B: belirteç 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 : deney sırasını göstermektedir.	108
Şekil 5.15. Plackett-Burman tasarımı protein üretiminde faktörlerin etkileşim grafiği.	111
Şekil 5.16. Box-Behnken deney tasarımı matrisi ile elde edilen IFN- γ ifadenme yanıtlarının SDS-PAGE ile incelenmesi. B: belirteç 2, 3, 12, 11, 7, 5, 8, 1 : deney sırasını göstermektedir.	113
Şekil 5.17. Box-Behnken deney tasarımı matrisi ile elde edilen IFN- γ ifadenme yanıtlarının SDS-PAGE ile incelenmesi. B: belirteç 6, 9, 4, 13, 10 : deney sırasını göstermektedir.	113
Şekil 5.18. Yanıt yüzeyi metodu (RSM) analiz sonuçları.	115
Şekil 5.19. İnterferon Gama afinite kromatografi saflaştırma sonuç grafiği.	116
Şekil 5.20. Rekombinant İnterferon Gama'nın kromatografik saflaştırması sonrası fraksiyonların %16 SDS-PAGE jel görüntüsü. B: belirteç 1: yeşil floresans protein (GFP) 2: protein çözeltisi 3: saf İnterferon Gama 4: tutunamayan hedef dışı proteinler (flow through) göstermektedir.	116
Şekil 5.21. Box-Behnken analizi ile saptanmış optimal üretim koşulları ile üretilen interferon gama western sonucu. 1: GFP 2: protein çözeltisi 3-5: tutunamayan hedef dışı proteinler (flow through) 4: saf interferon gama göstermektedir.	117
Şekil 5.22. Bradford standart proteinlerin absorpsiyon değeri grafiği.	117

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Plazmit vektörler tarafından taşınan bazı replikonlar.....	33
Çizelge 4.1. LB sıvı besiyeri içeriği.....	48
Çizelge 4.2. LB katı besiyeri içeriği.....	48
Çizelge 4.3. LB-kanamisinli katı besiyeri içeriği.....	49
Çizelge 4.4. SOC besiyeri içeriği.....	50
Çizelge 4.5. Bakteri ekspresyon besiyeri içeriği.....	50
Çizelge 4.6. Alkalen lizis I çözeltisinin içeriği.....	51
Çizelge 4.7. Alkalen lizis II çözeltisi içeriği.....	51
Çizelge 4.8. Alkalen lizis III çözeltisi içeriği.....	52
Çizelge 4.9. Guanidin bazlı saflaştırma tamponu.....	52
Çizelge 4.10. Seçici nükleik asit saflaştırması.....	52
Çizelge 4.11. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon stok çözeltileri.....	53
Çizelge 4.12. Bakteri transformasyonunda kullanılan TSS içeriği ve hazırlanışı.....	54
Çizelge 4.13. Yürütme jelinin içeriği.....	55
Çizelge 4.14. Hizalama jelinin içeriği.....	55
Çizelge 4.15. Örnek yükleme çözeltisinin içeriği.....	56
Çizelge 4.16. Poliakrilamid jel elektroforez tamponu.....	56
Çizelge 4.17. PBS içeriği.....	57
Çizelge 4.18. Transfer tampon 10X stok çözeltisi.....	57
Çizelge 4.19. Transfer tampon 1X içeriği.....	57
Çizelge 4.20. TBS 10X stok çözeltisi.....	58
Çizelge 4.21. TBST 1X içeriği.....	58
Çizelge 4.22. Bloklama solüsyonu içeriği.....	58
Çizelge 4.23. Primer antikör içeriği.....	58
Çizelge 4.24. Sekonder antikör içeriği.....	59
Çizelge 4.25. Visiglo plus ile boyama.....	59
Çizelge 4.26. Jel fiksasyon çözeltisi içeriği.....	59

Çizelge 4.27. Ponceau S boyasının içeriği.....	60
Çizelge 4.28. Commasie boyasının içeriği.....	60
Çizelge 4.29. Bakteriyel protein ekstraksiyon çözeltisi.....	61
Çizelge 4.30. Kromotografi bağlanma tamponu.....	62
Çizelge 4.31. Kromotografi elüsyon tamponu.....	62
Çizelge 4.32. PEG protein çöktürme çözeltisi.....	63
Çizelge 4.33. Saf bakteriyel protein çözme çözeltisi.....	63
Çizelge 4.34. Bradford 1X tampon.....	63
Çizelge 4.35. Standartlar.....	64
Çizelge 4.36. U937 ve NK 3.3 hücre hattı besiyeri içeriği.....	65
Çizelge 4.37. SH-SY5Y hücre hattı besiyeri içeriği.....	65
Çizelge 4.38. MTT çözeltisi içeriği.....	66
Çizelge 4.39. MTT çözücüsü içeriği.....	66
Çizelge 4.40. Ters Transkripsiyon Protokolü.....	74
Çizelge 4.41. Ters Transkripsiyon Sıcaklık Döngüsü.....	75
Çizelge 4.42. Beta Aktin PZT.....	75
Çizelge 4.43. Beta Aktin PZT Sıcaklık Döngüsü.....	76
Çizelge 4.44. Tez Deneylerin Kullanılan Primerler ve Bağlanma Sıcaklıkları.....	77
Çizelge 4.45. Genel PZT protokolü.....	78
Çizelge 4.46. Genel PZT Sıcaklık döngüsü.....	78
Çizelge 4.47. Genel İnen (Touch-Down) PZT Sıcaklık Döngüsü.....	79
Çizelge 4.48. NheI ve EcoRI Restriksiyon Endonükleaz ile Kesim Tepkimesi.....	80
Çizelge 4.49. Ligasyon.....	83
Çizelge 4.50. DTCS PZT protokolü.....	85
Çizelge 4.51. DTCS çöktürme süspansiyonu.....	85
Çizelge 4.52. IFN- γ dilüsyon.....	95
Çizelge 5.1. Plackett-Burman IFN- γ üretimi deney koşulları.....	107
Çizelge 5.2. Plackett-Burman deney tasarım matriksi denemeleri hücre lizatlarının SDS-PAGE protein bant profilleri.....	109

Çizelge 5.3. Plackett-Burman analizinde faktörlerin tahmin edilen regresyon katsayılarına ait bilgiler.....	110
Çizelge 5.4. Box-Behnken IFN- γ üretimi deney koşulları.....	112
Çizelge 5.5. Box-Behnken deney tasarım matrisi denemeleri hücre lizatlarının SDS-PAGE protein bant profilleri.....	114

SİMGELER DİZİNİ

-f	İleri primer
-r	Geri primer
A	Adenin
α	Alfa
amp	Amper
APS	Amonyum persülfat
Asn	Asparajin
Asn-Hya	Beta-hidroksiasparajin
Asp	Aspartat
Asp-Hyn	Beta-hidroksiaspartat
ATP	Adenozin trifosfat
B	Süt tozu belirteçi
BBM	Box Behnken tasarımı
bç	Baz çifti
β	Beta
BSA	Sığır serum albumin
C	Sitozin
CCD	Merkez kompozit tasarım
cDNA	Komplementer DNA
CHO	Çin hamster yumurtalık

CSF	Koloni stimüle edici faktör
CTL	Sitotoksik T lenfosit
ddNTP	Dideoksiribonükleotit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	DNA parçalayıcı enzim
dNTP	Deoksiribonükleotit
ϵ	Epsilon
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
fmol	Fikomol
G	Guanin
γ	Gama
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
GFP	Yeşil floresans protein
Gla	Gama-karboksiglutamat
Glu	Glutamat
H ₂ O	Su
H ₂ PO ₄	Dihidrojen fosfat
ICAM	Bağımlı hücreler arası adezyon molekülü
IFN	İnterferon

Ig	İmmünoglobülin
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IPTG	İzopropil β -D-1-thiogalaktopiranozit
IU	İnternasyonal ünite
JAK	Jenus ailesi kinazlar
KCl	Potasyum Klorür
kDA	Kilodalton
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
LB	Luria Bertani besiyeri (Luria's Broth)
LGL	Büyük granüler lenfosit
LPS	Lipopolisakkarit
lt	Litre
M	Molarite
mA	Miliamper
MB	Moleküler belirteç
mg	Miligram
MgCl_2	Magnezyum klorür
MgSO_4	Magnezyum sülfat
MHC	Majör histokompatibilite kompleks
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA

NaCl	Sodyum klorür
Na ₂ SO ₄	Sodyum sülfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
ng	Nanogram
NK	Doğal öldürücü hücreler
nm	Nanomolar
NO	Azot oksit
°C	Santigrad derece
OD	Optik yoğunluk
ori	Replikasyon orijini
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PB	Plackett Burman
PBS	Fosfat tamponlayıcı tuz (buffered saline)
PEG	Polietilen glikol
pH	Hidrojenin gücü-asitlik (Power of hydrogen)
PMN	Polimorfonükleer nötrofiller
pmol	Pikomol
RPM	Çalkalama hızı (devir/dk)
PTM	Post-translasyonel modifikasyon
PZT/PCR	Polimeraz zincirleme (chain) tepkimesi (reaction)
RNA	Ribonükleik asit

RNAP	RNA polimeraz
RNaz	RNA parçalayıcı enzim
RSM	Yanıt yüzeyi analiz metodu
s	Saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOB	Super optimal broth
SOC	Katabolit baskılayıcı SOB
STAT	Trankripsiyon sinyalleri ve aktivatörleri
T	Timin
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borik asit- EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamin
TGF	Transforme edici faktor
Th	Yardımcı T lenfosit
TNF	Tümör nekrozis faktör
t-RNA	Taşıyıcı RNA
TSS	Transformasyon çözeltisi
TT	Ters transkripsiyon
U/u	Ünite
V	Volt
%	Yüzde

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
xG	Göreceli santrifüj ivmesi
[x]	X konsantrasyonu

1. GİRİŞ

Modern biyoteknoloji, bilişim teknolojileri ve nanoteknoloji ile birlikte, dünyada temel ileri teknoloji alanları içerisinde görülen ve ekonomik ve sosyal yansımalarının çok önemli boyutlara ulaşacağı düşünülen bir olgu olarak hayatımızda gitgide artan bir yer tutarken, bu olgunun doğru anlaşılması hatta doğru “yönetilmesi” her geçen gün zaruri bir hale gelmektedir. Bununla birlikte günümüzde biyoteknolojinin sağlık sektöründe geniş bir yer kapsadığı gerçeği oldukça önemli bir olgu haline gelmiştir.

Sağlık teknolojileri ciddi bilgi ve yatırım gerektiren ve ağır/kompleks regülasyon kısıtlamaları olan alanlar olduğundan pazar hakimiyeti çoğunlukla büyük ve çok uluslu firmaların tekelinde bulunmaktadır. Özellikle Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde terapötik protein pazarının tamamıyla ithal ürünlerden oluşması çok ciddi bir maddi yük oluşturmaktadır. Ülkemizde rekombinant insan proteini üretimi konusundaki eksiklikler göz önünde bulundurulduğunda rekombinant proteinlerin üretim süreçlerinin araştırılması ve geliştirilmesi zaruri hale gelmiştir.

Sağlık teknolojilerini de kapsayan modern biyoteknolojinin en önemli konularından birisi de proteinlerdir. Proteinler hemen hemen her alanda kullanıldıkları için başlıca öneme sahiptirler. Bu sebepten dolayı bu moleküllerin elde edilmesi ayrı bir önem taşımaktadır. Çoğu protein doğal kaynaklardan saflaştırılmaya ve elde edilmeye çalışılmaktadır; ancak, bu yöntemler çoğu zaman beklenen verim vermemekte, kullanılan yöntem işe yaramamakta ve çalışana maliyet ve zaman kaybı olarak geri dönebilmektedir (1). Bu proteinlerin rekombinant şekilde üretilmeleri, proteinlerin doğal kaynaklardan elde edilmesine alternatif yol olarak gösterilebilmektedir.

Rekombinant protein üretiminde yirminci yüzyıl, geleneksel biyoteknolojinin modern biyoteknolojiye dönüştüğü özellikle tedavi edici ajan olarak kullanılan terapötik proteinlerin rekombinant DNA teknolojisine dayalı olarak bakteri ve maya gibi taşıyıcı hücrelerde üretilebildiği bir yüzyıl olmuştur. 1982 yılında, ilk kez insülinin üretimi ile başlayan bu ilaç pazarına daha sonra interferon-alfa, interferon-gama ve eritropoietin gibi birçok terapötik rekombinant protein katılmıştır (2,3). Bunların içinde özellikle interferon gama ve alfa gibi tıpta tedavi amaçlı kullanılan proteinlerin

rekombinant olarak çok miktarda ve aynı zamanda kaliteli üretim aşamalarının optimizasyonu çok büyük bir önem arz etmektedir.

İlk kez 1954 yılında Isaac ve Lindenmann tarafından viral replikasyonu engelleyici ajanlar olarak keşfedilen interferonlar günümüzde rekombinant protein üretim teknikleri yardımıyla antiproliferatif, antiviral ve bağışık yanıt düzenleyici etkileri sebebiyle tıpta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (4). İnterferonlar, antiviral aktiviteleri olan olanğanüstü bir protein grubudur. Başlangıçta salgılandıkları hücre tipine göre sınıflandırılan bu protein grubu daha sonra sekans homolojileri ve reseptör özgülükleri dikkate alındığında tip 1 alfa/beta (α/β) ve tip 2 gama (γ) olarak sınıflandırılmaktadır. Yıllar boyunca yapılan çalışmalarda interferonların antiviral etkilerine ek olarak hücre farklılaşmasının indüklenmesi, bazı hücre tiplerindeki proliferasyonun inhibisyonu, anjiyogenezin önlenmesi ve bağışık sistemini düzenleyici fonksiyonlarının varlığı gösterilmiştir. Bu etkiler içerisinde MHC-I ve MHC-II moleküllerinin ekspresyon düzeylerindeki artışlar ve doğal öldürücü hücrelerin aktivitelerinin çoğaltılması bulunmaktadır. Ekspresyon düzeyi artmış MHC-I molekülleri sitotoksik T lenfositlerinde dahil olduğu CD8+ hücrelerine antijen sunumunu artırmaktadır. Bu artırılmış antijen sunumu sitotoksik T lenfositlerini indükleyen antijen sunucu hücreleri daha etkili kılmakla kalmaz aynı zamanda antijenleri sitotoksik T lenfositler için daha iyi bir hedef haline getirir. Bu etkilere sahip olan tip-2 sınıfına ait insan interferon gama, 12. kromozomun uzun (q) kolunda lokalize olan 19.3 kDa büyüklüğünde glikoproteinlerin en büyük sınıfı içerisinde yer alan bir sitokindir. Bu proteinin ağırlıklı olarak doğal bağışık yanıtın bir parçası olan CD4+ Tip-1 yardımcı T (Th1) lenfositler ve CD8+ sitotoksik T (CTL) lenfositler tarafından üretildiği bilinmektedir. IFN- γ makrofaj ve dendritik hücreler gibi antijen sunucu hücre tiplerinde MHC-II moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Hücreler bu şekilde antijenleri yardımcı T lenfositlere daha etkili bir şekilde sunarlar (5,6).

IFN- γ ile yapılan klinik çalışmalarda kronik granülomatöz hastalıklarda IFN- γ 'nın tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda IFN- γ 'nın osteopetrozis tedavisinde oldukça etkili bir terapötik ajan olduğu bilinmektedir. Bu amaçla IFN- γ proteininin rekombinant olarak üretim süreçlerinin geliştirilmesi,

endüstrinin talep ettiği bu ve benzeri ilaç olarak kullanılabilir fonksiyonel peptitlerin üretim süreçlerinin iyileştirilmesinde ve yeterli miktarda kaliteli peptit üretimine katkısı olacaktır.

Hücre-içi bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda ve tümör kontrolünde doğuştan ve kazanılmış bağışıklık sisteminde kritik rol oynadığı görülen insan interferon gama (hIFN- γ) veya tip-2 interferonun rekombinant DNA teknoloji yöntemiyle saf ve bol miktarda üretilmektedir (7). Bu amaçla bu tez çalışmasında üretimi hedeflenen IFN- γ proteinini kodlayan gen izole edilmiş ve uygun ekspresyon vektörlerine klonlanmıştır. Aktif rekombinant insan interferon gama proteini üretimi amacıyla bu proteini kodlayan genin klonlandığı vektör, prokaryotik ekspresyon sistemi olan; *Escherichia coli* K12-JM109 ve BL21 (DE3) suşunda üretimi gerçekleştirmesi ve artırması amacıyla tasarlanmıştır. Bu nedenle bu çalışmanın insan rekombinant interferon gama üretimine farklı bir yaklaşım getireceği düşünülmektedir.

Ülkemizde rekombinant insan proteini üretimi konusundaki çalışmaların azlığı düşünüldüğünde rekombinant insan IFN- γ üretimi büyük önem arz etmektedir. İlaç olarak kullanılabilir fonksiyonel rekombinant insan interferon gama prototip çalışmalarıyla elde edilen teknolojik birikim ve deneyim sayesinde bu ve benzeri terapötik rekombinant proteinlerin bakteri üretici sistemleri kullanarak büyük miktarlarda ve ucuz olarak üretilip maliyetleri azaltmak hedeflenmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasıyla elde edilecek veriler, ilaç olarak kullanılabilir fonksiyonel peptitlerin üretim süreçlerinin iyileştirilmesinde ve kısa zamanda yeterli miktarda kaliteli insan peptit üretiminde aydınlatıcı olacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. İnterferon Sitokin Ailesi

İnterferonlar, tümör nekrozis faktör (TNF), kemokinler, transforme edici faktor (TGF) ve koloni stimüle edici faktörün (CSF) yer aldığı 6 temel sitokin ailesinden biridir (8,9). Sitokinler, bağışıklık sisteminin düzenleyici aynı zamanda enfeksiyonlara karşı doğuştan ve sonradan kazanılmış bağışık yanıtı yönetebilen küçük çözünür proteinleridir. Bu küçük mesaj iletici moleküller doğuştan kazanılmış bağışık yanıt hücreleri olan makrofajlardan sonradan kazanılmış bağışık yanıtın bir parçası olan lenfositlere kadar birçok farklı hücre tipinden üretilirler.

1957 yılında Isaac ve Lindemann (10) tarafından ilk kez keşfedilen interferonlar, omurgalı canlılarda biyolojik cevabın düzenlenmesi amacıyla üretilen glikoprotein yapısındaki sitokinlerdir. Günümüzde rekombinant olarak üretimi gerçekleştirilen interferonlar tıpta özellikle antiviral ve bağışık yanıt düzenleyici etkileri sebebiyle kullanılmaktadır. Bağışık yanıtta anahtar bir role sahip olan interferonlar sekans homolojileri ve özgül reseptörlerine göre tip-1 alfa-beta (α - β) ve tip-2 gama (γ) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Tip-1 sınıfında bulunan interferonlar protein yapısında olup interferon alfa (INF- α) ve interferon beta (INF- β)'dan oluşmaktadır. Bu sınıftaki proteinler daha çok antiviral etkileri ile bilinmektedir. Tip-2 sınıfında ise interferon gama (INF- γ) adında tek bir üyesi bulunmaktadır. INF- γ antiviral ve tümör oluşumuna karşı etkileri dışında daha çok bağışık yanıt düzenleyici etkileri ile bilinmektedir. Bu sebepten tip-2 interferonlar immün düzenleyici reaksiyonlarda daha etkili şekilde bulunmaktadırlar (8,11,12).

2.1.1. İnterferon gama gen yapısı ve lokalizasyonu

Tip-2 interferon olarak bilinen INF- γ tek kopya sayılı geni insanda kromozom 12, farede kromozom 10'da yerleşim göstermektedir (5). Dört ekzon ve üç introndan oluşan oldukça korunmuş INF- γ gen yapısı ilk kez Gray ve Goeddel tarafından bulunmuştur (13). İnsan, fare gibi birçok canlıdan klonlanan INF- γ cDNA'sı veya genomik DNA yaklaşık 1.2 kb uzunluğundadır. İnsan INF- γ proteini 23 amino asitlik

hidrofobik sinyal sekansı olmak üzere 166 amino asitten oluşmaktadır (5,14). Yapısal formu globüler olan homodimer IFN- γ proteini yüzeyde yerleşim gösteren Asn-25 ve Asn-97 bölgelerinde N-bağlı glikan zincirleri içermektedir. IFN- γ Asn-25 bölgesinden glikozillenmesi proteinin proteaz direnci üzerinde oldukça etkilidir. Yapılan çalışmalarda glikozillenmeyen IFN- γ (*Escherichia coli*) proteinin yarı ömrünü etkileyen granülosit proteaz, elastaz, katapsin-G ve plazmin yıkımına karşı hassasiyet göstermesi dışında rekombinant proteinin atasal proteine göre fonksiyonel olarak farklılık göstermediği görülmüştür (14).

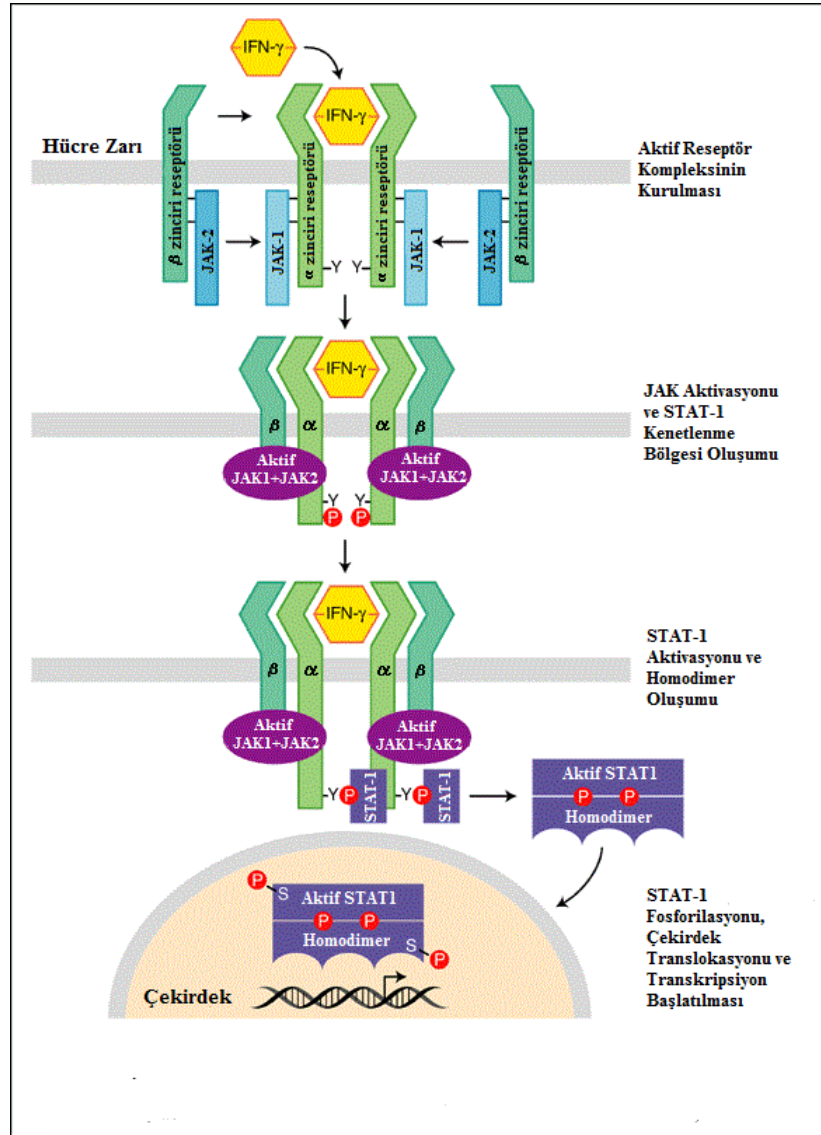
2.1.2. İnterferon gama reseptör sistemi ve sinyal iletim mekanizması

Viral ve mikrobik enfeksiyonlara cevap olarak 12. kromozomdaki genler tarafından kodlanan IFN- γ immün düzenleyici reaksiyonlardaki etkileri hedef hücrelerdeki özgül reseptörlerine bağlanarak hedef genlerdeki transkripsiyon artışı veya inhibe edilmesi ile olmaktadır (15). İnterferon ile uyarılmış bu hedef genler interferonların bağışık yanıtındaki etkilerini düzenlerler. Hedef genlerin IFN ile uyarımı Janus ailesi kinazları (JAK) ve transkripsiyon sinyal iletilci ve aktivatörleri (STAT=signal transducer and activator) adında iki protein ailesi ile olmaktadır. Bu iki protein ailesi interferon reseptörleri aracılığıyla aldıkları sinyali hücre çekirdeğine taşıyarak hedef genlerin transkripsiyonunda değişikliğe yol açarlar.

Sinyal iletiminde Jak-Stat yolunu kullanan interferonlar özgül reseptörlerine bağlandığında tirozin kinazların aktifleşmesine sebep olurlar. Tirozin kinazlar Jak adı verilen kinazlar ile etkileşerek Jak' ların Stat proteinlerini fosfatlamasını sağlarlar. Fosfatlanarak aktivite olmuş Stat proteinleri dimer yapısı oluşturarak çekirdeğe gider ve hedef genlerde transkripsiyon değişikliğine neden olurlar.

İnterferonların kendi özgül yanıtlarını oluşturmaları hücrelerdeki reseptörlerine bağlanmaları ile gerçekleşmektedir. Tip-2 sınıfına ait olan IFN- γ diğer interferonlar gibi sınıf-2 sitokin reseptör ailesini kullanmaktadır. İnterferonlar temelde aynı reseptör ailesini kullanmalarına rağmen sınıf-2 reseptörlerin birçok özel alt tipi bulunduğundan IFN- γ için farklı bir reseptör yapısı tanımlanmıştır (15,6).

IFN- γ işlevsel reseptör kompleksi iki adet IFN γ -R1 (alfa zinciri) ve iki adet IFN γ -R2 (beta zinciri) transmembran polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Reseptörün aktivite olabilmesi ve biyolojik yanıt oluşturabilmesi için her iki zincirin (α/β) bir arada bulunması gerekmektedir. Sinyal iletiminin temelini oluşturan bu reseptör yapısının α zinciri ligandı bağlarken β zinciri işlevsel reseptör yapısının oluşmasını ve sinyal iletilmesini sağlar (15). Özgül reseptörüne bağlanan IFN- γ sinyal iletimi için diğer interferonlara göre farklı Jak-Stat moleküllerini kullanmaktadır.



Şekil 2.1. İnterferon gama reseptör yapısı

IFN- γ Jak-Stat yolunda genelde Jak2 molekülünü kullanmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda sinyal iletimi için Jak2 aktivasyonunun şart olmadığı görülmüştür (15,6).

IFN- γ Jak ailesinin herhangi bir üyesini de kinazlarla birlikte Stat molekülünü fosfatlamak için kullanabilmektedir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi IFN- γ sinyal iletimi amacıyla reseptörüne bağlandığında reseptörde konformasyonel olarak değişiklik meydana gelir. Bu değişiklik sonucunda aktif olmayan Jak2 molekülü otoposforilasyon sonucunda aktifleşir ve Jak1 molekülünün transforforilasyonunu sağlar. Aktivite olan Jak1 molekülü böylece her bir IFN γ -R1 zincirindeki kritik tirozin bölgelerini fosfatlar ve Stat1 α molekülünün reseptörden ayrılmasına neden olur. DNA'ya bağlanan protein yapısındaki Stat1 α molekülleri homodimer yapısı oluşturarak çekirdeğe gider ve promotordaki IFN- γ cevabını güçlendiren gama aktifleşmiş bölgeye (GAS= gamma activated sequence) bağlanarak hedef genleri çoğunlukla interferon düzenleyici faktör 1 (IRF-1) gibi transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonunu baskılar veya başlatır (16,17).

IFN- γ ilk keşfinden bu yana rekombinant protein üretim yolları kullanılarak tıpta yaygın şekilde üretilmektedir. Özellikle bağışık yanıtta antiviral, antiproliferatif ve tümör oluşumuna karşı etkileri dışında immün sistemde yer alan diğer hücreler ile etkileşimi immün yanıtın düzenlenmesinde ve etkili bir yanıt oluşturarak hastalıklarla mücadeledeki rolünün önemini açıklamaktadır.

2.1.3. İmmün sistemin gelişimi ve farklılaşmasında interferon gama etkileri

2.1.3.1. B-hücreleri

B hücresi humoral bağışık yanıtın önemli lenfositlerinden biridir. B hücreleri antijene bağlanabilecek özgül reseptör proteinler içermektedir. Kan ve lenfotik dolaşımında bulunan naif B hücreleri antijenle karşılaştığında yardımcı T hücresinden aldığı ilave sinyal yardımıyla da antikor üretecek olan plazma ve daha sonra antijenle tekrar karşılaştığında hızlı bir yanıt oluşmasını sağlayan bellek B hücrelerine farklılaşırlar. B hücre cevabının olgunlaşması ve artması esasen sitokinler aracılığı ile olmaktadır (18).

Bağışık yanıtta önemli etkileri bulunan interferon gama sitokininin B hücreleri üzerinde çeşitli etkileri olduğu bilinmektedir. Bunlardan en önemlisi plazma hücrelerinde sınıf

değişikliklerini etkilemeleridir. Plazma hücrelerinden üretilen antikorlar geniş çeşitliliğe sahip efektör molekül olma özellikleri dışında antijenlere karşı özgül bağlama bölgeleri içerirler. Antikorların özgül antijenlerine karşı olan bu özellikleri antijen bağlama bölgesinde bulunan sabit (C=constant) ve değişken (V=variable) kısımlar ile olmaktadır. Ancak bu antikorların efektör fonksiyonları ağır zincirde bulunan sabit bölgenin izotipine göre belirlenir. Bu izotip değişikliği ise efektör CD4 T hücreleri tarafından salınan sitokinler tarafından yönlendirilmektedir (8). Yapılan araştırmalarda, IFN- γ immünoglobülin çeşitlerinden IgG1 ve IgE üretimini baskılarken IgG2a, IgG3 ve IgA2 sentezini kuvvetlendirdiği görülmüştür (12,5,18). Bu kuvvetlendirme IFN- γ 'nın direk olarak sınıf değişikliğine neden olan bir ajan olarak nitelendirilmesine sebebiyet vermiştir. Ancak Bossie ve Vietta (19)'nın yaptığı çalışmalarda IFN- γ sitokinin yalnızca bu izotip öncüllerinin miktarını düzenlediği görülmüştür. Bu sebepten direk olarak sınıf değişikliğine neden olmamaktadır.

IFN- γ , B hücrelerinde IgE izotip oluşumunu baskılaması, interlökin 4 (IL-4) ile indüklenen epsilon (ϵ) eşey hücre öncüllerinin transkripsiyonunu baskılaması sonucu olmaktadır. Hiper IgE sendromu olan hastalarda, IFN- γ üretiminde azlık gözlenirken bu hastalara uygulanan IFN- γ terapisi ile hastaların kan dolaşımında bulunan IgE miktarının azalması sağlanmıştır. Bu çalışmalar IFN- γ üretimindeki eksikliklerin immünoglobülin alt tiplerinin üretiminde dengesizliklere sebebiyet vereceğini göstermektedir.

IFN- γ 'nın B hücrelerindeki bir diğer önemli etkisi ise in-vitro koşullarda öncül B hücre gelişimi üzerinde negatif etkileri bulunmaktadır. Ancak IFN- γ , B hücre lenfositik lösemi hücre kültüründe kurtarıcı bir faktör olarak iş görmektedir (5). Sonuç olarak, erken B hücre popülasyonu üzerinde negatif etkileri bulunurken olgun B hücrelerinde antiapoptatik etki gözlenmektedir.

2.1.3.2. T-hücreleri

T hücreleri, IFN- γ üretici hücre olma özellikleri dışında gelişimleri ve farklılaşmalarında IFN- γ 'dan oldukça etkilenmektedir. Özellikle IFN- γ ve IL-4 moleküllerinin farklı ifade düzeyleri CD4+ T hücre fenotipinin belirlenmesinde

etkileyicidir (5).

Hücre içi organizmalar makrofaj gibi taşıyıcı hücrelerin doğuştan kazanılmış bağışıklıkta varolan öldürme mekanizmalarını yıkarak kurtulma stratejisi geliştirmişlerdir. Humoral antikorların erişemeyeceği bu organizmalar taşıyıcı hücrenin içinde bulunmaktadır. Virüsler gibi birçok zorunlu hücre içi parazit replike olabilmek amacıyla hücre içinde bulunmak zorundadır. Bunlar dışında zorunlu hücre-içi paraziti olmayan mikobakteri (*Mycobacteriaceae*) ve *Leishmania* gibi özellikle makrofaj hücrelerinde bulunan fakültatif hücre içi parazitler hücrede replike olabilirler (18). Bu yaşam stratejisi organizmaların bağışık yanıtı karşı geliştirdiği bir yöntemdir. Bu duruma karşı bağışık yanıt organizmalar ile başa çıkmak amacıyla taşıyıcı hücrelerde meydana gelen ve organizmaların engel olamadıkları bir savunma stratejisiyle mikroorganizmaların küçük antijenik fragmentlerini işler ve bu fragmentler taşıyıcı hücre yüzeyinde çeşitli adaptör moleküller aracılığıyla sunulur. Sonuçta farklı lenfosit alt popülasyonları kullanılarak özgül bağışık yanıt oluşturulur. Lenfositler hücre içi organizmalara karşı özelleşmiş hücrelerdir. Özellikle T lenfositler, B hücreleri tarafından üretilen antikorlardan farklı olarak antijen ve yüzey belirteçlerini tanımaktadır. Bu hücreler majör histokompatibilite kompleks (MHC) olarak bilinmektedir. Bu şekilde dentritik hücre ve makrofaj gibi profesyonel antijen sunucu hücrelerde antijenin MHC molekülleri aracılığıyla sunumuyla T lenfositler aktive edilir (8,18).

T lenfositler MHC-1 veya MHC-2 moleküllerini tanıyarak efektör bir yanıt oluşmasını sağlarlar. İki sınıfa ayrılan bu MHC molekülleri hücrelerde farklı şekilde ifade edilebilir. Sınıf 1 MHC molekülleri genellikle virüs gibi patojenlerin peptitlerini bu peptitlere özelleşmiş olan CD8 sitotoksik T hücrelerine sunarlar. Tam tersi, CD4 T hücreleri ise bağışıklık sisteminin diğer efektör hücrelerini aktive etmek amacıyla sınıf 2 MHC moleküllerini tanırlar. Bu yüzden sınıf 2 MHC molekülleri B lenfositlerde, dentritik hücrelerde ve makrofajlarda bulunmaktadır. CD4 T hücreleri B hücrelerinde bulunan sınıf 2 MHC moleküllerini tanıdığı anda bu hücrelerin antikor üretmeleri amacıyla aktive olmalarını sağlarken makrofaj yüzeyindeki MHC molekülünü tanıdıklarında patojeni yoketmek amacıyla makrofajların aktive

olmalarını sağlarlar (18). Sınıf 1 ve 2 MHC moleküllerinin ifadeleri özellikle IFN gibi sitokinler tarafından düzenlenmektedir. IFN- γ sınıf 1 ve 2 MHC moleküllerinin ifadelerini arttırır ve sınıf 2 MHC moleküllerinin normalde indüklenmediği belli hücre tiplerinde ifadelenmesini indükleyebilmektedir (8).

T lenfositlerin alt populasyonu olan yardımcı T lenfositler farklı sitokin salgılama fenotiplerine sahip olan Th1 ve Th2 adında iki ana gruba ayrılmaktadır. Enfeksiyonun erken dönemlerinde oluşan sitokinler, T hücrelerinin işlevsel olarak farklılaşmasını sağlamaktadır (8,18). CD4 T hücreleri iki majör sınıfı olan CD4 efektör T hücrelerine farklılaşması periferal lenfoid dokulardaki antijenler tarafından olmaktadır. CD4 T hücresinin kazanılmış bağışık yanıtta Th1 hücresi olup makrofaj aktivasyonu yönünde mi yoksa Th2 hücresi olup antikor üretimi yönünde mi farklılaşacağı belirlenir. Yapılan in-vitro denemelerde farklılaşmamış CD4 T hücrelerinin interlökin 12 (IL-12) ve IFN- γ varlığında Th1 oluşumuna meyilli olduğu ve IFN- γ 'nın Th2 hücre proliferasyonunu engellediği görülmüştür. Aynı şekilde IL-4 sitokini ise Th2 üretimini sağlamaktadır (5). Özellikle kritik birçok hastalık durumunda ve tedavisinde bu iki efektör populasyon arasındaki hassas dengenin sağlanması büyük önem oluşturmaktadır. Bu durum biyolojik olarak IFN- γ sitokini üreten Th1 hücrelerini makrofajlarda bulunan virüslerden ve organizmalardan kaynaklanan hücre içi enfeksiyonlara karşı daha etkili kılmaktadır.

IFN- γ , Th1 hücrelerinden esas olarak üretilen sitokin olarak 200'den fazla genin RNA ifade düzeylerini etkilemektedir. CD4 Th1 hücrelerinin, CD8 sitotoksik lenfositlerin, NK hücrelerinin aktivasyonuna ve regülasyonuna dahil genlerin ifadeleri IFN- γ tarafından düzenlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, Th1 hücrelerinde konakçı yanıtının hücre içi patojenlere karşı kordine edildiği gözlenmiştir (20). Makrofaj aktivasyonu CD40 ligandı ifadeleyen ve IFN- γ salgılayan Th1 hücreleri tarafından olmaktadır. IFN- γ ve CD40 ligandı güçlü bir savunma sistemi olmasına karşın etkin bir bağışık yanıt oluşturmada Th1 tarafından salgılanan diğer sitokinlerde kritik rol oluşturmaktadır. Örneğin, hücre içi bakteriler tarafından enfekte olmuş makrofajlar aktivite olma yeteneklerini kaybettikleri için aktivite Th1 hücreleri Fas ligand ifade etmektedirler. Böylece makrofajların da dahil olduğu Fas ifadeleyebilen sınırlı

sayıdaki hücreler parçalanmaktadır. Bu şekilde Th1 hücre içi organizmalara karşı daha etki olurken Th2 hücreleri B hücrelerine yardımda daha fazla etkilidir (8). Buna ek olarak, bu hücrelerin IL-4 aracılı B hücre sınıf değişikliklerinde oluşan IgE antikorlarına, interlökin 5 (IL-5) ile indüklenmiş eozinofillere ve interlökin 3/4 (IL-3/4) ile stimüle olmuş mast hücrelerinin proliferasyonuna karşı hassasiyet gösteren parazitlere karşı savunmada oldukça etkili oldukları bilinmektedir. Bu sebepten patojenik bir protozoan olan *Leishmania* ile enfekte olmuş farelerde yapılan çalışmalarda, IFN- γ mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ifade düzeylerinde artış gözlenirken IL-4 düzeylerinde azalma gözlenmektedir (18).

IFN- γ timusta T-hücrelerinin kolonal seçiliminde ve self-toleransında yardımcı etki mekanizmasının oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bu yüzden anti-CD3 stimülasyonu gibi durumlarda T-hücre apoptozuna sebebiyet vermektedir. Yapılan çalışmalarda, kültür ortamında IL-2 sitokini eklendiğinde IFN- γ etkisinin baskılandığı ve IFN- γ 'nın mitojen-aktivite T-hücrelerinde IL-2 reseptör ifade düzeylerini arttırdığı gözlenmiştir

2.1.3.3. Monosit / makrofajlar

Makrofajlar, mononükleer fagositik sistemin efektör hücresi olarak kemik iliğinde hematopoez sırasında granülosit-monosit öncül hücrelerinin pro-monositlere farklılaşması sonucu bu hücrelerin kan dolaşımına katılarak monositlere dönüşmesi ardından monositlerin uygun dokulara giderek makrofajlara farklılaşması sonucu oluşmaktadır.

Monositlerin makrofajlara farklılaşması beraberinde birçok radikal değişiklik meydana getirmektedir. Bu değişiklikler, hücre boyutunun 5-10 kat artması, hücre-içi organellerin sayısının artmasıyla birlikte hücrenin kompleks bir hal kazanmasıdır. Bunun sonucunda hücrenin fagositoz yapabilme yeteneğinin artması ve yüksek miktarda hidrolitik enzim üretme yeteneği kazanması en önemli değişikliklerden biri sayılabilir. Bu gibi özellikler kazanmış makrofajlar bağışık yanıt sırasında oluşan çeşitli stimüle edici ajanlar tarafından aktivite edilebilir. Makrofajlar her ne kadar antijenleri fagosit edebilme yeteneğine sahip olsalar bile bağışık yanıtın tam anlamıyla oluşabilmesi amacıyla aktivite edilerek güçlendirilmeleri gerekmektedir

(12).

Bağışık yanıtta makrofajların en önemli aktivite edici faktörü interferon gama (IFN- γ) olarak bilinmektedir. İnterferon gama (IFN- γ) bağışıklık sisteminde yer alan mononükleer fagositik sistem efektör hücrelerinin bir parçası olan monosit/makrofajlar üzerinde önemli etkilere sahiptir. Aktivite olmuş yardımcı T lenfositlerden (Th) salınan IFN- γ sitokininin makrofajların fonksiyonu üzerindeki etkileri içinde makrofajların tümör sitotoksitelerinin, antimikrobiyal aktivitelerinin artması ve MHC indüksiyonu ile birlikte lenfositlere antijen işleminin ve sunumunun sağlanması bulunmaktadır (5). Özellikle IFN- γ yardımıyla aktivite olmuş makrofajlar, dinlenme halindeki makrofajlara göre daha iyi patojenleri ortadan kaldırma yeteneğine sahiptirler. Bu durumun en önemli sebebi aktivite olmuş makrofajların fagositoz yapabilme yeteneklerinin ve inflamatuvar mediyatörleri salgılamalarının artışıyla açıklanabilir. Aktifleşmiş makrofajlar ek olarak T hücreleri aktivite edebilme yeteneği kazanmaktadır (5).

IFN- γ gen düzeyine yalnız makrofajların değil bir çok hücre hattının potansiyel indükleyicisidir. Özellikle sınıf 1 ve 2 MHC antijenleri, IL-2 reseptörü, kompleman proteinleri, indolamin 2,3 dehidrogenaz ve Fc Reseptör-1 gen ifadeleri, IFN- γ tarafından kuvvetli şekilde indüklenmektedir. Bunlar dışında IFN- γ lipopolisakkarit (LPS) gibi diğer ajanlarla birlikte sinerji oluşturarak monosit/makrofajların gen ifade düzeylerinde artışa yol açabilmektedir.

IFN- γ 'nın LPS ile sinerji oluşturması birçok makrofajın fonksiyonu için oldukça önemli olan nitrik oksit (NO) indüksiyonu meydana getirir. Nitrik oksit, makrofajların tümör hücrelerine ve geniş çeşitlilikteki enfeksiyöz ajanlara karşı geliştirdiği önemli bir yok etme mekanizmasıdır (21,22). Bunlara ek olarak, IFN- γ 'nın monositlerin farklılaşmasını, kemik iliğinde (23), HL-60 (24) ve U937 (4) hücre hattında indükleyebildiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, IFN- γ monosit/makrofajlar dikkate alındığında efektör hücrelerin gen ifade düzeyleri, farklılaşmaları ve fonksiyonları üzerinde oldukça etkili olan bir sitokindir. Bağışık yanıtta monosit/makrofajların bir IFN- γ indükleyicisi olan IL-12

kaynağı olarak bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve etkili bir yanıt oluşturulmasında büyük önem bulunmaktadır.

2.1.3.4. Doğal öldürücü hücreler

IFN- γ , bağışık yanıtta yer alan birçok hücrenin yanıtını düzenleme yeteneğine sahip glikoprotein yapısında anahtar bir sitokindir. Bu hücrelerden bir tanesi de doğal öldürücü (NK=natural killer) hücreleridir. NK hücreleri, sitotoksik fonksiyonlara sahip olan ayrıca ürettikleri IFN- γ sitokini ile sitotoksik fonksiyonlarını güçlendirerek tümörlerin ve virüs ile enfekte olmuş hücrelerin kontrolü sağlayabilen önemli bir bağışıklık sistemi elemanıdır (4,25).

Doğal öldürücü hücreler, IFN- γ ve TNF- α sekresyonu yaparak hedef hücrelerde ölümcül reaksiyonlar meydana getirmelerini sağlayan sitotoksik fonksiyonlarını güçlendirirler. IFN- γ ve TNF- α sinerjik olarak etki göstererek hedef hücrede nükleer faktör kappa B (NF- κ B) bağımlı hücreler arası adezyon molekülü 1 (ICAM-1) ifade artışı sonucunda NK hücrelerinin sitotoksik etkilerinin artmasını sağlamaktadır (25).

NK hücreleri tarafından üretilen IFN- γ molekülünün T hücrelerinin Th1 alt tipine farklılaşmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında NK hücrelerindeki sitotoksik etkinin NkR-P1 adındaki reseptörün hedef hücrede çeşitli oligosakkaritleri tanınmasıyla birlikte artış gösterdiği ve bu ilişki sonucunda fazla miktarda IFN- γ üretimi gerçekleştiği görülmüştür (4). Bu durum IFN- γ üretiminin, bağışıklık yanıtın düzenlenmesi ve etkin şekilde etki gösterebilmesi amacıyla oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

2.1.3.5. Hematopoetik öncül hücreler

Dolaşım sisteminde bulunan olgun kan hücrelerinin belirli yaşam süreleri bulunmaktadır. Bu yaşam süresini dolduran olgun kan hücrelerinin yerine yeni hücrelerin üretilmesi gerekmektedir. Bu yenilenme kan hücrelerinin pluripotent hematopoetik kök hücrelerden çoğalması ve farklılaşması sonucu olmaktadır. Bu durumda dolaşımdaki tüm kan hücreleri kemik iliğindeki kan yapıcı kök hücrelerden

üretilmektedir.

Hematopetik kök hücre farklılaşmasının ve yenilenme sürecinin dengede tutulması ihtiyaç duyulan kan hücrelerinin karşılanmasında büyük önem oluşturmaktadır. Normal koşullarda kemik iliğinde belirli seviyede yeni hücreler üretilmektedir. Ancak lökopeni gibi immünolojik bir stres varlığında periferik kan hücrelerine duyulan ihtiyaç artar ve bu denge bozulur. Hematopetik öncül hücreler her ne kadar patojen varlığını direk olarak algılayabilseler bile etkin bir bağışık yanıt oluşturmak amacıyla interlökin 1 (IL-1), TNF α , granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ve aktivite olmuş T-lenfositler tarafından üretilen IFN- γ gibi sitokinler tarafından etkilenmektedirler (26). Hematopoetik hücrelerin görevleri düşünüldüğünde bu etkiler büyük önem kazanmaktadır.

Hematoetik öncül hücreler üzerinde IFN- γ 'nın çift fonksiyonu bulunmaktadır. Bu fonksiyonlar baskılayıcı veya stimüle edici şekilde olabilmektedir. Baskılayıcı etkileri dikkate alındığında, IFN- γ 'nın tek bir ajan olarak bu etkiyi gösterdiği görülmektedir. Hematopoetik hücre soyunda en temel negatif etkisi; B-hücre, eritrosit, eozinofil ve nötrofil granülositlerinin oluşumunun baskılanmasıdır (26). Ancak bunun yanında IFN- γ 'nın CD34+ ve CD38- öncül hücrelerinin proliferasyonunu ve ikincil koloni oluşturabilme becerileri üzerinde engelleyici etkileri olsa bile olgun CD34+ ve CD38- hücrelerinin bu duruma karşı dirençli oldukları görülmüştür. Bu baskılayıcı etkilerinin tersine IFN- γ hücre dışı faktör bağımlı CD34+ öncül hücre proliferasyonu ve IL-3 stimüle akut myeloblastik lösemi hücre klonları üzerinde güçlendirici etkileri bulunmaktadır (5).

Özetle, IFN- γ tek bir ajan olarak erken dönemde hematopoetik öncül hücrelerde baskılayıcı bir etkiye sahipken, kemik iliğinde bulunan IL-3 gibi sitokinler ve kök hücre faktörleri ile öncül hücrelerin gelişimini destekleyici etkilere sahip olduğu görülmektedir.

2.1.3.6. Polimorfonükleer nötrofiller

Doğuştan varolan bağışık yanıt enfeksiyonların erken dönemlerde fark edilmesinde

kritik yol oynamaktadır. Bu bağışık yanıtın bir parçası olan nötrofiller, hücre-içi ve hücre-dışı parazitleri fagositoz yoluyla yok edebilmektedir (20).

Polimorfonükleer nötrofiller (PMN) ve IFN- γ sırasıyla doğuştan ve sonradan kazanılmış bağışık yanıtın önemli bileşenleridir. Bu hücreler IFN- γ etkisi altındayken patojen yok etme stratejilerinden biri olan oksidatif patlama yeteneklerinde ki artış, gen ifade düzeylerinde değişiklikler ve antijen sunumu indüksiyonu gibi çeşitli etkileri gözlenmiştir (27). IFN- γ 'nın bu hücreler üzerindeki etkileri dikkate alındığında doğuştan ve kazanılmış bağışık yanıt arasında aracılık edebilme yetenekleri sebebiyle oldukça önemlidir. Anlaşılacağı üzere daha önceki geleneksel birçok yargının aksine PMN hücreleri, IFN- γ gibi immünomodülatörlere karşı kompleks gen ifade düzey değişiklikleriyle yanıt verebilen aktif hücrelerdir.

IFN- γ immünomodülatör görevini çeşitli genlerin ifade düzeylerindeki artış ile yapmaktadır. Bu etki IFN- γ sitokinin kullandığı özel bir sinyal iletim yolağı ile meydana gelmektedir. IFN- γ kendi reseptörüne bağlanarak Jak-Stat tirozin kinaz adı verilen bu yolakla hedef genlerin ifade düzeylerini düzenleyebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, dinlenme durumunda bulunan PMN hücrelerinin IFN- γ molekülünü hızlı ve stabil bir şekilde bağlayabilmek amacıyla yaklaşık 1000 adet reseptör molekülü ifadeledikleri gösterilmiştir (27). PMN hücrelerinde IFN- γ yolağında bildirici sistem olarak Fc reseptör-1 (Fc γ RI) geni kullanılmaktadır. Bu bildirici sistemin kullanılması PMN hücrelerinde, Jak-STAT yolağıyla IFN- γ ile stimüle edilen genlerin ifade edilebilmesi sağlanır.

IFN- γ doğuştan ve sonradan kazanılmış bağışık yanıtta aracı olan kemokin, sitokin ve sınıf 2 MHC molekülleri gibi birçok genin ifade düzeylerini etkileyebilmektedir. PMN hücreleri geleneksel olarak doğuştan varolan bağışık yanıtın bir parçası olduğundan sınıf 2 MHC molekülünün ifadelemesi ve sonucunda antijen sunumu ve T hücre aktivasyonu gibi etkiler beklenmemektedir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, IFN- γ ile indüklenen PMN hücrelerinin MHC-2 molekülü ifadeleyebildikleri görülmüştür (5,27). Bunlara ek olarak bu hücrelerin fagositoz yapabilme yetenekleri dışında bir önemli fonksiyonu ise kemokin ve sitokin salgılamalarıdır. PMN hücreleri etkin bir bağışık yanıt oluşturmak amacıyla IFN- γ

varlığında kemokin ve sitokin gen ifade düzeylerinde kritik değişiklikler meydana getirmektedir.

IFN- γ ile muamele edilmiş PMN hücrelerinin sinyal iletimi ve gen ifade düzeylerindeki farklılıkları dışında birde hücresel boyutta etkileri bulunmaktadır. IFN- γ , PMN hücrelerini ikincil bir stimülasyona hazırlamak amacıyla bu hücrelerin aktivitelerinde artış sağlayabilirler. Bu şekilde ikincil stimülasyonlara elverişli hale gelen PMN hücrelerinde oksidatif metabolizma artış gösterirken, yüzey reseptörlerinin ifadenmesi, degranülasyon ve diğer nötrofil faaliyetleri yerine getirilmektedir (28).

2.2. Rekombinant Protein Üretimi

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen proteinlere rekombinant protein adı verilmektedir. Rekombinant protein üretim teknolojisi gen regülasyon analizi, proteinlerin yapısal, fonksiyonel analizleri ve protein-protein analizleri ayrıca antikor üretimi gibi birçok uygulamanın gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

Rekombinant protein teknolojisi özellikle sağlık sektöründe yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu alanda kullanılan en yaygın proteinler insülin, interferon alfa-beta-gama, insan büyüme hormonları, granülosit koloni stimüle edici faktörler ve hepatit B aşısıdır. Rekombinant olarak üretilen proteinler tedavi ve teşhis amacı dışında gıda ve tarım gibi alanlarda da kullanılmaktadır. Geniş kullanım alanına sahip olan rekombinant proteinler, üretim aşamalarında yaşanan zorlukları ve maliyetleri nedeniyle üretim koşulları sürekli gelişmektedir.

Rekombinant protein üretiminde, genetik mühendisliği olarak bilinen rekombinant DNA teknolojisi sıklıkla kullanılmakta olan birçok biyoteknolojik işlemlere dayanmaktadır. Bu işlemlerden en önemli olanı polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile rekombinant DNA elde edilmesidir. 1985 yılında Mullis (28) tarafından bulunan bu teknik ile özgül bir DNA sekansının milyonlarca kopya sayısı elde edilebilmektedir. Rekombinant protein üretiminin başarılı olmasını sağlayan bir diğer faktör ise taşıyıcı sistemin belirlenmesidir. Günümüzde rekombinant protein üretimi amacıyla

kullanılmakta olan bakteri, maya, böcek ve memeli hücre hatlarına kadar geniş çeşitlilikte taşıyıcı ve protein üretici sistemler bulunmaktadır. Kullanılacak olan bu sistemler üretimi arz edilen proteinin fizyolojik ve kimyasal özellikleri dikkate alınarak belirlenmektedir. Hedef protein *E.coli* gibi bir bakteri hücresinde üretimi gerçekleştiğinde biyolojik fonksiyonları açısından önemli olabilen post-translasyonel modifikasyonlardan yoksun şekilde üretilir. Ancak meydana gelen bu yoksunluk her proteinin biyolojik fonksiyonunda çarpıcı değişiklikler meydana getirmez. Bu yüzden seçilen taşıyıcı sistem proteine göre belirlenir. Taşıyıcı sistem belirlendikten sonra protein gen sekansı o sisteme özel vektörlere aktarılır ve rekombinant vektörler taşıyıcı hücreye transforme edilir. Uygun rekombinantların seçimi sonucunda taşıyıcı hücrede proteinin çeşitli indüksiyon mekanizmaları ile üretimi sağlanmış olur.

Biyoteknolojinin önemli alanlarından biri olan rekombinant protein üretimi geniş kullanım alanlarının bulunması bu üretilen proteinleri oldukça değerli kılmaktadır. Yüksek verimlilikte ve saflıkta rekombinant protein üretimi bu proteinlerin endüstriyel amaçlar ile ve hastalık tedavi ve teşhisinde kullanımı nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Yüksek verimlilikte ve kalitede ki rekombinant proteinlere olan ihtiyaç sebebiyle uygun protein üretim stratejilerinin kullanımı günden güne artan bir öneme sahiptir. Laboratuvar araştırmalarında ve ticari uygulamalarda yüksek kalitede ve saflıkta aynı zamanda kısa sürede ve düşük maliyette protein üretim tekniklerine sahip olmak ve uygun üretim üretici sistemin avantaj ve dezavantajlarını göz önünde bulundurarak seçilmesi çok büyük önem arz etmektedir. Böylece bu teknoloji ile günümüzde iyileştirilmesi olanaksız düşünülmekte olan birçok hastalığın tedavisi mümkün hale gelebilmektedir.

2.2.1. Protein modifikasyonlarının rekombinant proteinler üzerine etkileri

Rekombinant protein üretimi ilk bakışta oldukça basit gözükmesine rağmen hedef proteine özgül üretim koşullarının belirlenmesi sebebiyle karışık bir süreçtir. Temelde, üretimi arzu edilen proteini kodlayan DNA sekansı uygun ekspresyon vektörünün promotör sekansı ardına klonlanmaktadır. Daha sonra ki süreçte bu vektör uygun taşıyıcı hücreye aktarılır ve hücrenin kendi sistemi yardımıyla arzu edilen proteinin üretimi gerçekleştirilir. Fakat pratikte bu üretim süreçlerini etkileyen birçok faktör

bulunmaktadır. Örneğin, taşıyıcı hücre yani kullanılan ekspresyon sistemine bağlı olarak her proteinin kendine özgü olan katlanma davranışlarına karşı etkiler görülebilir. Benzer olarak bazı proteinler biyolojik membranda post-translasyonel modifikasyonlara ve uygun insersiyonlara gereksinim duymaktadırlar. Sonuç olarak, protein aktiviteleri taşıyıcı hücreye zararlı olabilmektedir. Hatta taşıyıcı hücrenin sistemine bağlı olarak arzu edilen protein fonksiyonunda eksiklikler ve veriminde ciddi şekilde azalmalar görülebilmektedir. Bu yüzden başarılı bir rekombinant protein üretiminin tek bir yolu yoktur. Bunun yerine var olan protein üretim sistemlerinin arzu edilen protein özelliğine göre belirlenmesi ve birden fazla yaklaşım denenmesi başarı şansını artıracaktır.

Rekombinant proteinler özellikle ilaç endüstrisinde iyileştirici etkilerinden biyofarmasötikler olarak faydalanmak amacıyla üretimi günden güne önem kazanmakta ve artmaktadır. Ancak ilaç olarak kullanılan birçok rekombinant proteinin salgılanmasını, ilaç etkinliğini, kararlılığını ve biyolojik aktivitesini etkileyen post-translasyonel modifikasyonlara gereksinimleri vardır (29). Bu modifikasyonlara sahip olmayan rekombinant proteinler bağışıklık sistemi için zarar verici etkilere sahip olabilmektedir (30). Bu nedenle istenmeyen yan etkilerden kurtulmak amacıyla proteinlerin öncül yapıları ile hücresel mekanizmaları arasındaki ilişkinin iyi bir şekilde anlaşılması gerekmektedir. Temel olarak bu modifikasyonlar meydana geldikleri bölgelere göre üç sınıfa ayrılmaktadırlar; endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve hücre dışı bölgedir. Bunlara ek olarak hem endoplazmik retikulum hem de golgi aygıtında gerçekleşen N-bağlı glikozilasyon modifikasyonu bulunmaktadır.

Rekombinant protein üretiminde ve üretilen proteinlerin geliştirilmesinde post-translasyonel modifikasyonlar yarar sağlamaktadır. Bu reaksiyonların proteinlerle olan fonksiyonel ve yapısal ilişkilerinin aydınlatılması daha iyi ve orjinaline yakın proteinlerin üretilmesine olanak sağlayacaktır. Rekombinant protein üretiminde kullanılan üretici sistemlerdeki değişik yaklaşımlar ve gelişmeler ile biyolojik olarak aktif rekombinant protein üretimi mümkün hale gelmiştir.

Sonuç olarak, yüksek kalitede rekombinant protein üretimi için seçilen üretici sistemlerin doğru şekilde karar verilmesi büyük önem arz etmektedir.

2.2.1.1. Endoplazmik retikulum modifikasyonları

Ökaryotik hücrelerde protein üretimi sürecinde ribozomlarda meydana gelen öncül peptitler sinyal sekansları yardımıyla çeşitli sinyal tanıyıcı kompleksler tarafından tanınırlar.

Bu şekilde özel komplekslere bağlanan sinyal sekansları endoplazmik retikuluma doğru yönlendirilirler (31). Endoplazmik retikulumda bulunan Sec61 adı verilen taşıyıcı kompleks yardımıyla proteinler amino asit içeriklerine bağlı olarak translasyon ile eş zamanlı olarak veya sonrasında ER membranından taşınırlar(32). Taşınma sonrasında ER lümenine ulaşan proteinler membran bağlayıcı sinyal peptitazlar tarafından sinyal sekansı içeren bölgelerden kesime uğrarlar. Bu şekilde uygun katlanma formu kazanan proteinler endoplazmik retikulumun diğer kompartmanlarına doğru aktarılırlar. Bu kompartmanlarda proteinler birçok modifikasyona maruz kalmaktadırlar (33). Bu modifikasyonlar disülfid bağı oluşumu, gama karboksilasyonu, beta hidrosilasyonu ve N-bağlı glikozilasyondan oluşmaktadır.

Disülfid bağı oluşumu birçok biyofarmosötik proteinlerin (insülin, INF- α , antikorlar) de dahil olduğu ekstrasellüler proteinlerde meydana gelen yaygın bir modifikasyondur. Bu kovalent bağ oluşumu proteinlerin tersiyer yapılarında (3.cül yapı) dolayısıyla birden fazla alt ünitenin birleşmesiyle oluşan kuaternal yapılarına (4.cül yapı) kararlılık sağlar.

Disülfid bağı oluşumu yükseltgenme reaksiyonu sonucu oluştuğu için hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda bu bağ oluşumu indirgen bir ortam olan sitoplazmada gerçekleşmemektedir. Fakat ökaryotik sistemlerde ER yükseltgen bir ortam olduğundan disülfid bağı içeren proteinlerin üretimi için sorun teşkil etmez.

Prokaryotlar söz konusu olduğunda, periplazmada ekstrasellüler proteinlerin disülfid bağı oluşumu gözlenir. Periplazma, disülfid bağı oluşumunu ve tekrar düzenlenmesini sağlayan Dsb protein ailesi ve şaperon adı verilen enzimlere ev sahipliği yapmaktadır. Ancak *Escherichia coli* gibi prokaryotlarda yüksek miktarda rekombinant protein

sentezinde inklüzyon cisimcikleri oluşumu gözlenmektedir. Bu sebeple daha sonrasındaki işlemler bu inklüzyon cisimciklerinin kaotropik ajanlar yardımıyla çözülebilir hale getirilmesini içermektedir. Ancak bu teknik uygulandığında çoğu zaman protein izolasyonundan sonra beklenen verim alınmamaktadır.

Son yıllarda prokaryotik hücre hatlarının geliştirilmesine yönelik yapılan çalışmalarda disülfid bağı oluşumunun geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bunlar, Dsb protein ailesinin şaperonlarla birlikte fazla miktarda üretimini ve *E.coli*'de ekstrasellüler proteinlerin translokasyonunu sağlayan öncül sekansların optimizasyonunu içermektedir. Ancak çok yüksek miktardaki üretimlerde translokasyon süreci dar boğaz etkisine girmektedir. Bunlar dışında, tiyoredoksin redüktaz enzimi aktivitesi bakımından zayıflamış knock-out hücre hatlarıyla yapılan deneylerde hücre içi az da olsa yükseltgen hale getirilerek disülfid bağı oluşumu sağlanmaktadır (33).

Gama karboksilasyonu, glutamat (Glu) residülerinin karboksilaz enzimi ile γ -karboksiglutamata (Gla) çevirildiği bir modifikasyondur. Bu enzim herhangi bir eşlenik diziye ihtiyaç duymadan yalnızca öncül peptid dizisi aracılığı ile bu modifikasyonu yapmaktadır. Bu modifikasyon daha çok kemik metabolizmasında ve pıhtılaşmada rol oynayan protein gruplarında görülmektedir (34). Özellikle faktör IX ve X adlı kanda bulunan proteinlerde gözlenmektedir. Bu modifikasyon yokluğunda veya yetersizliğinde proteine bağlı olarak protein fonksiyonunda ciddi şekilde azalmalar veya kayıplar gerçekleşmektedir (35).

Beta hidroksilasyonu, hidrolaz enzimi yardımıyla aspartat ve asparajin rezidülerinin sırasıyla β -hidroksiaspartata (Asp-Hya) ve β -hidroksiasparajine (Asn-Hyn) dönüştürüldüğü modifikasyondur. Bu modifikasyon protein-protein etkileşiminde ve kalsiyum bağlamada rol oynamaktadır.

Beta hidroksilasyonu teropötik protein olan faktör IX ve protein C'de görülmektedir. Faktör IX proteinin rekombinant olarak üretiminde chinese hamster ovary (CHO) memeli hücre hatları kullanıldığında orijinal faktör IX proteiniyle %30 ile %40 oranında Asp 64 bölgesinden benzer şekilde modifikasyona uğradığı bulunmuştur (36). Rekombinant protein C için bu modifikasyonun pıhtılaşma aktivitesi için

zorunlu olmamasına rağmen Asp71 bölgesinden hidroksilasyonunun biyolojik aktivitesi için zorunlu olduğu görülmüştür (33).

2.2.1.2. Golgi aygıtı modifikasyonları

Golgi aygıtı birden fazla kompleks modifikasyona sahip olan proteinlerin işlenip sınıflandırıldığı önemli bir organeldir. Bu organelde meydana gelen modifikasyonlar tirozin sülfasyonu, öncül peptitlerin işlenmesi, O-bağlı glikozilasyon, fosforilasyon, amidasyon ve N-bağlı glikozilasyondan oluşmaktadır.

Tirozin sülfasyonu, golgi aygıtının trans bölgesinde proteinlerin tirozin amino asitinin O4 atomlarından sülfatlanması sonucu meydana gelmektedir. Bu modifikasyon ilk olarak 1954 yılında sığır fibrinojen peptitinde bulunmuştur (33).

Her protein için modifikasyonun önemini ayrı değerlendirmekle birlikte bazı proteinler için bu modifikasyonun önemi oldukça fazladır. Faktör VIII olarak bilinen anti-hemofilik faktörün tam olarak aktivite gösterebilmesi için tirozin sülfasyonunun gerekli olduğu görülmüştür. Özellikle bu modifikasyonun protein-protein ilişkilerini etkileyerek proteinlerin bağlanma afinitelerini ve biyolojik aktivitelerini düzenlediği bulunmuştur. Yüksek özgüllükte ligand bağlama ve reseptör aktivasyonunda önemli role sahip olan tirozin sülfasyonu birçok kemokin reseptörlerinde, kompleman proteinleri ile birleşmiş G proteininde, fosfolipit ve glikoprotein reseptörlerinde görülmektedir (33).

Golgi aygıtı modifikasyonlarından bir diğeri öncül peptitlerin işlenmesi ise birçok biyolojik olarak aktif olmayan proteinlerin öncül formlarının proteolizis reaksiyonu sonucu aktivite kazanmasıyla oluşmaktadır. Belirli amino asit dizilerinde meydana gelen bu özel reaksiyonlar PCs adı verilen proteaz ailesi tarafından gerçekleştirilir. İnsülin, faktör IX ve VII gibi birçok protein öncül peptitler şeklinde sentezlenmektedir. PC1 ve PC2 adı verilen proteazlar ile pro-insülin aktif formu olan insüline dönüştürülmektedir. Faktör IX proteinin öncül peptitler ile işlenmesinin başarısız olduğu durumlarda proteinin fosfolipitler ile ilişkisinin zayıfladığı ve glutamik asit residülerindeki γ -karboksilasyon modifikasyonlarının azaldığı

bulunmuştur (33).

O-bağlı glikozilasyon proteinler üzerinde oldukça etkili olduğu bilinen en yaygın post-translasyonel modifikasyondur. Özellikle ilaç sektöründe PTM mühendisliği başlığı altında en dikkate değer araştırmalar glikozilasyonun terapötik proteinler üzerinde uygun hale getirmek veya geliştirmek üzerine olmuştur.

Glikozilasyon, enzimler aracılığı ile sakkaritlerin birbirlerine bağlanarak proteinlere bağlı glikanlar oluşturma sürecidir (37). Glikozilasyonlardan birincisi, memeli hücrelerindeki golgi aygıtında meydana gelen glikan zincirlerinin serin ve treonin residülerindeki hidroksil oksijenine bağlanmasıyla meydana gelen müsin tipli O-bağlı glikozilasyondur. Bunun dışında farklı şekillerde meydana gelen O-bağlı glikozilasyonlar da mevcuttur.

Müsin tip O-bağlı glikozilasyon genellikle terapötik proteinlerde meydana gelmektedir. Bu modifikasyon proteinin yarı ömrünü ve fonksiyonunu belirlemekte olan protein katlanması stabilizasyonu, agregasyonun, düzenlenmesi, proteinlerin sıcaklığa ve proteaz saldırılarına karşı korunması gibi birçok etkiye sahiptir.

Golgi aygıtı modifikasyonlarından bir diğeri fosforilasyondur. Hücre içi fosforilasyon mekanizmalarının çok iyi aydınlatılmasına rağmen hücre dışındaki fosforilasyon mekanizmasının proteinlerin üzerinde fiziksel ve fonksiyonel etkisinin anlaşılması güç olmuştur. Yapılan proteomik ve bilgisayar analizlerde fosforilasyonun proteinlerin bağışıklık sistemindeki fonksiyonlarından pıhtılaşma gibi fizyolojik fonksiyonlarına kadar birçok etkiye sahip olduğu görülmüştür (33).

Oldukça iyi bilinmekte olan pıhtılaşma faktörlerinden faktör XI ve VIII fosforile olan proteinlerdendir. Bunlar dışında biyolojik olarak aktif olan adrenokortikotropin ve progastrin peptid hormonlarının da fosforile olduğu bulunmuştur (33).

Amidasyon reaksiyonu proteinlerin C-terminalindeki karboksil grubunun amid grubu ile yer değiştirdiği bir modifikasyondur. Bu reaksiyon genelde biyolojik olarak aktif olan peptitlerin tam olarak aktivite göstermeleri amacıyla yapılmaktadır. Bu

modifikasyon maya ve prokaryotların aksine yalnızca gelişmiş ökaryotlarda bulunmaktadır. Amidasyon reaksiyonun proteinler üzerinde birçok etkisi bulunmaktadır. Özellikle α -amidasyonu peptitlerin C-terminal bölgesinden iyonize olmalarına karşı korumaktadır. Bu durum dolayısıyla proteinleri daha hidrofobik yaparak reseptörlere daha iyi bağlanabilir hale getirmektedir. Bu modifikasyona örnek olarak, serumda fosfat ve kalsiyum dengesini ayarlayabilme özelliği sebebiyle hipertalesimi hastalarına verilen somon kalsitonini verilebilir.

N-bağlı glikozilasyon ökaryotlarda proteinler üzerinde hem biyolojik hem de fizyolojik olarak oldukça etkili olan en yaygın modifikasyondur. Bu modifikasyon ER ve golgi aygıtında meydana gelmektedir. N glikozid bağı içeren glikoproteinlerde şeker asparajin yan zincirlerinin amid grubuna bağlanır. Glikozilasyon karma, mannozca zengin ve melez oligosakkaritler olmak üzere üç ana sınıf şeklinde olmaktadır. Karmaşık modifikasyon süreçleri sonunda proteinlerin yapısına katılan şekerler, moleküler ve hücreler arası tanıma, hücre içi ve dışı protezlara karşı koruma, çözünürlük, akışkanlık ve yük gibi fizikokimyasal nitelikler üzerinde oldukça etkilidirler. Bunlara ek olarak, proteinlerin hücre içi göçlerini, zarlarla ilişkilerini, sınıflandırılmasını ve salınımında etkilemektedir.

N-bağlı oligosakkaritlerin en önemli görevi protein katlanması sırasında gerçekleşir. Endoplazmik retikulumda bulunun şaperon adı verilen kalretikulum adlı protein yeni sentezlenen membran proteinlerinin doğru konformasyonda katlanmasını sağlamaktadırlar. Bu protein, yapısında tek bir glikoza sahip mannozca zengin oligosakkaritleri tanıyarak bu glikoproteinlerin katlanmasını sağlar (38).

Glikozilasyon sonucu proteinlere eklenen glikanlar immünolojik cevabın modifikasyonu, proteinlerin tanınması, hedeflenmesi ve katlanması gibi önemli rollere sahiptir. Bunlara ek olarak, rekombinant proteinlerin yarı ömürleri üzerinde oldukça etkili oldukları görülmüştür. Rekombinant insan interferon gamma üretimi üzerine yapılan araştırmalarda proteine dört adet N-bağlı glikozilasyon bölgesi eklendiğinde serumdaki yarı ömrünün 20-25 kat arttığı görülmüştür (34).

Kullanılan sistemlere bağlı olarak meydana gelen glikozilasyon farklılıklarını azaltmak

ve orjinaline yakın protein elde etmek amacıyla genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak modifiye edilen hücre hatları mevcuttur. Özellikle ökaryotik protein eldesinde sık kullanılan CHO memeli hücre hattı N-bağlı glikozilasyonda insandan farklı olarak daha uzun oligosakkarit zincirleri eklemektedir. Bu durum insanda immünojenik bir durum yaratabilmektedir. Bu sorunu ortadan kaldırmak amacıyla 1 Man5GlcNAc2 (Man5) glikan yapısına N asetilglukozamin ekleyerek hiperglikozilasyona neden olan mannoz glikoprotein beta 1,2 N-asetil glukozamin transferaz(Mgat1) enzimi knock-out edilmiş CHO hücre hatları kullanılmaktadır(39).

2.2.1.3. Hücre dışı modifikasyonlar

Hücre içinde üretimi gerçekleştirilen proteinler son basamakta hücre zarına ulaştıklarında hücre dışı ortama aktarılırlar. Bu şekilde hücre dışı ortama aktarılan proteinler bu ortamda birkaç modifikasyon geçirdikten sonra üretim süreçlerini tamamlarlar. Bu modifikasyonlar deaminasyon, glikasyon, oksidasyon ve proteolitik işlemeden oluşmaktadır.

Deaminasyon proteinlerde sıklıkla görülen asparajin ve glutamin residülerinin sırasıyla aspartat ve glutamata deaminasyonu ile meydana gelen modifikasyondur. Bu modifikasyon proteinlerin yıkılma süreçlerini ayarlamaktadır. Dolayısıyla bir proteinin yarı ömrünü kısaltabilirler. Bu gibi etkilerden dolayı deaminasyonun proteinlerin biyolojik potansiyellerindeki etkileri göze çarpmaktadır.

Glikasyon, indirgen şekerlerin karbonil grupları ile proteinlerin amin veya lizin yan zincirindeki amin grubu arasında meydana gelen kondenzasyon reaksiyonudur.

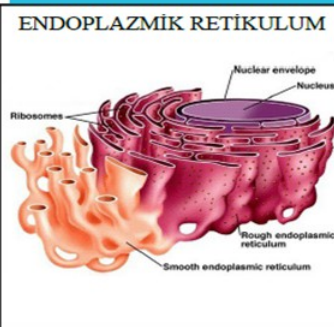
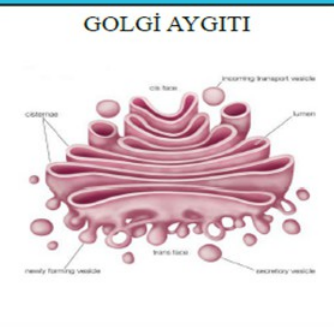
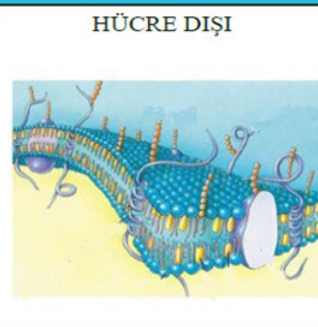
Glikasyon özellikle üründe heterojenlik meydana getirmek ve ürün sağlamlığını etkilemek amacıyla rekombinant antikor hücre kültürleri sırasında gösterilmiştir (33).

Oksidasyon, teropötik bir protein olan antikorlarda ve büyüme faktörlerinde bulunan metiyonin amino asitinin oksidasyon reaksiyonu sonucu metiyonin sülfoksite dönüştüğü bir modifikasyondur. Bu reaksiyon hem protein kütlesinde bir artışa hem de yan zincirlerdeki metiyoninin polar olmasına yol açar. Oksidasyonun yalnızca

metiyonin amino asitinde değil triptofan ve sistein amino asitinde de gerçekleştiği düşünülmektedir.

Proteolitik işleme hücre dışında meydana gelen en yaygın modifikasyondur. Bu reaksiyon özellikle enzim aktivasyonu için oldukça gereklidir.

Rekombinant antikor modifikasyonunda ağır zincirin C-terminaldeki lizin amino asitinin çıkarılması en yaygın modifikasyondur. Bu sayede moleküler kütlede azalma ve pozitif yük ile yüklenme meydana gelir. CHO, SP2/0 gibi memeli hücre hatlarında üretilen antikorlarda endojen karboksipeptidaz beta sayesinde bu reaksiyon gerçekleşmektedir. Ayrıca bu bölgesel kesilmeler heterojenliği de arttırmaktadır.

ENDOPLAZMİK RETİKULUM	GOLGİ AYGITI	HÜCRE DIŞI
		
<ul style="list-style-type: none">• Disülfid bağı oluşumu• Gamma karboksilasyonu• Beta hidroksilasyonu• N-bağlı glikozilasyon	<ul style="list-style-type: none">• Tirozin sülfasyon• Öncül peptitlerin işlenmesi• O-bağlı glikozilasyon• Fosforilasyon• Amidasyon• N-bağlı glikozilasyon	<ul style="list-style-type: none">• Deaminasyon• Glikasyon• Oksidasyon• Proteolitik işleme

Şekil 2.2. Post-translasyon çeşitleri

2.2.2. Rekombinant protein üretici sistemler ve klonlama ve vektör seçimi

2.2.2.1. Rekombinant protein üretici sistemler

Rekombinant protein üretimini kolaylaştırmak amacıyla birçok prokaryotik ve ökaryotik üretici sistemler kullanılmıştır. Ancak üretimde ortaya çıkan teknik sorunlar ve ekonomik sebepler nedeniyle parental protein üretimde sadece bir kısım üretici

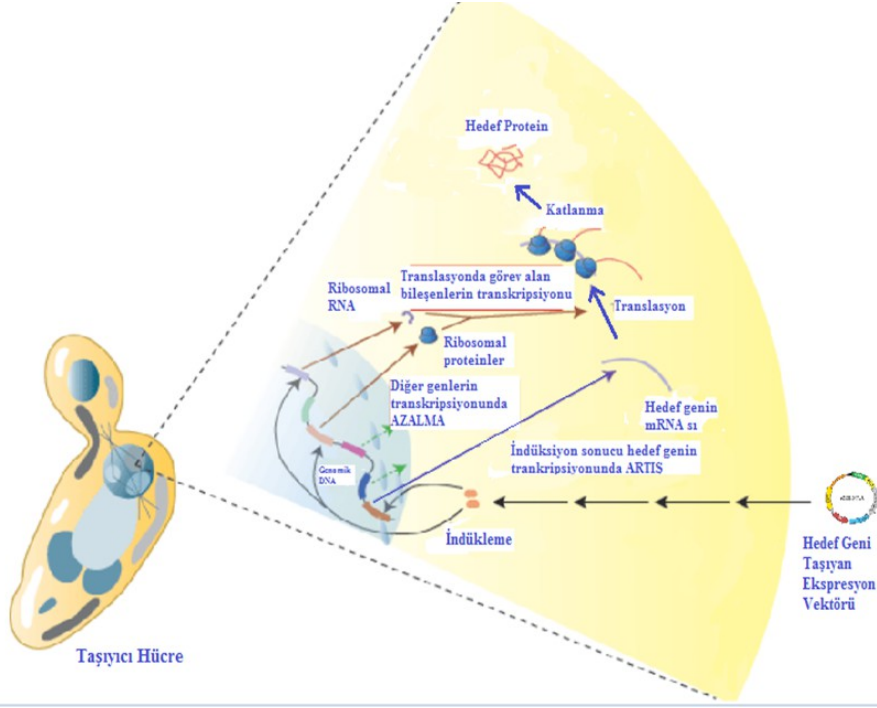
sistemler kullanılmaktadır. Bunlar yaygın olarak *E.coli*, maya, memeli hücre hatları, böcek hücre hatları, transgenik bitki ve hayvanlardan oluşmaktadır (40).

Üretimi gerçekleştirilen bu rekombinant proteinlerden yaklaşık %50'si *E.coli* üretici sistemi kullanılarak geriye kalanın büyük bir kısmı ise memeli hücre hatları yardımıyla (CHO, yavru hamster böbrek hücre hattı, HSO fare myeloma, SP2/0 hücre hattı) üretilmiştir. Çok az miktardaki ürün ise maya üretici sistemleri kullanılarak üretim sağlanmıştır. Örneğin, Novo Nordisk's şirketine ait olan insulin, hepatit B yüzey antijenleri, rekombinant hirudin maya üretici sistemi olan *Saccharomyces cerevisiae* kullanılarak elde edilmiştir (34).

Prokaryotik hücrelere, maya üretici sisteme ve memeli hücre hatlarına ek olarak transgenik hayvanların ve böcek hücre hatlarının kullanımı ile üretilen rekombinant proteinler de mevcuttur. Transgenik keçi sütünden elde edilen rekombinant insan antitrobini olan atryn buna en güzel örnektir.

Rekombinant protein üretimi temel olarak hücre-içi (in-vivo), hücre-dışı (in-vitro) üretici sistemler ve kimyasal protein sentezi olarak 3 ana sınıfa ayrılmaktadır.

Hücre-içi protein üretimi, geleneksel olarak üretilmek istenilen proteinin DNA kalıbını içeren vektörün taşıyıcı hücreye aktarımı ve bu taşıyıcı sistemin kültür edilmesiyle birlikte daha sonra gerekiyorsa lizis aşamalarından sonra çeşitli saflaştırma tekniklerinin ardından saf protein elde etme süreçlerini kapsamaktadır(Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hücre-içi protein üretimi

Hücre-içi üretici sistemler olarak prokaryotik, ökaryotik, böcek hücre hatları, memeli hücre hatları ve transgenik bitki veya hayvanlar kullanılmaktadır.

Hücre-dışı protein üretimi son yıllarda gelişmekte olan ve yüksek verimlilikte fonksiyonel protein üretiminin gerçekleştiği bir sistemdir. Bu sistem temel olarak protein mühendisliği tekniklerinin kullanımı ile protein üretimi için gerekli bileşenlerin eklenmesiyle (ribozomlar, translasyon faktörleri, amino açıl tRNA sentetazlar ve tRNA) hücre içine benzer bir ortam yaratılmasıdır. Bu sistem hücre-içi sistemlerle kıyaslandığında çok daha hızlı ve herhangi bir gen transfeksiyonu, hücre kültürü ve protein saflaştırma teknikleri gerektirmediğinden avantajlı olmaktadır. Ancak endüstriyel üretimde hücre-dışı protein üretimi kullanışlı ve esneklikler içeren bir uygulama olmasına rağmen çok tercih edilmemektedir. Genel olarak hücre-içi protein üretim tekniğinde protein degradasyonu, agregasyonu ve kalıp DNA kaybı gibi sorunlara rağmen bu sistemin oldukça ucuz olduğu ve kullanılan sistemlere bağlı olarak verimli olduğu görülmektedir (41).

Kimyasal protein sentezinde hücre-içi sistemlerde karşılaşılan birçok biyolojik kısıtlamalardan kurtulunmaktadır. Kimyasal sentez üreticiye molekülün kovalent

yapısında arzu edilen değişiklikler yapılabilmesine olanak sağlamıştır. Bu şekilde üretilen proteinler oldukça saf olmaktadır. Bunlara ek olarak sentezlenen proteinler belirli bölgelerinden işaretlenebilirler ve üretici sistemler için toksik olan proteinler bu yolla sentezlenmektedir. Bu gibi avantajlara rağmen oldukça küçük proteinlerin ve peptitlerin sentezi yapılabilir. Verimin oldukça düşük olması ve pahalı bir protein üretim yolu olması nedeniyle çok tercih edilmemektedir. Kimyasal sentez ile üretilen ilk protein 1901 yılında Fisher's tarafından bir dipeptit olan glisin-glisin olmuştur. Daha sonraki yıllarda solid-faz tekniği kullanılarak 1963'te Merrifield tarafından ribonükleaz A üretilmiştir (42).

1. *Escherichia coli* - prokaryotik rekombinant protein üretici sistem;

Bakteri ekspresyon sistemleri hem ökaryot hem de prokaryot orjinli heterolog proteinlerin üretiminde sıklıkla tercih edilen üretici konaklardır. Bu sistemler özellikle *E.coli*, *Bacillus subtilis*'den oluşmaktadır. Bunlara ek olarak *Alcaligenes eutrophus* ve *Pseudomonas*'da kullanılmaktadır. Bu üretici sistemler prokaryot olduklarından dolayı özellikle insan proteinlerinin üretiminde hem avantaj hem de dezavantaj sağlamaktadırlar.

Bakteriyel üretici sistemler, bakterilerin kolay kültüre edilebilmeleri, hızlı üremeleri ve yüksek miktarda rekombinant protein üretim kapasiteleri sebebiyle oldukça tercih edilen sistemlerdir. Ancak prokaryotik sistemler kullanılarak üretilen ökaryotik rekombinant proteinler moleküler katlanmadaki eksiklikler ve prokaryotlarda gerçekleşmeyen post-translasyonel modifikasyonlar sebebiyle tam olarak fonksiyonel üretilmemektedir. Bunlara ek olarak, çok miktarda üretimi arzu edilen rekombinant proteinler çözünmez bir form olan inklüzyon cisimcikleri olarak üretilmektedirler. Proteinlerin geri kazanılması amacıyla inklüzyon cisimciklerinin parçalayan ağır denatürantların kullanılması dolayısıyla verimin düşmesi ve uygun olmayan katlanmalar prokaryotların en büyük dezavantajlarından.

Rekombinant protein üretiminde en yaygın kullanılan mikroorganizma *E.coli*'dir. Her sistemde mevcut olduğu üzere bu sistemde de değerlendirilmesi gereken avantajlar ve dezavantajlar mevcuttur. Bu bakterinin kültüre edilme kolaylığı ve genetik olarak

modifiye alt türlerinin çeşitliliği açısından avantajlı sistemdir. Ayrıca kuru ağırlığının %80'i kadar protein üretimiyle hızlı, düşük maliyetli ve yüksek performansa sahip bir sistem olmasıyla rekombinant protein üretiminde ilk akla gelen sistem haline gelmektedir.

Bakteriler genellikle küçük boyutlara sahip ve post-translasyonel modifikasyon gerektirmeyen rekombinant proteinlerin üretimi için mükemmel konaklardır. Ancak kompleks ve büyük boyuttaki proteinlerin üretimi için uygun değildirler. Birçok proteinin biyolojik ve fizyolojik olarak fonksiyonel olması için gerek duyduğu kompleks katlanmalar prokaryotik hücrelerde mevcut değildir. Buna ek olarak, birçok ökaryotik protein fonksiyonu için zorunlu olan glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar prokaryotlarda gerçekleşmez.

E.coli ekspresyon sistemi için günümüzde birçok ticari ve ticari olmayan ayrıca çeşitli uygulamalar için özel tasarlanmış promotör bölgeler içeren vektörler bulunmaktadır. Bunlardan rekombinant protein üretiminde sık kullanılan T7 promotörlü pET ekspresyon sistemi (Novagen), λ PL promotör/cI represör (Invitrogen pLEX), Trc promotör (Amersham Bioscience pGEX) ve hibrit lac/T5 (Qiagen pQE) promotörlerinin kullanıldığı sistemler oldukça yaygındır (1).

Escherichia coli'de proteinler 3 formda üretilmektedir;

- Üretimi arzu edilen proteinin C-terminal ve/veya N-terminal ucundan his-tag gibi bir floresans proteinle birlikte füzyon protein olarak üretilmesidir. Bu his-tag kuyrukları üretilen rekombinant proteinin immüno-presipitasyon gibi çalışmalarda, saflaştırılmasında, görüntülenmesinde ve hücre-dışı proteazlara karşı korunmasında yarar sağlamaktadır.
- Üretilen proteinler periplazmaya veya besiyerine salınabilirler. Besiyerine salınan proteinlerin hücre-içi proteazlar tarafından degradasyon olasılığı azaltmakta ve doğru konformasyondaki proteinlerin besiyerine salınımıyla saflaştırmayı kolaylaştırmaktadır.

- Fazla miktarda rekombinant protein üretiminde proteinler inklüzyon cisimcikleri içerisinde çözünmez formda bulunmaktadırlar. Bu durum protein taşıyıcı hücrenin proteazlarından korunsa bile daha sonraki süreçlerde fonksiyonel protein eldesinde zorluklara ve miktar azlıklarına sebebiyet vermektedir.

Prokaryotik üretici system olan *E.coli*'de N ve O-bağlı glikozilasyon, yağ asiti açılasyonu ve fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar mevcut değildir. Bunlara ek olarak, yüksek miktarda rekombinant protein sentezinde moleküler şaperonların eksikliğinden dolayı eksik disülfid bağı sebebiyle proteinlerin konformasyonlarında orjinalinden farklılıklar görülmektedir. Bu gibi etkenler proteinlerin ikincil, tersiyer ve kuaternal yapılarını etkilediği için üretilen proteinin fonksiyonel karakterinde, yarı ömründe, yapısında ve çözünürlüğünde değişikliklere sebebiyet vermektedir.

E.coli sistemi kullanılarak üretilmiş rekombinant proteinler amino terminal uçlarında metiyonin amino asiti bulundurma eğilimindedirler. Bu durum proteinlerin kararlılığını etkilemekle birlikte immünijenite yaratmaktadır (1,43).

Prokaryotlarda rekombinant üretiminde karşılaşılan bir diğer sorun ise intrasellüler ortamda var olan proteazlardır. Bu proteazlar elde edilen protein ürünüde degradasyonlara veya istenmeyen değişikliklere sebep olmaktadır. Bu durum, özel olarak modifiye edilmiş BL21 (DE3) veya *E.coli* B/r suşlarının seçimiyle aşılabilir. Bu suşlar Ion ve OmpT adı verilen iki adet proteazdan yoksundurlar. Böylece üretilen heterolog proteinin degradasyon olasılığı aza indirgenir.

Günümüzde *E.coli* suşları, düşük maliyetli ve yüksek miktarda protein üretebilme kapasiteleri sebebiyle hem bilimsel çalışmalarda hem de ticari olarak protein üretiminde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu duruma verilebilecek en çarpıcı örnek, insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I)'in periplazmadaki inklüzyon cisimciklerinden 8,5 g/L'ye kadar üretimidir (44). Tez kapsamında kullanılan *E.coli* suşları aşağıda yer almaktadır (45):

- K12 JM109 suşu, genellikle transformasyon başarı şansını artırmak ve başarılı transformasyon gerçekleştirmek amacıyla kullanılan bir suştur. Bu başarı hedef DNA'yı istenmeyen şekilde kesen enzimlerden (endonükleazlardan) kısmen yoksun olması ve kendi kromozomal DNA'sı ile hedef DNA sekansı arasında herhangi bir rekombinasyon yapma yeteneği bulundurmamasındandır. Bu özellikler genetik haritada endA- ve recA- olarak ifade edilir. Transformasyonun kolay olmasının yanında β -galaktozidaz aktivitesine bağlı klonlamalarda, uygun transformatların seçiminde rahatlık oluşturacak mavi-beyaz koloni seçimine olanak verir. Ancak kromozomunda T7 RNAP geni bulundurmadığından T7 promotoruna bağlı indüksiyonlar için uygun değildirler.
- BL21 (DE3) suşu, transformasyon başarısı düşüktür, ancak, indüklenebilen bir suştur. Bu yüzden T7 promotoru kontrolündeki indüksiyonları, kromozomunda lacUV5 promotoru kontrolü altındaki T7 DNA'ya bağımlı RNA polimeraz içerdiğinden başarılı bir şekilde gerçekleştirmektedir. Aynı zamanda lon ve ompT gibi proteazları kodlayan genlerden yoksun olması üretilen proteinin stabilitesini sağlamaktadır.

2.2.2.2. Klonlama ve vektör seçimi

Rekombinant protein üretimi, moleküler klonlama tekniği ve rekombinant DNA teknolojisinin sıklıkla kullanıldığı bir tekniktir. Rekombinant protein teknolojisi, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak orjinal kaynağından alınan hedef dizinin çoğaltılıp homojen bir DNA popülasyonu elde edilmesiyle birlikte bu hedef dizinin taşıyıcı sistemler yardımıyla yüksek miktarlarda ifade edilmesidir.

Moleküler klonlama, hedef DNA dizisinin izolasyonu ile ilgili dizinin konakçı olarak nitelendirilen bir başka organizmaya aktarımı sonucunda ifadenmesidir. Moleküler klonlama tekniği, diğer birçok farklı DNA dizisi arasından hedef gen dizisinin seçilip ifadenmesine olanak sağlamıştır. Memeli hücreleri gibi kompleks yapıları organizmalarda hedef gen dizisinin homojen olarak eldesi ve çoğaltılması süreci oldukça zordur. Bu amaçla hedef gen dizisinin çoğaltılması hedef DNA dizisinin

ifadesini artmasını sağlayan işlemler sonucunda uygun hücrelerden total RNA izolasyonu veya poly (A)+ mesajcı RNA (mRNA) eldesi ardından bu RNA'dan ters transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA) elde edilmesi ile olmaktadır. Hedef gen dizisinin elde edilmesinden sonra bu dizinin klonlanması proteini kodlayan DNA sekansı ve vektörün uygun tanıma bölgelerinden kesim yapan restriksiyon endonükleaz enzimleri yardımıyla kesilmesi ile oluşan yapışkan uçlar yardımıyla uygun vektör ile hedef DNA dizisinin ligasyonu ile gerçekleşmektedir. Hedef sekansın ifadenmesini sağlayacak şekilde promotör bölgenin ardına klonlanmasıyla oluşturulan rekombinant vektör uygun taşıyıcı hücreye aktarılır ve hedef protein üretimi gerçekleştirilir. Ancak bu süreçleri etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Ayrıca rekombinant protein üretiminde kullanılan ekspresyon vektörlerinin replikasyon orjini, antibiyotik direnç kaseti, çoklu klonlama bölgesi, transkripsiyon promotör seçimi, translasyon başlangıç ve sonlanma bölgeleri gibi bazı ana özellikler üretimi etkilemektedir. Hedef DNA parçasının klonlanmasını sağlayan restriksiyon kesim bölgeleri içeren ekstrakromozomal yapılar olan plazmitler, marker niteliği taşıyan antibiyotik direnç kaseti gibi bölgeler bulundurmaları yanısıra taşıyıcı organizmada rekombinant protein üretiminin verimini belirleyecek kopya sayıları dikkate alınmalıdır.

- Kopya sayısı ve antibiyotik direnç kaseti

Ekstrakromozomal DNA molekülü olan ve boyutları 1 kilobazdan 200 kilobaza kadar değişkenlik gösteren moleküllere plazmit adı verilmektedir. Bakteri hücrelerinden izole edilen bu moleküller genellikle halkasal olarak ikili sarmal yapıdadır. Bu ekstrakromozomal elementlerin bakteriyel kromozomdan bağımsız olarak replikasyonları gerçekleşir ve genetik olarak aktarılır.

Plazmitlerde replikon adı verilen bölgeler replikasyon başlangıcı (ori) ve kontrol eden elementlerden oluşan ve kopya sayısı ile yakından ilişkili olan genetik birimdir. Plazmitlerde 30'dan fazla replikon tanımlanmasına rağmen moleküler klonlamada sıklıkla; kopya sayısı 15-20 olan ve bakterilerin birbirleri ile rekabet etmelerini sağlayan kolisin adlı bakteriyosinden adını alan colE1 replikonu ve bir diğeri pMB1 replikonu kullanılmaktadır. Bu plazmitler verim artışı sağlamak amacıyla yıllar

içerisinde pMB1/colE1 replikonu olarak modifiye edilmişlerdir. Böylece yüksek kopya sayılı plazmitler moleküler klonlamada başı çekmektedir. Ancak her klonlamada yüksek kopya sayılı plazmitler tercih edilmez. Gen klonlama çalışmalarında yüksek kopya sayılı plazmitler avantajlı gözükmesine rağmen genellikle orta seviyede kopya sayılı plazmitler tercih edilir. Çizelge 2.1'de plazmitler, içerdikleri replikonlar ve kopya sayıları verilmiştir.

Çizelge 2.1. Plazmit vektörler tarafından taşınan bazı replikonlar

Plazmit	Replikon	Kopya sayısı	Referans
pBR322	pMB1	15-20	Bolivar ve diğerleri
pUC	pMB1'den modifiye	500-700	Vieira and Messing (1982, 1987); Messing (1983); Lin-Chao ve diğerleri (1992)
pMOB45	pKN402	15-118	Bittner ve Vapnek (1981)
pACYC	p15A	18-22	Chang ve Cohen (1978)
pSC101	pSC101	~5	Stoker ve diğerleri (1982)
colE1	colE1	15-20	Kahn ve diğerleri (1973)

- Çoklu klonlama bölgesi

Polilinker adı ile de bilinen çoklu klonlama bölgesi 20'den fazla restriksiyon kesim bölgesi içeren ve klonlama sırasında hedef DNA dizisinin vektöre ekleneceği plazmit üzerindeki bölgedir. Bu bölgede yer alan restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri ile açık okuma çerçevesini bozmayacak şekilde ikili enzim kesimlerine maruz kalmış hedef DNA dizisinin yerleşmesine olanak sağlanır.

Çoklu klonlama bölgesindeki restriksiyon endonükleaz tanıma bölgelerine göre seçilen restriksiyon enzimleri hedef DNA dizisi üzerinde tanıma bölgelerine sahip olmamalıdır. Böylece hem klonlanmak istenen DNA parçası hem de plazmit uygun

enzimlerle kesilerek birbirlerine yapışmaya uygun hale gelir. Ligasyon adı verilen teknik ile bu parçalar birbirlerine yapıştırılır ve rekombinat vektör oluşturulmuş olur.

Genellikle çoklu klonlama bölgeleri direnç kaseti ya da haberci (reporter) genin başında yer almaktadır. Böylece hedef DNA parçasını alan başarılı bir rekombinant plazmit içeren transformatların fenotipik olarak teşhisi gerçekleştirilir.

- Promotorlar

Rekombinant protein eldesinde üretim koşullarını etkileyen ve kullanılan plazmitlerin üzerinde bulunan transkripsiyonel promotorlar mevcuttur. Bu promotorlar protein üretiminin indüksiyon aşamasında kritik rol oynamaktadır.

Genel olarak promotorlar transkripsiyonun başlaması için gerekli olan DNA bölgesi olarak tanımlanmasına rağmen gerek prokaryotik (bakteri) gerek ökaryotik (maya) promotorlarda küçük farklar bulunmaktadır. Kendi aralarında farklılıklar bulunduran bakteriyel promotorların genel çalışma prensipleri birbirlerine benzemektedir. Bu promotorların aktif şekilde çalışması için iki ana motife ihtiyaçları vardır. Bunlar transkripsiyon başlangıç bölgesi +1 kabul edildiğinde bu bölgenin üst tarafında yer alan hayli korunmuş -10 ve -35 bölgeleridir. RNA polimeraz (RNAP) bu bölgeleri tanıyarak DNA'ya bağlanır ve transkripsiyonun başlamasını sağlar. RNAP'ın doğru promotora tanınmasında sigma faktörü olarak adlandırılan molekülün büyük önemi vardır. Sigma 70 adı verilen faktör RNAP enzimine bağlanarak enzimi uygun promotora yönlendirir ve transkriptin oluşumu ardından sigma faktörü RNAP'dan ayrılabilir. RNAP'ın mRNA uzatma işi ise terminatör-sonlandırıcı bölgeye kadar sürer ve o bölgeye ulaştığında durur.

Rekombinant protein üretim teknolojisinde hedef protein yeterli düzeyde üretimi amacıyla çeşitli indükleyici ajanlar varlığında indüklenen promotor sistemler bulunmaktadır. Ortamda indükleyici ajan bulunmadığında hedef protein üretimi ya minimum ya da hiç gerçekleşmez. Bu şekilde farklı üretim düzeyleri seçilen promotor sistemlerine göre farklılık göstermektedir. Lac operonu bulunduğu sistemlerde ortamda herhangi bir indükleyici ajan bulunmasa bile sızdırma olarak nitelendirilen

minimum düzeyde transkripsiyon gerçekleştirilir. Ancak arabinoz gibi operonlar çok daha sıkı şekilde kontrol edildiğinden sızdırma gerçekleşmez.

Promotorlar farklı çalışma eşiklerine sahiptirler. Kimi operon çalışma eşiği çok yüksektir ve minimum düzeyde indükleyici ajan varlığında bile maksimum güçte çalışarak hedef proteinin fazla miktarda üretimini sağlar. Ancak kuvvetli ekspresyon düzeyleri her zaman arzu edilen bir durum değildir. Üretimi gerçekleştiren konakçı sistemin bu üretim ile başa çıkabilme kapasitesine sahip olması gerekmektedir. Sıklıkla karşılaşılabilecek olumsuz durumlar; proteinin aşırı miktarda üretimi sonucu toksik özellik oluşturması, konakçı sistemin bu üretim hızına yetişemeyip proteinin son halini almasını sağlayacak şekilde katlanmasını gerçekleştirememesi olabilir.

Rekombinant protein üretiminde sıklıkla kuvvetli promotorlardan olan T4 yada T7 bakteriyofajlarından türetilmiş olan promotor sistemleri kullanılmaktadır. Bu promotorlar protein üretimi sırasında aktif hale getirecek olan laktoz ve laktoz analogu olan galaktopiranozidler tarafından indüklenmektedir. Bakteriyel ekspresyon sistemi olarak bu tez çalışmasında kullanılacak laktoz analogu izopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) lac operonu indükleyicisidir. Genellikle çoklu klonlama bölgesine bitişik olan bu promotor sistemi T7 viral promotoru olduğundan oldukça güçlüdür. Ancak bu promotor sadece viral T7 polimeraz varlığında çalışmaktadır. Bakterinin kendi polimerazları bu promotoru tanımamaktadır. Bu amaçla çoğu bakteri suşu T7 RNAP üretmediğinden kromozomal DNA' sında bu enzimi üretmesini sağlayan gen dizileri bulunan özel B serisi suşları (BL21 (DE3) gibi) kullanılır. Bu seri dışındaki kullanımlarda ya enzim bakteriye enjekte edilmeli yada dışarıdan verilmelidir.

Güçlü bir promotor olan T7 promotorunun operonunda bazı özel diziler bulunmaktadır. Bunlar represör, promotor, operotör, terminatör ve hedef gen dizisidir. Laktoz operonunun asıl hedefleri olan lacZ, lacY ve lacA ortamda laktoz varlığında ifadelenen genlerdir. Bu hedef genlerden lacY, laktozun hücre içerisine alınması için gerekli olan permeaz enzimini; lacZ, laktozu glikoza ve galaktoza parçalayan β -galaktozidaz enzimi ve lacA ise laktoz metabolizmasında oluşan artık ürünlerin hücreden uzaklaştırılması sırasında galaktosit şekerlerinin asetillenmesini sağlayan

transasetilaz enzimini kodlar. Normal şartlarda ortamda laktoz bulunmadığında gereksiz yere hücre kaynaklarının tüketilmemesi için bu promotor çalıştırılmaz. Bu promotorun baskılanmasını sağlayan gen ise lacI genidir. Bu genin ürünü promotordaki operatör dizilere bağlanarak RNAP'ın promotora bağlanmasını engeller. Ancak ortamda IPTG gibi bir şekerin varlığında lacI geninin fonksiyonu engellenir. Böylece RNAP sigma faktörünün bağlanmasıyla aktif hale gelir ve hedef geni de içeren transkripsiyon bölgesinin ifadenmesini sağlar. RNAP promotora bağlanmasının ardından sigma faktör ayrılır ve kısa mRNA transkriptini sonlandırıcı bölge olan terminatör dizisine kadar devam ettirir. Yapılan çalışmalarda ortama indükleyici olarak laktozun yerine IPTG koyulması, sistemde tükenmeden tutulacak ve operonun çalışmasının devamlılığını sağlayacaktır.

- Kodon tercihi

Rekombinant ekspresyon sistemlerinde başarılı bir üretim yapmak amacıyla değerlendirilmesi gereken bir diğer konu veya sorun ise sistemlerin kodon tercihleridir. Her amino asit birden fazla kodon tarafından kodlandığı için her canlının belli bir kodona yönelimi ve o kodona özgü t-RNA üretimi diğerlerine göre daha fazla olmaktadır. Ancak yabancı bir protein üretiminde kullanım sıklığı az olan bir kodonla karşılaşıldığında canlı o kodona özgü t-RNA miktarında dar boğaza girmektedir. Bu durum üretilmek istenilen protein geninde çerçeve kayması sebebiyle veya üretimde yanlış amino asit eklenmesiyle mutasyonlar, tamamlanmamış translasyon sonucu eksik peptitler veya hücre ölümüyle sonuçlanmaktadır. Karşılaşılan sorunları ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilen çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bunlardan birincisi özel aksesuar plazmitler ile kullanım sıklığı az olan kodona özgü t-RNA'nın kopya sayısını arttırmak veya BL21 (DE3) taşıyıcı hücresi gibi ökaryotik proteinlerin tercih ettiği ancak *E.coli*'de nadir kullanılan kodonların üretimi arttırılmış genetik olarak modifiye suşlar kullanmaktır.

- Pet ekspresyon sistemleri

Rekombinant protein üretiminde ticari olarak kullanılan farklı promotor içeriklerine sahip sistemler bulunmaktadır. Tac promotörü içeren pGEX, aeaBAD (arabinoz)

promotoru içeren pBAD ve Trc promotorlu pTrc örnek verilebilir. Bu tez çalışmasında bakteriyel sistemde rekombinant protein üretmek amacıyla kullanılacak ve ticari olarak çok sık tercih edilen sistem T7 promotorlu ve lac operatör sistem bazlı pET sistemleridir. Bu tezde kullanılacak olan pET-28a plazmit vektörü, klonlamada ve rekombinant protein üretiminde kullanılacak olan vektördür. Vektör üzerinde lac represör proteinini kodlayan lacI geni, T7 promotoru, lac operatör bölgesi, çoklu klonlama bölgesi, kanamisin direnç kaseti, flve colE1 replikasyon orijinleri bulunmaktadır. Klonlanmak istenen hedef gen T7 promotoru ve lac operatör bölgenin 5' ucuna klonlanır. BL21 (DE3) suşunda lacUV5 promotor kontrolündeki operonun önünde T7 RNAP bulunduğundan IPTG ile indüklenen lac promotoru ile enzimi oluşturacak gen ifadelenir. Böylece ortamda T7 RNAP bulunduğu ve lac operonu engellenmediğinde pET vektöründe bulunan hedef gen mRNA'ya transkripsiyonu olur ve sonrasında istenen proteinin translasyonu gerçekleşir. Pet sistemlerinde bulunan altı histidin yanyana gelmesiyle oluşan 6xHis işaretiyle veya amino terminaline eklenen 6xHis işaretleri protein saflaştırma süreçlerinde kolaylık sağlar.

2.2.2.3. Protein saflaştırma yöntemleri

Biyoteknolojide rekombinant protein üretim basamaklarından bir diğeri üretilen proteinin saflaştırılmasıdır. Bu amaçla günümüzde birçok teknik geliştirilmiş ve halen gelişmektedir. Protein saflaştırma teknikleri tek basamaktan çoklu basamaklara kadar çok yollu olabilmektedir. Genellikle arzu edilen saflığa ulaşmak amacıyla birden fazla yol tercih edilir. Bu sistemlerde temel olan en etkili yöntemin seçilmesiyle maksimum verim, minimum saflaştırma basamağıdır. Her saflaştırma basamağında elde edilen proteinin verimi düşmektedir. Bu yüzden en akılcı yöntem ile arzu edilen protein verimi sağlanmalıdır. Günümüzde kullanılan birçok protein saflaştırma yöntemi aslında kromatografinin bir çeşitidir. Ancak bununla birlikte diğere saflaştırma teknikleri de mevcuttur. Farklı kromatografi tekniklerinin kullanılması ve bunların kombinasyonları saf protein elde etmek amacıyla sıklıkla kullanılır.

Kromatografi biyolojik bileşenlerin saflaştırılmasında ve teşhis edilmesinde tercih edilen güçlü tekniklerden biridir. Kromatografi temelinde bir karışım içerisinde bulunan hareketli moleküllerin birbirine karışmayan hareketli ve sabit faz olarak

adlandırılan iki faz kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı ayrıştırma yöntemlerine verilen genel isimdir. Kromotografide birçok değişik metod bulunmasıyla birlikte bu metotlar sabit fazın fiziksel yapısına, hareketli ve sabit fazın doğasına ve ayrıştırma mekanizmasına göre belirlenir. Protein saflaştırılmasında tercih edilen ve ayrıştırma mekanizmasına bağlı olarak belirlenen kromotografi çeşitleri; absorpsiyon kromotografisi, partiyon (dağılım) kromotografisi, jel filtrasyon, afinite ve iyon değişim kromotografisidir.

Tez kapsamında kullanılacak afinite kromografisi metoduna ait metal şelat afinite kromografisi açıklaması:

Oldukça hassas seçiciliğe sahip olan afinite kromografisi genel olarak antijen-antikor, enzim-substrat, ilaç-reseptör gibi hassas etkileşimlere dayanır. Afinite kromografisinde ayırımı arzu edilen protein yada protein grupları ile spesifik ligandları arasındaki tersinir etkileşime dayanan bir metottur. Hedef protein uygun koşullarda sabit fazda bulunan spesifik ligandına tersinir olarak bağlanmaktadır. Bağlanamayan proteinler hareketli fazla birlikte akıp giderler. Tutunan hedef proteinlerin salınımı ise spesifik olarak liganda yarışmalı olarak bağlanma sağlayacak moleküllerin verilmesi ile veya spesifik olmadan yalnızca pH gibi ortam koşullarının değiştirilmesi ile olmaktadır. Böylece hedef protein saf şekilde elde edilmiş olur.

Afinite kromografisi; immünoafinite, hidrofobik etkileşim kromografisi, kovalent afinite ve immobilize metal şelat afinite gibi birçok teknik bünyesinde barındırmaktadır. Bu tez kapsamında immobilize metal şelat afinite kromografisi tercih edilmiştir. Bu yöntem özellikle teropötik proteinlerin, peptitlerin, nükleik asitlerin, hormonların ve enzimlerin saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Hedef proteinler metal iyonlarına karşı olan afiniteleri kullanılarak saflaştırılır. Bu ayırım tekniğinde, lewis asiti olarak adlandırılan çift elektron alıcısı olan metal iyonları ile proteinlerin yüzeyinde bulunan elektron verici atomlar (N, S ve O) arasındaki etkileşim ile olmaktadır. Bu etkileşim özellikle proteinlerde bulunan histidin amino asitinin imidazol grubu, triptofan amino asitinde bulunan indol ve sistein amino asitindeki thiol grupları ile olmaktadır. Her proteinin metal şelat olarak kullanılacak divalent veya trivalent katyonlara ilgisi farklıdır. Sıklıkla kullanılan divalent katyonlar

Fe², Co², Ni², Cu², ve Zu²,dir. Bunlar dışında trivalent katyon olarak Fe³ ve Al³'de kullanılmaktadır.

2.3. Deney Tasarımı

Rekombinant protein üretimi birçok faktörün üretimin veriminde etkili olduğu deneylerde maksimum verimde fonksiyonel protein elde etmek amacıyla etkili faktörlerin belirlenmesi ve bunların optimal değerlerinin tespit edilmesi gerekmektedir. İstatistiksel deney tasarım yöntemleri etkili şekilde deneyin planlanmasını ve istatistiksel olarak anlamlı faktörlerin belirlenmesinde oldukça etkilidirler.

Deney tasarımı birçok deneysel tekniğin kullanılmasıyla deney ile ilgili bilgi edinme sistemlerinin tümünü içermektedir. Bu yöntemler, kimyasal formülasyonların oluşturulması, yapıların, bileşenlerin ve materyallerin değerlendirilmesine kadar birçok konuda sıklıkla kullanılmaktadır (46). Özellikle bio-mühendisliğin çalışma konularından olan enzim üretimi, hücre kültürü ve protein, lipid ve aromatik bileşiklerin üretiminin yapıldığı endüstriyel biyolojide tercih edilen güvenilir ve başarılı bir yöntemdir.

Yapılan deneysel çalışmalarda deney sonucu değişik faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu sebepten bu parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda düşük maliyet ve maksimum verim alınması gerekmektedir. Deney tasarımı deney içeriğindeki süreçleri optimize ederek en etkili şekilde hedefe ulaşılmasını sağlamaktadır. İstatistiksel yöntemden farklı olarak kullanılan klasik deneysel yaklaşımların kullanılmasıyla yapılan çalışmalarda etkili faktörlerin ve optimal değerlerinin belirlenmesi için, bir faktörün belirli bir değer aralığında değiştirilerek diğer faktörlerin sabit tutulması gerekmektedir. Bu durum deney sayısını çok artırmakta ve faktörlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin araştırılmasını güç kılmaktadır. Ancak istatistiksel yaklaşım olan deneysel tasarımlarda zaman ve maliyetten tasarruf sağlayacak şekilde deney sayısını belirleyebilen yöntemler mevcuttur. Genellikle kullanılan deney tasarım yöntemleri;

tam faktöriyel dizayn, kısmi faktöriyel dizayn, Plackett-Burman, Taguchi, Box-Behnken ve merkez kompozit dizayn (CCD)'dan oluşmaktadır (46,47). Yapılan bu tez çalışmasında deney tasarımı ve veri analizleri iki seviyeli kısmi faktöriyel dizayn olan Plackett-Burman ve Box-Behnken dizaynları kullanılarak yapılmıştır.

2.3.1. Plackett-Burman tasarımı

Plackett ve Burman tarafından 1946 yılında geliştirilen bu tasarım “Hadamard Matriks tasarımı” olarak da bilinen iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımıdır (48). Kısmi faktöriyel dizaynları tam faktöriyel dizaynlardan farklı yanı, kısmi faktöriyel tasarımlarda iyi sonuç alınması için faktör ve seviyelerin olduğunca az sayıda tutulmasına gerek olmamasıdır. Özellikle bio-mühendislik sistemlerinde etkili faktörlerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Plackett-Burman klasik deneysel yaklaşımlardan farklı olarak deneydeki tüm faktörlerin değerlendirilmesini ve değişik kombinasyonlarının oluşturulmasını sağlamaktadır. Böylece pek çok potansiyel faktör arasından önemli faktörlerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Amaç kısıtlı sayıda olan bağımlı değişkenlerin varyansını azaltarak L seviyede bağımsız değişkenlere (faktörler) bağlı hesaplanan bazı değerlerin birbirine bağlı olup olmadığını anlamak için yapılan deney tasarım koşullarını elde etmektedir. Ancak bu tasarımda faktörler arası etkileşim ihmal edilmektedir. Faktörler arasındaki etkileşim ihmal edilemediği durumlarda bu tasarım, kesin ana etmen ve kesin etkileşimler arasındaki farkı tanımlamaya izin vermemektedir. Bu durum bozucu etmen (aliasing) olarak adlandırılır (46,47).

Plackett-Burman tasarımı faktör ve seviye sayısının azaltılmadığı, ancak deney sayısının az tutulmasına izin veren bir tasarımıdır. Bu tasarım ile zaman ve maliyetten tasarruf sağlayacak şekilde deney sayısı belirlenebilmektedir. Bu tasarımda N sayıda deney için en fazla N-1 adet faktörle çalışılabilmektedir. PB tasarımları 4'e bölünebilen herhangi bir sayıyla uygulanabilmektedir. Eğer 2-7 arasında faktöre sahip bir deney oluşturulacaksa 12, 16, 20 ... 40'a kadar gözlem sayısına sahip PB tasarımları yapılabilmektedir.

PB tasarımında faktörlerin etkileri y yanıt, β_0 sabit, β_i lineer katsayı ve x_i kodlanmış

faktör seviyelerini göstermek üzere birinci dereceden polinamiyal denkleme koyularak deney sonuçları elde edilir (Şekil 2.4).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i$$

Şekil 2.4.Birinci dereceden polinamiyal denklem

İki seviyeli durumlarda (L=2) 1 veya -1 (Hadamard matrisi) olarak ortogonal matris oluşturulur. Bu metod 4'ün katlarında N sayıda deney içeren matrislerin oluşturulmasında kullanılabilir.

2.3.2. Box-Behnken tasarımı

İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım olan PB tasarımı önemli faktörlerin belirlenmesini sağlasa bile faktörlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin ve optimize koşulların elde edilmesini garanti etmemektedir. Bu amaçla PB tasarımındaki bu eksiklik yanıt yüzeyi analiz metodu (RSM) kullanılarak giderilir ve optimal koşullar elde edilir.

BBD, 3 seviyeli kısmi faktöriyel tasarım olarak Box ve Behnken tarafından geliştirilmiş ve yanıt yüzeyi analizinin yapılmasına olanak sağlayan istatistiksel bir yöntemdir (49,50). İki seviyeli kısmi faktöriyel tasarımda belirlenen ve yeterli olduğu analiz edilen faktörler bu polinamiyal model ile 3 seviyeli analize tabi tutulur. Böylece bu faktörlerin çeşitli kombinasyonlarıyla istatistiksel olarak anlamlı optimal seviyeler tespit edilir. Bu analizin getirdiği avantajlar; 3 seviyenin -1 (düşük), 0 (orta) ve +1 (yüksek) olarak kodlanması, ikinci dereceden bağımsız tasarım oluşturma ve sonuçların kolay bir şekilde düzenlenmesi ve yorumlanmasıdır. Bu analiz özellikle güvenilir bir sonuç verdiği ve deney sayısını azalttığı için oldukça sık tercih edilmektedir (46,48).

BBD analizinde faktörler ve yanıtları arasındaki korelasyon ikinci dereceden

polinomial denklemlerle elde edilmektedir. Y faktör yanıtını, x_i, x_j bağımsız faktörleri, β_0 sabiti, β_i i lineer katsayı, β_{ii} i ikinci dereceden katsayı ve β_{ij} i etkileşim katsayısını belirtmektedir (Şekil 2.5).

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Şekil 2.5. İkinci derecede polinomial denklemler

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Sağlık alanında hastalara verilen hizmetlerin kalitesi, sağlanan tanı ve tedavi seçeneklerinin çeşitliliği ile yapılan bilimsel araştırmaların niteliği, biyoteknoloji alanındaki ilerlemeler ile paralellik göstermektedir.

Sağlık alanında teknoloji geliştirmek, ciddi bilgi birikimi ve yatırıma gereksinim duymaktadır. Bu gereksinimler özellikle bilgi birikimi nedeniyle sektör çoğunlukla gelişmiş ülkelerin ellerinde bulunmaktadır ve bu durum ülkemizi büyük bir maddi yüke sokmaktadır. Peptid yapıdaki ilaçların (biyofarmasötiklerin) tanı ve tedavide yoğun olarak kullanılmaya başlaması, modern biyoteknolojinin yaşamımıza getirdiği önemli yeniliklerden birisi olan rekombinant protein eldesine ayrı bir önem kazandırmaktadır. İhtiyaç duyulan proteinler, doğal kaynaklardan saflaştırılmaya ve elde edilmeye çalışıldığında beklenen verim çoğunlukla alınamamaktadır. Bu da standart formülasyon hazırlanmasında maliyetlerin çok yükselmesine neden olmaktadır. Ayrıca, insan dışı organizmalardan elde edilen ürünlerde immünojenite sorun yaratırken, insan kaynaklı ürünlerde ise, enfeksiyon riski tamamen ortadan kaldırılamamaktadır. Tüm bu nedenler ile kullanılacak biyofarmasötiklerin, tanımlanmış koşullarda mikrobiyal fabrika hücrelere sentezlettirilmesi, yani heterolog rekombinant olarak üretilmesi en uygun alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yukarıda belirtilen sebepler göz önünde bulundurulduğunda ülkemizdeki bu eksikliğin giderilmesi ve maddi yükün hafifletilmesi amacıyla bu ve benzeri terapötik rekombinant proteinlerin üretim süreçlerine ilişkin bilgi birikiminin artırılmasına yönelik çalışmalar özel olarak ele alınmalıdır. Özellikle interferon gama ve alfa gibi tıpta tedavi amaçlı kullanılan peptidlerin rekombinant olarak sentezlettirilmesi ve biyoaktif formda saflaştırılabilmesi süreçlerinin optimizasyonu çok büyük bir önem arz etmektedir.

Bakterilerin yer aldığı prokaryotik üretici sistemleri kullanarak rekombinant protein üretimi biyoteknoloji alanında son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmektedir. Bakteriler gerek uygun indüksiyon koşullarının bulunması, gerek basit ve pahalı olmayan kültür ortamlarında rahatlıkla üretilebilmesi rekombinant protein üretiminde

endüstri için her zaman elverişli olmuştur. Proteinler yaşam için gerekli olan yapısal ve düzenleyici moleküllerdir. Günümüzde interferon gamma gibi bazı proteinler terapötik olarak da kullanılmaktadırlar (51).

İnterferon gama (IFN- γ) veya tip-2 interferon, hücre-içi bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı ve tümör kontrolünde doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminde kritik bir rol oynayan sitokin olarak da bilinen, glikoproteinlerin en büyük sınıfı içerisinde yer almaktadır. IFN- γ , önemli bir makrofaj aktivatörü olmasının yanı sıra, viral replikasyonu engellemekte, bağışıklık sistemini indükleyici ve düzenleyici etkiler göstermektedir. IFN- γ 'nın, ağırlıklı olarak doğal bağışık yanıtın bir parçası olan doğal öldürücü hücreler ve kazanılmış bağışık yanıtın bir parçası olan CD4+ Tip-1 yardımcı T (Th1) lenfositler ve CD8+ sitotoksik T (CTL) lenfositler tarafından üretildiği bilinmektedir (52).

IFN- γ ile yapılan klinik çalışmalarda kronik granülomatöz hastalıklarda tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda IFN- γ 'nın osteopetrozis tedavisinde oldukça etkili bir teropötik ajan olduğu gösterilmiştir (53).İnterferon gama, bağışık yanıtı, immün sistem ile ilgili genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi yoluyla kordine etmektedir. Bunların içerisinde patojen tanınmasında artış, antijen işleme ve sunum, antiviral etki, lökosit trafiği ve apoptosis mekanizması üzerindeki etkileri gibi bağışıklık sistemi için oldukça önemli hücresel etkileri bulunmaktadır (4,7). Bunlara ek olarak, aksesuar hücreler olan monositlerin ve makrofajların aktivasyonu T hücrelerden salınan IFN- γ gibi sitokininler ile yapılmaktadır. Bu aksesuar hücreler hem doğal bağışıklık sisteminde hem de yüksek özgülüğe sahip kazanılmış bağışıklık sisteminin cevabının oluşturulmasında oldukça önemli aracı moleküller oluşları sebebiyle çok büyük bir öneme sahiptirler (54). Biyoaktif rekombinant IFN- γ 'nın üretim süreçlerinin geliştirilmesi, endüstrinin talep ettiği bu ve benzeri ilaç olarak kullanılabilecek fonksiyonel peptitlerin üretim süreçlerinin de geliştirilmesi ve iyileştirilmesi için gerekli bilgi birikimine katkıda bulunacaktır. Bu yüzden hem tıp hem biyoteknoloji alanında rekombinant proteinler hayat kurtarıcı ve tedavi edici özellikleri sebebiyle önemli bir yer teşkil etmektedirler. Ne yazık ki, insan proteinlerinin hastalıkların tedavisindeki önemi uzun zamandan beri biliniyor

olmasına rağmen, insan dokularından sadece çok küçük miktarlar elde edilebilmektedir. Bununla birlikte, terapötik kullanım için yeterli miktarda kaliteli insan proteini üretmek biyoteknoloji sayesinde artık mümkündür. Ancak yurt-dışı kaynaklı olan bu rekombinant proteinlerin kullanımları ülkemize çok ciddi maddi bir yük getirmektedir. Ülkemizde biyofarmasötik özellikle rekombinant insan proteini üretimi konusundaki bilgi birikiminde eksiklikleri göz önünde bulundurduğumuzda biyoaktif rekombinant insan IFN- γ üretimi büyük önem arz etmektedir. Uzun dönemde, ilaç olarak kullanılacak fonksiyonel rekombinant insan İnterferon Gama prototip çalışmalarıyla elde edilen teknolojik birikim ve deneyim sayesinde bu ve benzeri terapötik rekombinant proteinlerin bakteri üretici sistemler kullanarak büyük miktarlarda ve ucuz olarak üretilip tedavi maliyetlerini azaltmak hedeflenmektedir.

Bu tez çalışmasında, rekombinant insan IFN- γ üretimi, bakteri ekspresyon sisteminde denenecektir. Bu amaçla elimizde bulunan *Escherichia coli* konak hücreleri ve uygun ekspresyon vektörü kullanılacaktır. Rekombinant proteinin üretim ve saflaştırma süreçlerinin optimizasyonu, her aşamada poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ve western blot ile doğrulanacaktır. Prokaryotik üretici sistemden elde edilip saflaştırılan rekombinant insan IFN- γ proteini etkinlik deneyi IFN- γ ile muamele edilmiş SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanarak süpernatantlardaki C1q düzeyleri sandviç ELISA tekniği ile tayin edilecek aynı zamanda MTT testi uygulanacaktır.

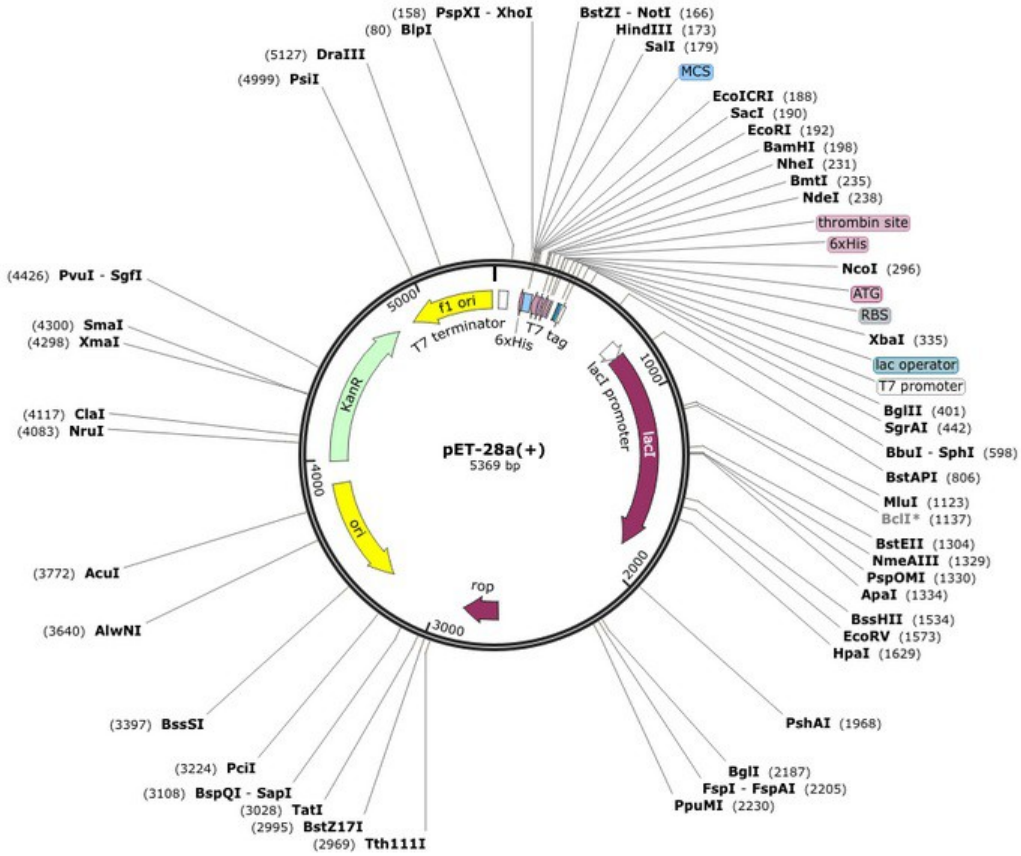
4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Bakteri suşları ve plazmit

Tez çalışmasında interferon gama üretimi amacıyla bakteri konakçı hücresi olarak *E.coli* (K12) bakterisine ait olan suşlar kullanılmıştır. *E.coli* klonlanma ve protein üretimi gibi konularda üretim kolaylığı ve düşük maliyet sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Hedef genin üretiminde klonlama aşamasından sonra transformasyon verimini artırmak amacıyla öncelikle *E.coli*'nin JM109 suşu tercih edilmiştir. JM109, endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15] genotipine sahiptir. Zengin içeriğe sahip olmayan ve maliyetsiz besiyerinde kolayca üreme yeteneğine sahiptir. Ancak, ekspresyon deneylerinde kullanıma uygun bir suş değildir. Bu amaçla tez kapsamında, bakteri konakçı hücresi kullanılarak IFN-γ'nın ekspresyonu BL21(DE3) suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. BL21 (DE3), F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr.genotipine sahiptir.

Tez çalışmasında kullanılan vektör pET-28a vektörüdür (Şekil 4.1). İnterferon gama proteinini kodlayan genin eldesi amacıyla, NK3.3 hücrelerinin, U937 makrofaj hücre hattı ile kokültürü yapılmıştır. İnterferon gama geninin ifadesinin indüklenmesi için ortama *Escherichia coli* O157:H7 lipopolisakkaridinin fenol ekstraktı eklenerek 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından hücrelerden RNA izolasyonunun ardından ters transkriptaz enzimiyle cDNA eldesi sonucunda uygun primerler yardımıyla polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile elde edilip klonlanmıştır. Tez kapsamında bakteriyel üretici sistemler yardımıyla üretimi gerçekleştirilecek interferon gama proteini, pET-28a vektörüne yapılan klonlama kullanılarak yapılmıştır. IFN-γ'nın klonlama işlemleri ise üzerinde N-terminal histidin, trombin ve T7 promotor bölgesi bulunan, kanamisin direnç kasedine sahip PET ekspresyon sistemlerine mensup pET-28a vektörü ile yapılmıştır.



Şekil 4.1.pET-28a vektörü

4.1.2. Tampon ve çözeltiler

4.1.2.1. Bakteri kültür ortamı, besiyerleri

Tez kapsamında kullanılan *E.coli* suşlarının devamlılığı Luria-Bertani (LB) sıvı ve katı besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Transformasyon ve ekspresyon öncesi besiyeri olarak, zenginleştirilmiş SOC besiyeri kullanılmıştır. Klonlama sırasında ve sonrasında vektöre uygun seçici antibiyotik kullanılmıştır. Bakteri vektörü olan pET28a için 50 µg/ml çalışan konsantrasyona sahip kanamisin seçici antibiyotiği kullanılmıştır. Bakteri kültürlerinin inkübasyonu 37°C sıcaklığında, ekspresyonu ise 37°C, 29.5°C ve 22°C sıcaklıklarında yapılmıştır.

Çizelge 4.1. LB sıvı besiyeri içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
NaOH	0.001 N

Çizelge 4.2. LB katı besiyeri içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
Agar	15 g/l
NaOH	0.001 N
H ₂ O	

Çizelge 4.3. LB-kanamisinli katı besiyeri içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Trypton	10 g/l
Maya	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
Agar	15 g/l
NaOH	0.001 N
Kanamisin	0.05 mg/ml
H ₂ O	

Çizelge 4.4. SOC besiyeri içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	20 g/l
Maya	5 g/l
Agar	15 g/l
NaCl	0.5 g/l
NaOH	0.001 N
KCl	0.003 M
Glukoz	0.020 M
MgSO ₄	0.010 M
MgCl ₂	0.010 M
H ₂ O	

Çizelge 4.5. Bakteri ekspresyon besiyeri içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	%1
Fosfat Tamponu pH 7.5/5.5	0.1 M
IPTG	0.0002 M
Kanamisin	0.050 mg/ml
LB	

Kullanılacak antibiyotik, magnezyum klorür, magnezyum sülfat, glukoz ve kalsiyum

klorür dışındaki tüm malzemeler birlikte otoklavlandıktan sonra steril bir şekilde besiyerine eklenmelidir. Tüm besiyerleri 121°C'de, 15 dakika, 1 atmosfer basınç altında otoklavlanmıştır. Agar besiyerleri ise polimerleşmeyecek kadar soğutulduktan sonra steril ortamda petrilere, her petriye 15 – 20 ml olacak şekilde dağıtılmıştır.

4.1.2.2. Nükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması

Çizelge 4.6. Alkalen lizis I çözeltisinin içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl (pH 8.0)	25 mM
Glukoz	50 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

Çizelge 4.7. Alkalen lizis II çözeltisi içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
NaOH	0.2 N
SDS	%1
<ul style="list-style-type: none">• Bu çözelti taze hazırlanıp kullanılmalıdır.• Önce NaOH, suya eklenir. Sonrasında üzerine SDS <u>yavaşça</u> koyulur.	

Çizelge 4.8. Alkalen lizis III çözeltisi içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Glasiyel Asetik Asit	11.5 ml
5M Potasyum Asetat	60 ml
H ₂ O	28.5 ml

Çizelge 4.9. Guanidin bazlı saflaştırma tamponu

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Na ₂ SO ₃	50 mM
GuHCl	5 M
Sodyum Asetat pH 5.2	21.5 mM
Bromtimol Mavisi	0.2x
H ₂ O	

Çizelge 4.10. Seçici nükleik asit saflaştırması

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl pH 7.2	5 mM
EDTA	0.5 mM
PEG-6000	%13
MgCl ₂	10 mM
H ₂ O	

4.1.2.3. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar

Çizelge 4.11. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon stok çözeltileri

Tampon	Hazırlanan Stok	Malzemeler	1 lt için
TBE	5X	Tris Baz	54 g
		Borik Asit	27.5 g
		EDTA (0.5 M) (pH 8.0)	20 ml
TAE	50X	Tris Baz	242 g
		Glasiyel Asetik Asit	54.1 ml
		EDTA (0.5 M) (pH 8.0)	100 ml

4.1.2.4. Transformasyon çözeltileri

Çizelge 4.12. Bakteri transformasyonunda kullanılan TSS içeriği ve hazırlanışı

	Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
TSS İçeriği	MgSO ₄	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
	DMSO	% 5
	PEG-6000	% 10
Hazırlanışı (10 ml için)	<ul style="list-style-type: none">• 1 g PEG6000 tartılır ve 6-7 ml LB içerisinde çözülür.• Üzerine 100 µl 1 M MgCl₂ ve 100 µl MgSO₄ eklenir. Total hacim 9,5 ml'ye LB ile tamamlanır.• Bu çözelti 0.2'lik filtreden süzülüp, steril edilir.• Üzerine 475 µl DMSO (steril) eklenir.• Çözelti, vortekslenerek kullanıma hazır hale getirilir.	

4.1.2.5. Poliakrilamid jel elektroforezinde ve sonrasında kullanılan tamponlar

Çizelge 4.13. Yürütme jelinin içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl pH 8.8	0.375 M
Akrilamid Stoğu (%30)	%14
SDS	%0.1
APS	%0.05
TEMED	%0.05
H ₂ O	

Çizelge 4.14. Hizalama jelinin içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl pH 6.8	0.125 M
Akrilamid Stoğu (%30)	% 3.750
SDS	% 0.100
APS	% 0.050
TEMED	% 0.050
H ₂ O	

Çizelge 4.15. Örnek yükleme çözeltisinin içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl pH 6.8	0.313 M
Gliserol	% 30
SDS	% 5
2-Merkaptoetanol	% 0.5
Brom Fenol Mavisi	% 0.003
H ₂ O	

Çizelge 4.16. Poliakrilamid jel elektroforez tamponu

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris Baz	0.125 M
Glisin	0.960 M
SDS	% 0.5
H ₂ O	

Çizelge 4.17. PBS içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
KCl	2.680 mM
H ₂ PO ₄	1.470 mM
NaCl	136.890 mM
Na ₂ HPO ₄	8.100 mM
H ₂ O	

4.1.2.6. Western blot yönteminde kullanılan tampon ve çözeltiler

Çizelge 4.18. Transfer tampon 10X stok çözeltisi

Malzemeler	1 lt için
Tris Baz	30.3 g
Glisin	144 g
H ₂ O	

Çizelge 4.19. Transfer tampon 1X içeriği

Malzemeler	1 lt için
Transfer Tampon (10X)	100 ml
Metanol	200 ml
H ₂ O	
<ul style="list-style-type: none">Taze hazırlanmalıdır.	

Çizelge 4.20. TBS 10X stok çözeltisi

Malzemeler	1 lt için
Tris-Cl	24.23 g
NaCl	80.06 g
H ₂ O	

Çizelge 4.21. TBST 1X içeriği

Malzemeler	1 lt için
TBS (10X)	100 ml
Tween-20	1 ml
H ₂ O	
<ul style="list-style-type: none">• Taze hazırlanmalıdır.	

Çizelge 4.22. Bloklama solüsyonu içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
BSA	% 5
TBST (1X)	

Çizelge 4.23. Primer antikor içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Anti-His ₆ Tag Antikoru	0.5 µg/ml
TBS (1X)	

Çizelge 4.24. Sekonder antikor içeriği

Malzemeler	Çalışan Konstrasyon
Anti-Fare poli-HRP Antikoru	0.8 µg/ml
TBS (1X)	

Çizelge 4.25. Visiglo plus ile boyama

Malzemeler	1.2 ml için
A Çözeltisi	133 µl
B Çözeltisi	266 µl
TBS (1X)	

Çizelge 4.26. Jel fiksasyon çözeltisi içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsatrasyon
Glasiyel Asetik Asit	% 10
İzopropanol	% 25
H ₂ O	% 65

Çizelge 4.27. Ponceau S boyasının içeriği

Malzemeler	100 ml için
Ponceau S	0.1 g
Glasiyel Asetik Asit	5 ml
H ₂ O	

Çizelge 4.28. Commasie boyasının içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Commasie Brilliant Blue G-250	%0.006
Glasiyel Asetik Asit	%10
H ₂ O	

4.1.2.7. Protein ekstraksiyon tamponları

Çizelge 4.29. Bakteriyel protein ekstraksiyon çözeltisi

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris Tampon pH 8.0	0.05 M
NaCl	0.4 M
Gliserol	%10
Tween-20	%0.5
Triton X-100	%0.5
SDS	%1
H ₂ O	

4.1.2.8. Protein saflaştırma tampon ve çözeltileri

Çizelge 4.30. Kromotografi bağlanma tamponu

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris Tampon pH 8.0	0.05 M
NaCl	0.5 M
Gliserol	%10
H ₂ O	

Çizelge 4.31. Kromotografi elüsyon tamponu

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris Tampon pH 8.0	0.05 M
NaCl	0.5 M
Gliserol	%10
İmidazol	0.5 M
H ₂ O	

Çizelge 4.32. PEG protein çöktürme çözeltisi

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
PEG	%15
NaCl	0.5 M
H ₂ O	

Çizelge 4.33. Saf bakteriyel protein çözme çözeltisi

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris Tampon pH 8.0	0.05 M
NaCl	0.25 M
Gliserol	%10
H ₂ O	

4.1.2.9. Protein miktar tayininde kullanılan çözeltiler

Çizelge 4.34. Bradford 1X tampon

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Commassie BB G-250	0.1 g/l
Fosforik Asit	%8.5
Etanol	%4.75
H ₂ O	

Çizelge 4.35. Standartlar

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Bradford Tampon	1X
Tampon/H ₂ O	0.1 M
BSA	x
H ₂ O	
<ul style="list-style-type: none">• BSA Standartları 2 ug/ul stoktan çalışan konsantrasyonu 1ug/ul 0.8 ug/ul 0.6 ug/ul 0.4 ug/ul ve 0.2 ug/ul olacak şekilde hesaplanmıştır.	

4.1.2.10. Hücre kültüründe kullanılan hücre hattı ve besiyeri

Tez kapsamında IFN- γ geninin mRNA eldesi ve protein aktivite deneyleri amacıyla U937 insan lösemi monosit lenfoma hücre hattı, insan doğal öldürücü hücre hattı olan NK 3.3 ve interferon gama etkinlik deneyi amacıyla SH-SY5H insan nöroblastom hücre hattı kullanılmıştır.

Lenfoblastik bir morfolojiye sahip olan U937 hücre hattı özellikle monositik karakter gösterdiği için in-vitro koşullarda monositlerin ve makrofajların farklılaşma deneylerinde model olarak kullanılmaktadır. Myeloid hücre hattı olan U937, IL-1 ve GM-CSF gibi birçok sitokin ve kemokin salgılama özelliğine sahiptir.

NK hücreleri bakteri, fungus ve maya gibi mikroorganizma kaynaklı enfeksiyonlar ile savaşabilen ve antimikrobiyal aktivitesi bulunan hücrelerdir. Aynı zamanda bu hücrelerin influenza, herpes ve hepatit gibi virüslerin sebep olduğu enfeksiyonlarda hücreleri hedefleme ve öldürme yetenekleri bulunmaktadır. Doğal olarak sitotoksik özellik gösteren bu NK hücreleri, çeşitli sitokin ve interferonlar ile reseptör aracılı etkileşimler göstererek etkilerini arttırmaktadırlar. NK hücreleri ile etkileşime giren ajanlar, bu hücrelerde IFN- γ üretimini indüklerler. İnsan doğal öldürücü hücre hattı

olan NK 3.3, morfolojik, histokimyasal ve fenotipik karakterler bakımından NK hücrelerinin büyük bir kısmını içeren büyük granüler lenfosit (LGL) popülasyonu ile benzerlik gösterirler. NK 3.3 hücreleri CD3-, CD4-, CD8-, CD2+, CD16+, CD56+ olan hücre hattıdır. Bu hücreler IL-12 veya interferonlar, IL-12 veya IL-15 gibi sitokinler ile aktivite edildiklerinde interferon gama salgıladıkları görülmüştür (55).

SH-SY5Y hücre hattı, insan kemik iliğinden köken alan SK-N-SH hücrelerinin 3 kez pasajlanması sonucu elde edilen nöroblastoma hücreleridir. Bu hücrelerde dopamin beta hidrolaz aktivitesi bulunmaktadır aynı zamanda asetilkolinergik, glutamaterjik and adenzinerjik olarak da bilinmektedir. SH-SY5Y hücreleri glutamati nörotransmitter olan GABA'ya çevirebilme özelliğine sahiptirler (56).

Çizelge 4.36. U937 ve NK 3.3 hücre hattı besiyeri içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
L-Glutamin	4 mM
FBS	%10
Penisilin/Streptomisin	100 U/ml ve 100 ug/ml
RPMI 1640	

Çizelge 4.37. SH-SY5Y hücre hattı besiyeri içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
FBS	%10
L-Glutamin	2 mM

U937 hücrelerinin üretimi, U937 (Çizelge 4.36) besi ortamı ile T25 cm² hücre kültürü

üretim kabında (flask) yapılmıştır. 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Akışkan özellik gösteren bu hücrelerin değişimleri ise gereksinimlerine bağlı olarak 2-3 günde bir yapılmıştır.

NK 3.3 hücreleri 5 ml besiyerinde (Çizelge 4.36) T25 cm² hücre kültürü üretim kabında (flask) yapılmıştır. Hücre yoğunluğu 2-3 x 10⁵ olduğunda pasajlanmıştır.

Hücreler ile çalışma 6-8 x 10⁴ hücre yoğunluğuna ulaştığında yapılmıştır.

SH-SY5Y hücre hattı Çizelge 4.37 belirtilen besiyeri içerisinde T25 cm² hücre kültürü üretim kabında (flask) yapılmıştır. 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir.

4.1.2.11. Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) analizinde kullanılan çözeltiler

Çizelge 4.38. MTT çözeltisi içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
MTT	5 mg/ml
PBS	

Çizelge 4.39. MTT çözücüsü içeriği

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
HCl	4 mM
Nondet P-40 (NP40)	%0.1
İzopropanol	

4.2. Yöntem

4.2.1. Cam ve plastik malzemelerin ve çalışılacak alanın hazırlanması

Tez deneyleri esnasında kullanılacak tüm malzemeler steril olarak kullanılmıştır. Falkon tüpleri, pipet uçları gibi plastik malzemeler tek kullanımlık olarak tercih edilmiş ve kullanılmıştır. Cam malzemeler ise her kullanım sonrası %10'luk çamaşır suyunda bekletilmiş vealconox adlı deterjanla uygun şekilde yıkanmış, ardından da otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Otoklav, 121°C' de 15 dakika 1 atmosfer basınçta yapılmıştır. Otoklavlanamayacak herhangi bir malzemenin temizliği ise %10 çamaşır suyu ya da %70'lik alkol ile sağlanmıştır.

Çalışılan alan, çalışma öncesi ve sonrasında %10'luk çamaşır suyu ve ardından da %70'lik masa alkolü ile temizlenmiştir.

4.2.2. Mikrobiyolojik yöntemler

4.2.2.1. Kültürlerin hazırlanması

Her bir bakteri kültürünün ekimleri, ateş yanında ve her seferinde ateşte steril edilen özeler yardımı ile uygun besiyerlerine yapılmıştır. Ekimler genel olarak sıvıdan sıvıya ve katıya, katıdan sıvıya ve katıya yapılmıştır. Katıya yapılan ekimlerde tek koloni ekim tekniği kullanılmıştır.

4.2.2.2. Kültürlerin stoklanması

Tez kapsamında kullanılan Escherichia coli bakterileri katı ve sıvı besiyerlerinde aseptik şartlara uygun olarak çoğaltılmıştır. Önceden -80°C sıcaklıkta stokları yapılan JM109, BL21(DE3) suşlarını çoğaltmak amacıyla katı Luria-Bertani (LB) besiyerine ekimleri yapıldı ve 37°C sıcaklıkta gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Üremesi gerçekleşen her bir suş -80°C sıcaklıkta stoklamak amacıyla %30 gliserol içeren LB sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Katı besiyerinden stok yapılacak kültürler

steril öze yardımıyla toplanarak 2 ml mikrosantrifüj tüplerindeki 500 µl %30 gliserol içeren LB buvyon içerisinde homojen bir şekilde süspanse edilip -80°C sıcaklığına kaldırılmıştır. Sıvı besiyerinden stok yapılacak kültürler ise, üremiş kültürden alınan 1 ml bakteri veya maya süpansiyonu pellet elde etmek amacıyla 10kxG ivme ile 5 dk santrifüj edilmiştir. Ardından üstteki besiyeri uzaklaştırılarak kalan bakteri veya maya pelleti 500 µl %30 gliserol içeren LB buvyon içerisinde homojen olarak süspanse edilip -80°C sıcaklığına kaldırılmıştır.

4.2.3. U937 ve NK 3.3 hücre hatlarının ko-kültürü ve indüksiyonu

U937 ve NK 3.3 hücre hatları %10 fetal bovin serum (FBS), 100 µg/ml streptomisin, 100 U/ml penisilin ve 4 mM L-glutamin içeren RPMI besiyeri içerisinde ko-kültür (eş kültür) yapılmıştır. Kültür, steril koşullar altında 37°C derecede, %5 CO₂ ihtiva eden etüvlerde inkübe edilmiştir. Hücre çoğalmalarının değerlendirilmesi hücreler için 96 kuyulu plaklarda kültüre edilerek, ko-kültürlerin ise 6'lı veya 24'lü plaklarda tekli, ikili, üçlü hücre kültürü yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Ko-kültürden IFN-γ geni ifadesini indüklemek amacıyla ortama *E.coli* O157H7 lipopolisakkarit (LPS) fenol özütü eklenerek 6 saat boyunca 37°C derecede %5 CO₂ ihtiva eden ortamda inkübe edilmiş, ardından hücrelere trizol ile RNA izolasyonu yapılmıştır.

4.2.4. Nükleik asit izolasyonları ve kalite kontrolleri

4.2.4.1. U937 ve NK 3.3 ko-kültür hücrelerinden Trizol ile RNA izolasyonu

U937 ve NK 3.3 ko-kültürünün LPS ile indüklenmesinin ardından IFN-γ mRNA izolasyonu amacıyla yapılan RNA izolasyonu, Ambian firması ait trizol kullanılarak yapılmıştır. Trizol dışında kloroform, izopropanol, %75 etanol, Rnaz içermeyen su kullanılarak gerçekleştirilen RNA izolasyon protokolu aşağıdaki gibidir:

- Örneklerin homojenize edilmesi

1. Yaklaşık 1×10^5 hücre içeren her 0.25 ml'lik örneğe 0.75 ml trizol eklenir ve 4-5 defa pipetaj yapılarak hücrelerin lize olması sağlanmıştır.

2. Homojenize olan hücreler fenol ile faz ayrımı basamağından önce oda sıcaklığında 12 saat veya -60°C ile -70°C derecedeki sıcaklıklarda 1 ay saklanabilir.

- Faz ayrımı

1. Homojenize edilmiş örnekler eğer dondurulmuş ise nükleoprotein komplekslerinin tam olarak çözünmesi amacıyla 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir.

2. Her 1 ml trizol içeren homojenata 0.2 ml kloroform eklenir ve 15 saniye elde kuvvetlice çalkalanmıştır.

3. 2-3 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir.

4. $12 \times g$ 4°C 'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj ardından elde edilen fazlardan üst kısımda RNA içeren faz temiz alınmıştır.

- RNA çöktürmesi

1. Elde edilen üst faza 5-10 μg Rnaz içermeyen glikojen eklenmiştir.

2. Her 1 ml trizol içeren homojenattan elde edilen ve RNA içeren sıvı faza 0.5 ml %100 izopropanol eklenmiştir.

3. 10 dakika oda ısısında ,nkübe edilmiştir.

4. $12 \times g$ 4°C 'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu aşamada elde edilen RNA peletleri görünmez halde elde edilmiştir.

- RNA yıkanması ve çözünmesi

1. Süpernatant uzaklaştırılıp üst faz elde edildikten sonra pelet 1 ml %75 etanol ile yıkanmıştır. Bu aşamada RNA peleti %75 etanol içerisinde -20°C derecede 1 yıl boyunca saklanabilir.
2. Örnek vortekslenmiş ve 7.5kxG 4°C'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı uzaklaştırılmıştır.
3. RNA peleti 5-10 dakika kuruması için bekletilmiştir.
4. Kuruyan RNA peleti 50 µl Rnaz içermeyen su ile çözünmüştür.
5. Çözünen pelet su banyosunda 55-60°C derecede 10-15 dakika inkübe edilmiş ve spektrofotometrik ölçüm ile kalite kontrolü yapılmıştır. Daha sonra cDNA eldesi amacıyla kullanılmak üzere -80°C' sıcaklığına kaldırılmıştır.

4.2.4.2. Alkalen lizis yöntemi (mini/midi prep)

Tez deneyleri boyunca tüm plazmit izolasyonları mini/midi-prep alkalen lizis metodu ile yapılmıştır. Alkalen lizis metodu, istenen plazmidi bünyesinde bulunduran bakteri kültürünün çoğaltılması, bu bakteri kültürünün uygun şartlarda parçalanması ve plazmit DNA'sı ve RNA'nin saf bir şekilde elde edilmesi aşamalarından oluşmaktadır. İstenen plazmit miktarına göre kullanılan bakteri kültürünün miktarı değişmektedir ve alkalen lizis metodu bu miktara göre mini (2 ml), midi (10 ml) ve maxi (1 lt) şekilde uygulanabilir. Tez kapsamında mini ve midi-prep yöntemleri kullanılmıştır.

İstenen plazmidi içeren bakteri kültürünün uygun antibiyotikli ortama tek koloni ekimi sonucu üreyen kolonilerinden bir tanesi seçilerek başlangıç kültürü oluşturulmuştur. Bu taze kültürden uygun miktarda örnek alınarak uygun antibiyotik olan kanamisinli (50 µg/ml) sıvı LB besiyerine ekilmiştir. Gece boyu çalkalamalı inkübatörde, 37°C'de üretilen kültür +4°C'de, 2500xG devirde, 10 dakika boyunca çöktürülmüştür. Süpernatant kısmı uzaklaştırılan pellete, önceden hazırlanan, soğuk alkalen lizis I solüsyonu (Çizelge 4.6) eklenmiş ve pellet vortekslenmiştir. Homojen hale gelen pellet, steril 1,5 ml'lik ependorfa alınmış ve üzerine DNA'ları denatüre

edecek, taze hazırlanmış alkalin lizis solüsyonu II (Çizelge 4.7) eklenmiştir. Vortekslenmeden beş kere ters-düz edilen ependorfların kapakları açılırken denatüre olmuş kromozomal DNA'nın viskoz hali gözlenmiştir. Bu gözlem sayesinde yapılan işlemlerin doğruluğu da teyit edilmiş olmaktadır. Ardından ependorfa soğuk alkalin lizis III solüsyonu (Çizelge 4.8) eklenmiştir ve tekrar beş kere alt-üst edilen örnek, beş dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Alkalin lizis III solüsyonu, denatüre olmuş DNA'ların renatüre olmalarını sağlamaktadır. Plazmit DNA'ları küçük oldukları için hemen kendi üzerlerine olması gerektiği şekilde kapanıp, renatüre olabilmektedirler. Ancak kromozomal DNA, plazmit DNA'sına göre çok daha büyük olduğu için doğru şekilde renatüre olamamaktadır. Buz üzerindeki inkübasyon sonrası 5 dakika boyunca, +4°C'de, maksimum hızda santrifüj edilen örneğin, renatüre olamayan ve bu yüzden de çözünmeyen kromozomal DNA'dan oluşan pellet kısmı ve protein, plazmit DNA'sı ve RNA içerikli süpernatant kısmı gözlemlenir. Örneğin süpernatant kısmı temiz bir ependorf tüpe alınmıştır. Üzerine, proteinlerin uzaklaşmasını sağlamak adına eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) eklenerek vortekslenmiştir. Vorteks sonrası iki dakika maksimum hızda santrifüj edilen örneğin süpernatant kısmı temiz bir tüpe alınarak, üzerine eşit hacimde soğuk %100 izopropanol eklenmiştir. Bu aşamada örnekler -20°C'de inkübasyona kaldırılabilir. RNA izolasyonunda bu işlem verim artırıcı özelliğe sahiptir. Inkübasyon sonrası örnek, beş dakika boyunca, +4°C'de, maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Süpernatantı uzaklaştırılan pellet, eşit hacimde soğuk %70 etanolle yıkanmıştır. Yıkanan pelletlerdeki alkolün tamamen uzaklaştığından emin olunduktan sonra pellet uygun miktarda suda çözülmüştür. Plazmit DNA'sı izole edilmek isteniyorsa pellet, 20 µg/ml RNase'lı suda çözülmelidir.

4.2.4.3. Spektrofotometrik ölçüm

Elde edilen nükleik asitlerin miktarı, NanoDrop'ta, uygun sulandırılmalar çerçevesinde, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Nükleik asitlerin maksimum absorpsiyon verdiği 260 nm'deki ölçüm kabul edilmiştir. Kirlilikleri ise 260/280 ve 260/230 oranları ile kontrol edilmiştir. 260/280 oranı nükleik asidin protein ile kontaminasyonunu gösterirken, 260/230 oranı nükleik asidin tiosiyanat veya başka organik maddelerce kontamine olup olmadığını göstermektedir. DNA konsantrasyonunun hesaplanması için

50, RNA konsantrasyonunun hesaplanması için ise 40 sabiti kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen eğrinin de düzgünlüğüne bakılmıştır.

4.2.4.4. Agaroz jel elektroforezi

Yükü moleküllerin uygun ortam ve tamponlarda elektrik akım uygulanarak yürütülmesi temeline dayanan elektroforez sistemlerinden agaroz jel elektroforezi ile, elde edilen nükleik asitlerin saflıkları ve boyutlarının belirlenmesi sağlanmıştır. Ayrıca PZT sonrası elde edilen ürünün moleküler ağırlığının belirlenmesinde de agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır.

Saflaştırılan nükleik asitlerin kontrolü, TAE (Tris – Asetik Asit – EDTA) tamponu (Çizelge 4.11) ile hazırlanan %0.8'lik agaroz jelde, 50-60 V'luk elektrik akımlı TAE tampon ortamında yapılan elektroforez ile sağlanmıştır. DNA/RNA örnekleri 6X yükleme boyası ile karıştırılarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir ve örneklerin elektriksel ortamda anottan katoda hareketleri sağlanmıştır.

PZT ürünü kontrolü için ise TAE (Tris – Asetik Asit – EDTA) tamponu ile hazırlanan %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. %2'lik TAE agaroz jele yüklenen örnekler, 100-120 V'luk elektriksel akımlı TAE ortamında koşurulmuştur. %2'lik agaroz jel kullanılmasının sebebi, elde edilecek ürünlerin baz çifti uzunluklarının en iyi bu konsantrasyona sahip jelde görüntülenebilmesidir. Belirteç olarak Seegene ile hazırlanan 100 bç'lik aralıklara sahip 1500 bç'lik markör kullanılmıştır. Seegene moleküler markör bant uzunlukları aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Elektroforez sonrası jeller, DNA'ya bağlanma özelliği bulunan etidyum bromür boyalı tamponda, ışık görmeyecek şekilde bekletilmiş ve ardından VersaDoc görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir. Jel görüntüleri Gimp2 ve Inkscape programları ile düzenlenmiştir.

4.2.5. Moleküler klonlama yöntemleri

4.2.5.1. Moleküler klonlama

Tez deneyleri kapsamında ilgilenilen proteine ait IFN- γ gen bölgesi, mononükleer hücrelerden izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla PZT yardımıyla elde edilmiştir. Elde edilecek ürün beklendiği gibi 431 bç boyunda elde edilmiştir (Şekil 5.5 ve Şekil 5.6). PZT ile elde edilen IFN- γ gen bölgesi, reaksiyonda kullanılan primerler sayesinde klonlamaya uygun hale getirilmiştir. Primerler tasarlanırken uçlarına uygun restriksiyon kesim bölgeleri eklenmiştir. Bu restriksiyon kesim bölgesinin seçiminde; klonlanacak gen ürününün üzerinde bu bölgenin bulunmaması ve klonlamanın yapılacağı vektör üzerinde de tek kesim bölgesi bulunmasına dikkat edilmiştir. Bakteriyel sistemde üretimi gerçekleşecek IFN- γ , bu tez kapsamında üzerinde T7 operonunu barındıran pET ekspresyon sistemlerine ait pET28a vektörüne klonlanmıştır. Bu vektöre klonlanırken en uygun kesimin NheI ve EcoRI restriksiyon kesim bölgeleri olduğu saptanmış ve primerlerin uçlarına NheI ve EcoRI kesim bölgelerine ait olan sırasıyla GCTAGC ve GAATTC palindromik gen dizisi eklenmiştir. Restriksiyon kesiminin ardından T4 ligaz enzimi yardımıyla ligasyona tabi tutulan kesim ürünleri, ligasyon sonrası *E.coli* JM109 suşuna yüksek verimlilikle transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası elde edilen koloniler PZT ile pET28a vektörüne uygun primerler ile taranmış ve beklenen ürün boyu olan 719 bç'dir. Doğru şekilde klonlandığı tespit edilen klonlardan plazmit izole edilmiş ve bu plazmitler, ekspresyon suşu olan BL21 *E.coli* suşuna transforme edilmiştir. Transformasyonu başarılı olan koloniler ekspresyon denemelerine tabi tutulmuşlardır. Ekspresyon sonrasında besiyerinden arındırılan hücreler protein ekstraksiyon tamponu ile parçalanmıştır. Elde edilen protein çözeltilisinden hücre parçaları uzaklaştırıldıktan sonra ekspresyonlar SDS-PAGE ile görsel olarak desteklenmiştir. Uygulanan protokoller ve deneyler aşağıda verilmektedir:

4.2.5.2. cDNA eldesi (ters transkripsiyon)

Hedef protein olan IFN- γ kodlayan genin elde edilebilmesi amacıyla mRNA ekspresyonlarına ilk olarak elde edilen total RNA'ların komplementer DNA'ya

(cDNA) çevrilmesi gerekmektedir. İzole edilen RNA örneği RevertAid Reverse Transkriptaz enzimi tarafından ters transkripsiyona uğratılmıştır. Bu sayede bakteride IFN γ üretimi için özgül olan primerler ile PZT için cDNA elde edilmiştir. RevertAid enzimi, RNaz aktivitesine de sahip olduğu için ortama ek olarak RNaz koyulmamıştır. cDNA eldesi için tüm total RNA havuzundaki küçük poli(A) havuzuna spesifik primerler olan oligo(dT) primerler kullanılır. Komplementer primerler ile RNA sekanslarına bağlandıktan sonra boşta kalan 3'-OH grubundan itibaren reverse transkriptaz enzimi ile cDNA eldesi sağlanır. Bu tez kapsamında oligo (dT) 18 primerleri kullanılarak cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'nın düzgün çalıştığı housekeeping bir gen olan insan beta aktine uygun primerler (F305&R868) yardımıyla yapılan PZT ile kontrol edilmiştir. TT ve beta aktin PZT protokolleri aşağıdaki gibidir:

Çizelge 4.40. Ters Transkripsiyon Protokolü

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
H ₂ O	
Kalıp RNA	350 ng
dNTP Karışımı	2 mM
Oligo dT	100 pmol
65 C'de 5 dakika bekletip anında buza alınır !	
H ₂ O	
RT Tamponu (5x)	1x
Rnaz İnhibitörü (40 μ / μ l)	2 μ / μ l
RevertAid RT Enzimi	5 U/ μ l
Mu-MLV (200 U/ μ l)	

Çizelge 4.41. Ters Transkripsiyon Sıcaklık Döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)	Döngü Sayısı
Uzama 1	25	10	1
Uzama 2	37	40	1
Uzama 3	42	40	1
İnaktivasyon	70	10	1

Çizelge 4.42. Beta Aktin PZT

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
H ₂ O	
SiB Tampon (+Mg)	1x
dNTP Karışımı	0.4 µM
F305 İleri Primer	0.4 µM
R868 Geri Primer	0.4 µM
Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)	0.035 U/µl
Kalıp DNA	5 µg

Çizelge 4.43. Beta Aktin PZT Sıcaklık Döngüsü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (s)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	20	40
Bağlanma	59	60	
Uzama	72	60	
Uzama	72	300	1

4.2.5.3. Polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR/PZT)

İstenen özgül DNA bölgesinin in vitro ortamda çoğaltılması temeline dayanan polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT/PCR), tez deneylerinde üretimi arzu edilen proteinin elde edileceği klonlama sırasında kullanılmıştır. Tüm primer tasarım işlemleri PearlPrimer ve CLC Sequence Viewer programlarında yapılmıştır. Tez deneylerinde kullanılacak protein olan interferon gama proteinini (INF- γ) kodlayan gen bölgesi, bakteri üretici sistemi için yapılan klonlamada mononükleer hücrelerden izole edilen RNA'dan elde edilmiş cDNA'nın kalıp olarak kullanılması ile uygun primerler (ip-f & ip-r) yardımıyla çoğaltılmıştır. Uygun primerler, plazmit dizisine ve sonrasında klonlanacağı vektöre (bakteri üretici sistemi için; pET28a) uygun şekilde tasarlanıp (restriksiyon kesim bölgelerinin eklenmesi), ısmarlanmıştır. Primerlere ait sıcaklık optimizasyonları yapılmıştır. Bakteriyel üretici sisteme özgül primerler için yapılan optimizasyonda optimal bağlanma sıcaklığı 60°C ila 67°C'lik gradiyent PZT ile taranmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pET28a klonlama primerlerinin optimal magnezyum klorür konsantrasyonu 1.5mM, bağlanma sıcaklığı 64°C olarak belirlenmiş ve özgül olmayan amplikasyonlardan kurtulmak amacıyla 64°C ila 54°C'lik inen (touch-down) PZT ile INF- γ gen bölgesi elde edilmiştir.

PET28a klonlama sonucu uygun primerler ile elde edilen INF- γ ürününün boyunun yaklaşık 431 bp olması beklenmektedir ve sonuçlarda da uygun bant boyu elde edilmiştir. Bu uygun primerlerle PZT yapılmış ve INF- γ gen bölgesi çoğaltılmıştır. Klonlama işlemlerinin doğru ilerlediğinin kontrolü de yine PZT ile pET28a için T7 primerleri kullanılarak sağlanmıştır. T7 primerleri (T7-5' & T7-3') ile yapılan koloni tarama ve kontrol PZT'leri; 1,5 mM magnezyum klorür; 0,5 μ M dNTP ve 0,4 μ M primer konsantrasyonları kullanılarak; 54°C bağlanma sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.44. Tez Deneylerin Kullanılan Primerler ve Bağlanma Sıcaklıkları

Primer	Dizisi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı
F305	CTGGGACGACATGGAGAAA	59°C
R868	AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC	59°C
ip-f	ATGCGCTAGCCAGGACCCATATGTAAAAGAA G	64°C
ip-r	ATGGAATTCTTACTGGGATGCTCTTCGAC	64°C
T7-5'	AATTAATACGACTCACTATAGGG	54°C
T7-3'	ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	54°C

Tez kapsamında uygulanan PZT protokolleri Çizelge 4.45, Çizelge 4.46 ve Çizelge 4.47'de yer almaktadır. PZT ortamında yüksek sıcaklığa dayanıklı Taq polimeraz ve Stream polimeraz enzimi, enzimlere uygun tampon ve magnezyum, dNTP, özgül primerler ve kalıp olarak kullanılacak DNA bulunmaktadır.

Çizelge 4.45. Genel PZT protokolü

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon	
H2O		
Tampon	1	X
MgCl2*	1.5	mM
dNTP*	0.3	mM
İleri primer*	0.3	mM
Geri primer*	0.3	mM
Taq DNA/Stream polimeraz	0.050	U/µl
Kalıp DNA*	0.002	ug/ul

*Optimizasyon değişkenleri

Çizelge 4.46. Genel PZT Sıcaklık döngüsü

Basamak	Sıcaklık(°C)	Zaman(s)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	20	40
Bağlanma	59*	60	
Uzama	72	60	
Uzama	72	300	1

*Optimizasyon değişkenleri

Çizelge 4.47. Genel İnen (Touch-Down) PZT Sıcaklık Döngüsü

Basamak	Sıcaklık(°C)	Zaman(s)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	40	40
Bağlanma	64* → 54*	60	
Uzama	72	60	
Uzama	72	300	1

*Optimizasyon değişkenleri

4.2.5.4. Restriksiyon endonükleazlarla kesim

INF- γ ürününün elde edilmesi sırasında kullanılan primerlerin uçlarındaki enzim tanıma bölgesi sayesinde INF- γ ürünü restriksiyon endonükleazlarla kesilebilir hale getirilmiştir. Kesim enzimi seçilirken, enzim tanıma bölgesinin INF- γ üzerinde bulunmamasına dikkat edilmiştir. Klonlamanın yapılacağı pET-28a vektörünün restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi ise kendi bünyelerindeki çoklu klonlama bölgesi sayesinde gerçekleştirilmiştir. Kesim enzimi seçilirken, çoklu klonlama bölgesinde bu enzime ait tek bir tanıma bölgesinin bulunmasına dikkat edilmiştir. Bu koşullar altında seçilen restriksiyon kesim enzimleri pET-28a klonlaması için NheI ve EcoRI'dır. NheI, EcoRI enzimleri, gen dizileri üzerinde bulunan sırasıyla palindromik 5' GCTAGC 3' ve 5' GAATTC 3' dizilerini tanıyıp, yapışkan uç oluşturacak şekilde kesmektedir.

INF- γ 'ya ait PZT ürünü ve bu ürünün aktarılacağı pET-28a vektörü Çizelge 4.48 kapsamında NheI ve EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesimine maruz bırakılmıştır.

Çizelge 4.48. NheI ve EcoRI Restriksiyon Endonükleaz ile Kesim Tepkimesi

Malzeme	Çalışma Konsatrasyonu
Plazmit (pET28a)/Pzt Ürünü (INF- γ)	8 μ g/1 μ g
Kesim Tamponu	1x
BSA	1x
Kesim Enzimi (NheI) (10 U/ μ l)	10 U
Kesim Enzimi (EcoRI) (10 U/ μ l)	10 U
H ₂ O	
İnkübasyon Süresi	60/30 dakika
İnkübasyon Sıcaklığı	37°C
İnaktivasyon Süresi	20 dakika
İnaktivasyon Sıcaklığı	65°C

4.2.5.5. Ürünlerin saflaştırılması

- Silika Matriksli Filtre ile Nükleik Asit Saflaştırma

Moleküler klonlama işlemleri sırasında elde edilen PZT ve kesim ürünlerinin içerlerindeki gereksiz dNTP, enzim ve benzeri malzemelerden kurtulmak için yapılacak olan saflaştırma işlemleri Promega firmasına ait SV total RNA izolasyon kitinde bulunan silika matriksli santrifüj kolonları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla saflaştırılacak nükleik asit örneğine son konsantrasyonu 4M'dan az olmayacak şekilde guanidin eklenmiştir. Çözeltinin pH'sı, 3M sodyum asetat pH 5.0 kullanılarak DNA'nın silikaya etkin bağlanmasının gerçekleştiği düzeylere getirilmiştir. DNA guanidin süspansiyon silika kolondan geçirilmiş, ardından tuz giderimi için iki kez saf

2-propanol ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonrası 2-propanol silika matriksten uzaklaştırılmıştır. Elüsyon işlemi DNaz ve RNaz'lardan arı su ile 50 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Guanidin içerikli tampon ile yapılan saflaştırma protokolü aşağıdaki gibidir:

1. Guanidin içerikli saflaştırma çözeltisinden 446 ul alınarak içerisinde 100 ul saflaştırılmak istenen DNA eklenir.
2. Karışımın rengi sarı oluncaya kadar içerisinde 3 -5 ul Na- asetat pH5.2 eklenerek pH ayarlanır.
3. Karışım, silika filtreye yüklenir ve 4kxG devirde 30 saniye santrifüj edilir. Filtreden geçen karışım alınarak tekrar yüklenir ve işlem tekrarlanır.
4. Filtre iki kere izopropanol ile yıkanır. Yıkama işlemleri 4kxG devirde 30 saniye yapılır.
5. Filtre yüksek devirde 2 dakika santrifüj edilerek alkolden arındırılır ve filtrenin kuruması sağlanır.
6. Silika filtrenin üzerine elüsyon tamponu eklenerek beş dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
7. Inkübasyon sonrası filtre 6kxG devirde bir dakika santrifüj edilir ve elüsyon toplanır.

- Seçici Nükleik Asit Saflaştırması

Moleküler klonlama işlemleri sırasında kullanılacak safsızlık içeren plazmit örnekleri saflaştırılmıştır. Bu amaçla saflaştırılacak nükleik asit örneğini son konsatrasyonu %13 olacak şekilde PEG-6000, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA ve çözeltinin pH'sının uygun olmasını sağlayacak 5 mM tris-Cl pH 7.2 eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılan karışım ardından maksimum hızda 20°C'de 30 dakika

santrifüj edilmiştir. Santrifüj ardından üst kısımda kalan sıvı uzaklaştırılır ve pellet soğuk %70 etanol ile 2 kez olmak üzere maksimum hızda 20°C'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanır. Elde edilen pellet kurumaya bırakılıp saydamlaştıktan sonra 50 µl hacminde 8 mM NaOH içeren DNaz ve RNaz'lardan ari su ile çözülür.

4.2.5.6. Ligasyon

Saflaştırılan kesim ürünlerinin üzerlerinde taşıdıkları yapışkan uçlar sayesinde uygun ortamda birbirlerine yapışmaları sağlanmaktadır. Bu işlem için T4 ligaz enzimi içeren ligasyon tepkimesi yapılmaktadır. T4 Ligaz ortamında, kullanılan enzimin çalışma sıcaklığı olan 22°C'de bahsi geçen kesim ürünleri ligasyona bırakılmışlardır. Uygulanan protokol Çizelge 4.49'deki gibidir.

Çizelge 4.49. Ligasyon

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
T4 Ligaz Tamponu (10x)	1x
T4 Ligaz (5U/µl)	0.5 µg/µl
Vektör (pET28a)	0.05 pmol
İnsert (IFN-γ)	0.2 pmol
H ₂ O	
Vektör Uzunluğu	5000 bç
Vektör Konsantrasyonu	0.03 µg/µl
İnsert Uzunluğu	448 bç
İnsert Konsantrasyonu	0.033 µg/µl
Ligasyon Sıcaklığı	22°C
Ligasyon Süresi	60 dakika
İnaktivasyon Sıcaklığı	65°C
İnaktivasyon Süresi	10 dakika

4.2.6. İnterferon gama dizi analizi

E.coli JM109 suşuna klonlanan IFN-γ gen dizisinin doğruluğunun belirlenmesi amacıyla dizi analizi yapılmıştır. Bu amaçla, moleküler klonlama sonucu başarılı şekilde ilgili geni içeren pET28a plazmitini bulduran bakteri hücrelerinden plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Söz konusu genin plazmit DNA'dan PCR ile

çoğaltılmasının ardından ürünler silika matrisli kolonlar kullanılarak saflaştırılmıştır. Çoğaltma ürünlerinin özgülüğü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş, ürünlerin nicelendirilmesi ve saflık kontrolü ise spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış çoğaltma ürünlerinin dizi analizi Sanger yöntemi ile yapılmıştır. Buna göre dizileme tepkimesi florofor işaretli dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP) terminatörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dizileme ürünlerinin ürüne katılmamış florofor işaretli ddNTP'lerden temizlenmesi için etanol asetik asit çöktürmesinden yararlanılmıştır.

Etanol asetik asit çöktürmesi işleminin tümü buz üstünde yapılmıştır. DTCS PCR sonrası 1.5 ml hacminde steril tüplerde bulunan eldeki dizi ürünlerinin tümüne DTCS çöktürme süspansiyonu eklenmiş, üzerine -20°C sıcaklıkta saklanmış olan %70 etanol eklendikten hemen sonra 18kxG ivme ile +4°C sıcaklıkta 45dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, pellet 200 µl %70 soğuk etanolle iki kere yıkamadan geçirilmiştir. Yıkama sonrası pellet buz üstünde kurumaya bırakılmış, kuruyan pellet 40 µl deiyonize formamid ile süspanse edilmiştir.

Daha sonra örnekler kapiller jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. (Beckman Coulter CEQ™ 8000 Genetic Analysis System) cihazında dizi analizinden geçirilmiştir. Spektrofotometrik ölçüm ve guanidin saflaştırma protokolleri **Nükleik asit izolasyonu ve saflaştırılması ve Nükleik asit izolasyonları ve kalite kontrolleri** başlığında, *gyrA* ve *parC* için kurulan PCR çizelgeleri **Polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR/PZT)** başlığında verilmiştir. DTCS PCR çizelgesi ve DTCS çöktürme reaksiyonu çizelgesi aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.50. DTCS PZT protokolü

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
DTCS Quick Start Mix	1x
DNA	30fmol
Primer	1600fmol
H ₂ O	

Çizelge 4.51. DTCS çöktürme süspansiyonu

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Sodyum asetat pH 5.2	70,60mM
Glikojen	0,24 mg/ml
Na ₂ - EDTA	2,35mM
Dizi Örneği	%17,70
%70 Etanol (-20°C)	%67,10
H ₂ O	

4.2.7. Bakteriyel transformasyon

Bakteriyel transformasyon yapılırken E.coli hücreleri, transformasyona uygun kompetant hücre hale getirilmektedir. Bu işlem esnasında PEG 6000 ve DMSO içerikli TSS çözeltisi kullanılmıştır. Transformasyonda kullanılacak E.coli suşunun mümkün olduğunca taze olması gerekmektedir. Taze kültür sağlamak için kullanılacak suş, 2 – 10 ml'lik LB sıvı besiyerinde gece boyu 37°C'ye ayarlanmış etüvde çalkalamalı inkübasyona bırakılmış ve ön kültürü hazırlanılmıştır. Gece boyu inkübasyonda bırakılan bu taze kültürden, 50 ml LB besiyerine 500 µl alınıp

ekilmiştir. Kültür çalkalamalı inkübatörde 37°C'de OD₆₀₀ nm'deki bakteri bulanıklığı 0.3 – 0.5 arası oluncaya kadar üretilmiştir. Bulanıklık BioRad spektrofotometresinde ölçülmüştür. Bu kültür, 50 ml'lik konik tabanlı steril tüpe alınıp +4°C'de, 574 xG'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantı tamamen uzaklaştırılan pellete, büyüklüğüne bağlı olarak üzere 1 – 5 ml TSS eklenmiş ve pellet bu çözeltide vortekslenmeden çözülmüştür. Bu örnek 15 – 30 dakika arasında buz üzerinde inkübe edilmiştir. Bu esnada transforme edilmek istenen örnekten (plazmit, ligasyon ürünü), 15 ml'lik konik tabanlı tüpün çeperine 5 µl konulmuştur. Buz üzerinde inkübe olan ve kompetan hale getirilmiş bakteri hücrelerinden 100 µl alınıp, çepere bırakılan ürünün üzerinde bırakılmış ve kısa bir süre santrifüjde çevrilmiştir. Kompetan hücreler alınırken kalın pipet uçları tercih edilmiştir. Bir saat buz üzerinde inkübasyonun ardından örneğe, 38 – 42°C'ye ayarlanmış su banyosunda 60 – 90 saniye sıcaklık şoku uygulanmış ve hemen sonrasında zaman kaybetmeden direk buz üzerine alınmıştır. Bu sayede hücrelerin üzerinde oluşan porlardan içeri giren DNA moleküllerinin geri dışarı çıkmaları engellenir. Üzerine 900 µl SOC besiyeri eklenen örnek, 37°C'de bir saat çalkalamalı inkübasyona kaldırılmıştır. İnkübasyon sonrası örnek, ependorf tüpe alınarak santrifüj edilmiş ve süpernatantın bir kısmı uzaklaştırılmıştır. Kalan süpernatant içerisinde süspansiyon edilen pellet, 50 µg/ml kanamisin içeren LB besiyerine cam öze ile yayma tekniği uygulanarak ekilmiştir. Koloni oluşumu için petri, 37°C'lik etüve inkübasyona kaldırılmıştır.

Klonlama sonrasında ligasyon ürünleri, yüksek transformasyon verimine sahip, *E.coli* JM109 suşuna transforme edilmiştir. Bakteriyel transformasyon sonucu kanamisinli LB agara ekilen transformantların gece boyu 37°C'lik sabit inkübatörde inkübe olmaları sağlanmıştır. Başarılı transformasyon sonucu petrilere oluşan kolonilerden uygun klonların seçimi yapılmıştır. Petri üzerinde bulunan koloniler, ilgili antibiyotige (kanamisin) direnç kasedi bulunduran plazmit kolonileridir. Ancak bu kolonilerden sadece bazıları IFN- γ gen bölgesini bünyesinde barındırmaktadır. Diğer koloniler ise pET-28a'ya ait boş plazmit kolonileridir. Uygun gen bölgesini bünyesinde barındıran başarılı transformantlar ile boş plazmit arasında IFN- γ gen bölgesinin büyüklüğü kadar moleküler ağırlık farkı bulunmaktadır. Bu fark, ilgili bölgenin PZT ile taranması ve sonrasında %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi ile anlaşılabilir.

PZT'de yapılacak olan bu tarama esnasında pET-28a'ya yapılan aktarımların kontrolünü sağlayacak olan T7 klonlama kontrol primerleri kullanılmıştır (Çizelge 4.44). T7 primerleri, temel olarak pET-28a üzerindeki çoklu klonlama bölgesini amplifiye etmektedir. T7 primerlerinin boş pET-28a üzerinde amplifiye ettiği parça uzunluğu 300 bç'dir. Çoklu klonlama bölgesine yapılan herhangi bir aktarım sonrasında ise T7 primerleri ile yapılacak PZT sonucu elde edilecek ürün boyunda, aktarılan gen bölgesinin büyüklüğü kadar (IFN- γ için 431 bç) bir artış beklenmektedir. IFN- γ gen ürününün pET-28a vektörüne aktarılması sonrasında T7 primerleri ile yapılacak PZT sonucu beklenen ürün boyu 719 bç'dir.

4.2.8. İnterferon gama üretiminde gerçekleştirilen deney tasarımı

İnterferon gama *E.coli* BL21(DE3) suşundaki üretimin optimizasyonu ve üretimi etkileyen değişkenlerin bulunması amacıyla istatistiksel bir deneysel yaklaşım olan Plackett-Burman ve Box-Behnken deneysel tasarımı kullanılmıştır.

Plackett-Burman ve Box-Behnken deneysel tasarımlarının oluşturulması amacıyla <http://CRAN.R-project.org/> adresinde yer alan yaklaşık 25 adet R paketi Linux işletim sistemi üzerine kurulmuş ve Eclipse IDE programı yardımıyla çalıştırılmıştır.

2 seviyeli kısmi faktöriyel tasarım olan Plackett-Burman deneysel tasarımda koşulların birbirleri ile olan ilişkilerinin ve etkili faktörlerin bulunabilmesi amacıyla altı adet faktör belirlenmiş ve bu faktörlerin düşük ve yüksek olmak üzere 2 seviye üzerinden tasarımları ekte bulunan R-kodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Box-Behnken deneyleri kısmi faktöriyel tasarımda belirlenen önemli faktörler kullanılarak ekte bulunan R-kodu ile gerçekleştirilmiş ve RSM analizi yapılmıştır.

4.2.9. Bakteriyel protein ekspresyonu ve kontrolü

İnterferon gama bakteriyel ekspresyon için BL21(DE3) suşu seçilmiştir. Bu suş, her ne kadar recA⁺ olsa da ekspresyon deneylerinde tercih edilen bakteri kültürü olmuştur. BL21(DE3) *E.coli* suşuna transforme edilen örneklerden bazıları seçilerek

bunlardan starter (ön) kültürler yapılmıştır. Sonrasında bu ön kültürlerden uygun antibiyotikli (50 µg/ml kanamisin) SOC sıvı besiyerlerine yeni kültürler yapılmış ve bu kültürler yapılan üreme eğrisi grafiğine göre OD₆₀₀ nm'de 0.4, 0.6 ve 0.8 bulanıklığa gelinceye kadar çoğaltılmıştır. Uygun bulanıklığa gelen kültürler oda sıcaklığında, 8kxG'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve SOC besiyeri tamamen uzaklaştırılmıştır. Geride kalan pelletler, izopropilthiogalaktosit (IPTG) şekeri konulmuş önceki besiyeri ile eşit hacimdeki ekspresyon besiyeri ile süspansiyon edilmiştir. Ekspresyon denemeleri amacıyla BL21(DE3) hücreleri, 37°C, 29.5°C ve 22°C sıcaklıklarında Finepcr SH30 markalı orbital çalkalayıcı üzerinde 3 hızında olmak üzere ve çalkalamalı inkübatörde 12, 18 ve 24 saat olmak üzere inkübasyona bırakılmışlardır. IPTG, bu tez çalışmasında kullanılan pET28a vektörünün üzerinde bulunan T7 promotorunu harekete geçirerek ekspresyonun başlamasını sağlayan laktoz analogudur ve operonu indükleyici ajandır; ancak, laktozun aksine bakteri kültürü tarafından metabolize edilemez. IPTG, ortamda tükenmediği için operon sistemi açık kalır ve devamlı ekspresyon sağlanır.

Plackett burman tasarımına göre gerçekleştirilen indüksiyon daha sonraki box-behnken analizi amacıyla SDS-PAGE ile kontrolü yapılmış ve elde edilen protein bantları gel analiz programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonuçları, yanıt yüzey analizi metodunda optimal üretim koşulu belirlemek amacıyla box-behnken analizine girilmiş ve IFN-γ ekspresyonu için BL21 (DE3) suşunun analiz neticesinde belirlenen optimal koşullarda inkübasyonu yapılmıştır.

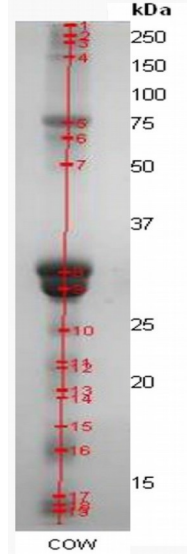
4.2.10. Ekspresyon suşlarının üreme eğrilerinin belirlenmesi

JM109, BL21(DE3) suşunun üreme eğrilerinin saptanması amacıyla bakteri suşu, 0.02 M glukoz içeren SOC buyyonda 37°C sıcaklıktaki çalkalayıcıda bir gecelik kültürleri üretilmiştir. Bir gecelik başlangıç kültürün OD₆₀₀ nm dalga boyunda bulanıklık ölçümleri yapılmış, üreme eğrisinin kaydedileceği kültür, taze 0.02 M glukoz içeren SOC buyyon besiyerinde 0.02 absorbans ünitesi bulanıklık elde edilecek şekilde başlangıç kültüründen uygun miktarda hücrenin aktarılması ile inoküle edilmiştir. İnokülasyonun ardından kültür, 37°C sıcaklıkta çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmeye başlanmıştır. Sigmoidal üreme eğrisinin durağan fazına girilene kadar her saat başı

bulanıklık ölçümü yapılmıştır. Son bulanıklık ölçümü ertesi gün gerçekleştirilmiştir.

4.2.11. Poliakrilamid jel elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezi, bakteri hücrelerinden elde edilen proteinlerin ekspresyonu ve saflaştırılmasının kontrolü için kullanılmıştır. Elektroforezde SDS ile denatüre edilmiş poliakrilamid jel kullanılmıştır. Poliakrilamid jel, hizalama ve yürütme jeli olarak iki kısımdan oluşmaktadır. Hizalama jeli %4, yürütme jeli ise %14 veya %16'lık akrilamid içermektedir. Jeller 10 kuyucuklu olarak hazırlanmıştır. Jel içerikleri, elektroforez esnası ve sonrasında kullanılan tamponlar **Tampon ve çözeltiler** başlığında çizelgeler halinde verilmektedir. Jele yüklenecek örnekler bakteri pelleti ise öncesinde 100 mM NaCl tuzu içeren PBS ile çözülmüştür ve o şekilde kullanılmıştır. Örnekler, yükleme boyası ile uygun miktarda (1:1) karıştırılmış ve 100°C'de 3 – 5 dakika kaynatılarak jel kuyusuna yüklenmiştir. Moleküler belirteç 50 ug total protein süt tozu-inek (Şekil 4.2) kullanılmıştır. Jeller, hazırlanan uygun tampon ortamında, 30 mA'lik elektriksel alanda dikey olarak yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel, fiksasyon çözeltisine alınmış ve 30 dakika bu çözeltide çalkalanır halde tutulmuştur. Fiksasyon sonrası jel, Commassie Brilliant Blue G250 boyasına alınarak gece boyu çalkalanarak boyanmaya bırakılmıştır. Boyama işleminin ardından %10'luk asetik asit çözeltisine alınarak dekolorize edilen jel, BioRad VersaDoc görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.



Şekil 4.2. SDS-Page analizinde kullanılan inek süt tozu moleküler belirteç

4.2.12. Protein izolasyonu ve saflaştırılması

4.2.12.1. Protein izolasyonu

Bakteride ekprese edilen proteinin hücreden elde edilebilmesi için protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriyel protein ekstraksiyon çözeltisi Çizelge 4.5'da verilmektedir. Gece boyunca indüklenmiş bir hücre için gereken tampon miktarı her 10 ml'lik hücre başına 1.5 ml lizis tamponu şeklindedir. Tez deneylerinde kullanılan miktar ise her 250 ml hücre için 30 ml olarak belirlenmiştir.

250 ml'lik indüklenen hücre, 8kxG devirde +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Her 50 ml hacmindeki kültürden elde edilen ve süpernatantı uzaklaştırılan pellete, 7.5 ml taze hazırlanmış lizis tamponu eklenmiş ve pellet süspanse edilmiştir. Bu süspanسیون, oda sıcaklığında çalkalanarak bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnek, buz üzerinde sonikasyona alınmıştır. Sonikasyon, cam şişelerde, örneklerin içerisine batırılan prob yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Sonikasyon bir buçuk dakika boyunca, kısa aralıklı, orta şiddete sahip (60 amp) vuruşlarla yapılmıştır. Bir buçuk dakikalık sonikasyon işlemi sonrası örnek, yine buz üzerinde gerçekleşecek olan 15 dakikalık dinlenmeye alınmıştır (1.5 dakika sonikasyon + 15 dakika dinlenme). Sonikasyon

işlemi bir örnek için iki kere tekrarlanmıştır. Sonikasyon işleminin ardından kültür cam şişeden falcona alınıp 8kxG devirde +4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen pelletler tuz içeren 250 ul PBS ile süspanse edilmiştir. Santrifüj sonrası 500 µl süpernatantın jel için ayrılması ile ilk ekstraksiyon tamamlanmış olur. Kalan pellet ikinci bir muamele için her seferinde taze hazırlanan lizis çözeltisinde süspanse edilmiş ve bahsedilen işlemler tekrarlanmıştır. Toplamda bir örnekten iki kere protein ekstraksiyonu yapılmıştır.

4.2.12.2. Protein saflaştırması

Tez çalışmasında protein saflaştırılması amacıyla bir afinite kromatografisi yöntemi olan IMAC kullanılmıştır. Bakteri üretici sistemi kullanılarak üretilen IFN-γ proteinini kodlayan genin 5' ucunda yer alan 6x His işareti ile kolonda bulunan iki değerlikli kation arasındaki afiniteye dayanan bir saflaştırma yapılmıştır. Bu ilişki 6x his işaretindeki histidin amino asitinde bulunan imidazol halkaları ile iki değerlikli kation olan kolbalt arasında olmaktadır. Bu amaçla sefroz boncuklar ile paketlenmiş 2 ml'lik hacime sahip olan kolon, 0.1 M konsantrasyonlu kobalt ile yüklenmiştir. Saflaştırma amacıyla protein çözeltisini düşük basınçlı sıvı kromatografi cihazına enjekte etmeden önce sistem ve kolon maksimum iletkenliği öğrenmek amacıyla 500 mM imidazol içeren elüsyon tamponu (Çizelge 4.31) geçirilmiştir. Maksimum iletkenliğin 42 mS/cm olarak gözlemlendiği sistemin hedef proteinin bağlanması için uygun hale getirilmesi için bağlanma tamponu (Çizelge 4.30) iletkenlik düşürerek belli bir seviyede sabit olana kadar geçirilmiştir. Minimum iletkenliğin 35.78 mS/cm olarak gözlemlendiği sistem örnek yüklemek için hazır hale getirilmiştir. Protein çözeltisi saflaştırmada maksimum verimin alınması amacıyla bağlanma tamponuyla ½ oranında seyreltilmiş ve her seferinde 30 ml olmak üzere kolona enjekte edilmiştir. Kolona tutunamayan hedef dışı proteinler (flow through) analiz amacıyla toplanmıştır. Kolona yapılan her enjeksiyonun ardından tutulan proteinlerin toplanması amacıyla %80 elüsyon tamponu %20 bağlanma tamponu olana kadar geçirilmiştir. Hedef protein otomatik toplayıcı ile toplanmıştır. Anlık olarak gözlemlenen grafik analizlerine göre hedef proteinin kolondan sökülmesi 40.86 mS/cm iletkenliğinde olmuştur. Toplayıcı ile saf proteinler 4 ml'lik hacimlerde toplanmıştır. Her enjeksiyon

ardından tekrar protein enjekte edilebilmesi amacıyla kolon yenilenmiştir. Bu amaçla %100 elüsyon tamponu geçirilmiş ve sonrasında minimum iletkenlik gözlenene kadar bağlanma tamponu geçirilmiştir.

Kromatografi sonucu elde edilen 12 ml'lik saf protein barındıran elüsyon çözeltisi imidazolden arındırmak amacıyla birebir hacimde son konsantrasyonu %15 olan PEG içeren PEG ile çöktürme çözeltisi (Çizelge 4.32) ile süspansiyon edilmiştir. Çözelti 18°C sıcaklıkta 35 dakika 9kxG'de santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda pellette yer alan hedef protein süpernatanttan ayrılır ve saf protein 5 ml saf protein çözme çözeltisi (Çizelge 4.33) ile süspansiyon edilir. Süspansiyon sonucunda agregasyon nedeniyle çözünmeyen proteinlerde kurtulmak amacıyla +4°C'de max hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sonucunda elde edilen süpernatant saf IFN- γ proteini içermektedir.

4.2.13. Hücre kültürlerinin hazırlanması ve stoklanması

4.2.13.1. Hücrelerin çözülmesi ve kültürü

Tez çalışmasında U937 insan lösemi monosit lenfoma hücre hattı ve Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer, NK) hücre hattı NK 3.3 kullanılmıştır. Hücreler kriyotüpler içerisindeki sıvı nitrojen (-197°C) çıkartılarak 37°C'deki su banyosunda kısa sürede çözündürülmüş ve olası kontaminasyonu önlemek amacıyla tüpler hızlı bir şekilde %70'lik alkol ile silinerek laminar flowa alınmıştır. Hafifce pipetlenerek dağıtılan hücreler RPMI 1640 besiyerinde olacak şekilde %10 ısı ile inaktivite edilmiş fetal sıgır serumu, 4 mM L-glutamin ve 100 U/ml penisilin ve 100 μ g/ml streptomisin içeren kültür besiyerinin bulunduğu steril tüpe alınmıştır. 5 dakika süreyle 800 rpm devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittiğinde tüp tekrar alkol ile silinerek laminar flowa alınmıştır. Tüp içerisindeki yıkanmış hücreler %10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 μ g/ml streptomisin ve 4mM L-glutamin içeren RPMI 1640 besi ortamı ile T25 cm² hücre kültürü kabına (flask) alınmıştır. Laminar flowdan alınan hücreler 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde flask kapakları yarı açık olacak şekilde konulmuşlardır. Dondurmayı takiben ilk kez çözülmüş olan hücreler 2-3 x 10⁵ yoğunluğa ulaştığında besiyerleri değiştirilerek tazelenmiştir. Ancak daha sonraki değiştirmeler hücre gereksinimlerine bağlı olarak 2-3 günde bir yapılmıştır.

4.2.13.2. Hücre pasajlama/tazeleme ve stoklanması

Sayıları zaman geçtikçe artan ve birbirine yaklaşan hücreler daha rahat çoğalabilecekleri flaska bölünebilir veya eksiltme yoluyla tazelenabilir ve gerekiyorsa bir kısmı dondurularak saklanabilir veya deneye alınabilirler. Hücreler çoğalmaları/bölünmeleri kontrol amacıyla hücre kültürü mikroskobu (invert mikroskop) kullanılarak kontrol edilmiştir. Hücre tazelenmesinde kullanılacak her malzeme alkolle silindikten sonra laminar flowa alınmıştır.

U937 hücreleri yüzeye yapışmayan hücre oldukları için tazelenmeleri amacıyla yeterince üreyen hücrelerin %95 kadar kısmı uzaklaştırılmıştır. Geride kalan kültür toplam hacim 5 ml olacak şekilde 37°C'de %10 fetal sığır serumu, 4 mM L-glutamin ve 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 besiyeri eklenmiş ve hücre tazelenmesi tamamlanmıştır.

Hücre stoklanması için 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilen hücrelerden besiyeri uzaklaştırılmış ve %10 DMSO ve %90 FBS içeren solüsyonla karıştırılmıştır. Ardından 1.5 ml'lik kriyotüplere alınan kültürler -20°C'ye alınması şeklinde bir gece bekletildikten sonra -80°C'ye kaldırılmıştır.

4.2.14. Rekombinant interferon gama etkinlik ölçümü

Hücre kültüründe üretilen SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı üzerine kuyu başına 500 hücre olacak şekilde 1 IU/µl konsantrasyonda 3 tekrar olmak üzere interferon gama eklenmiştir. Stok interferon gama Çizelge 5.4 'de gösterildiği gibi dilüye edilmiştir. Deneyde interferon gama ile muamele edilmeyen kontrol grupları da kullanılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyonların ardından 220 µl olacak şekilde hücre süpernatantları C1q düzeyleri miktarı tayini amacıyla alınmış geride kalan 80 µl'lık kısma ise MTT testi uygulanmıştır.

- Sandviç ELISA tekniği ile süpernatanttan C1q düzey tayini

Kompleman bileşeni C1q, klasik kompleman aktivasyon yolağında görevli C1

kompleksinin tanıma alt ünitesidir. Hücre kültürü süpernatantlarındaki C1q düzeyleri sandviç ELISA tekniği ile tayin edilmiştir (AssayPro, USA). Poliklonal C1q spesifik antikor kaplı plaklar ile süpernatantlardaki C1q düzeyleri immobilize antikor ve biyotinle bağlı poliklonal C1q spesifik antikor ile sandviç tekniği kullanılarak kantitatif olarak tayin edilmiştir. Deneyler protokolda anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Örneklerde ölçülen bütün C1q düzeyleri, kitin minimum tayin edebilme limiti olan 0,03 ng/ml'den yüksek olarak bulundu. Sandviç ELISA tekniği ile süpernatanttan C1q düzey tayini protokolu aşağıdaki gibidir;

Hücre kültürü süpernatantlarının hazırlanması: Çalışma çözeltileriyle inkübe edilmiş SH-SY5Y hücrelerinin süpernatantları toplanmıştır. Süpernatantlardaki kalıntıların uzaklaştırılması için 3xG'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve örnekler çalışma gününe kadar -80°C'de saklanmıştır.

1. Kuyucuklara 50 µl örnek/standart eklenmiş ve 2 saat inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonunda 6 defa 300 µl yıkama çözeltisi ile kuyucuklar yıkanmıştır.
3. Kuyucuklara 50 µl biyotinlenmiş insan C1q antikorunu ilave edilmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir.
4. Kuyucuklara 50 µl streptavidin-peroksidaz konjugatı ilave edilmiş ve 30 dakika inkübe edilmiştir.
5. Plaklar 6 defa 300 µl yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır.
6. Kuyucuklara 50 µl kromojen substratı ilave edilmiş ve 15 dakika inkübe edilmiştir.
7. Kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi ilave edilmiş ve oluşan renk absorbansı 450 nm ve 570 nm'de okunmuştur. Hesaplamalar 450 nm'deki absorbanstan 570 nm'deki absorbanstan çıkartılarak yapılmıştır.

- Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) Analizi

Metabolik aktivite temelli bir test olan MTT, tetrazolyum tuzlarının hücre tarafından kullanımı esasına dayanmaktadır. Canlı hücre sayısı dehidrogenaz enzim aktivitesi ile yansıtılmaktadır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrogenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometrede 500-600 nm dalga boyunda ölçülmesine dayalıdır. MTT protokolu aşağıdaki gibidir;

1. Aseptik koşullar altında her bir kuyuya 20 µl 5 mg/ml MTT eklenmiştir. Bir set kuyuya kontrol amacıyla hücre içeriği olmadan yalnızca MTT eklenmiştir.
2. 37 °C'de 3.5 saat inkübe edilmiştir.
3. Dikkatli bir şekilde besiyeri uzaklaştırılmıştır.
4. Her bir kuyuya 150 µl MTT çözücüsü eklenmiştir.
5. Işık görmemesi için alüminyum folyo ile sarılmış ve orbital çalkalayıcıda 15 dakika çalkalanmıştır.
6. Spektrofotometrede 590 nm OD'de ölçüm alınmıştır.

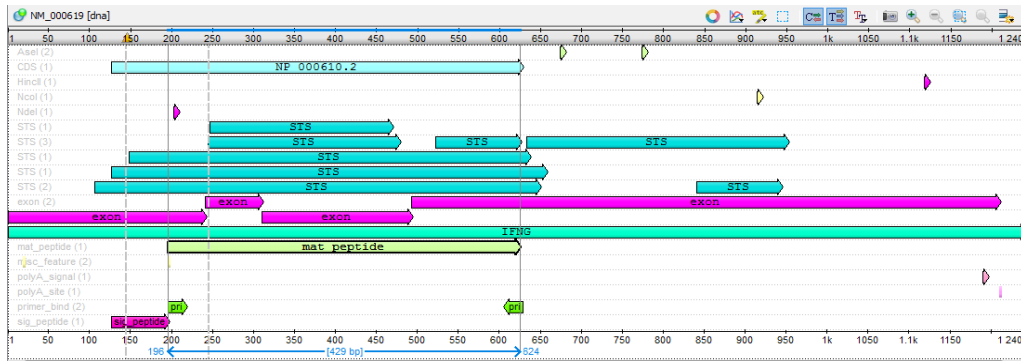
Çizelge 4.52. IFN- γ dilüsyon

Materyal	Çalışan Konsantrasyon
IFN- γ	1 IU/µl
FBS	%10
DMEM	

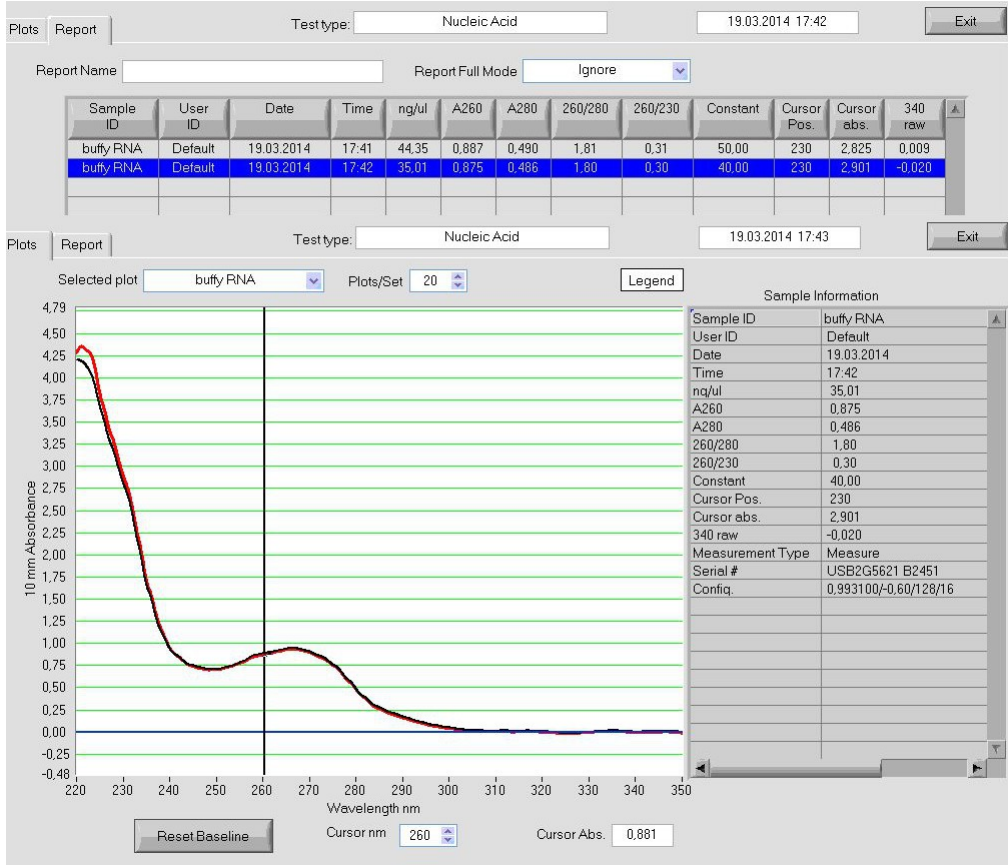
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Mononükleer Hücrelerden RNA İzolasyonu, Komplemeter DNA eldesi ve Doğrulanması

Çalışmamızda yer alan IFN- γ kodlayan gen (NM_00619 erişim numaralı IFN- γ geni dizisi) bölgesi Şekil 5.1'de görüldüğü üzere farklı ekzonlar üzerinde yer aldığı için hedef genin elde edilebilmesi amacıyla total RNA'nın izole edilip cDNA elde edilmesi gerekmektedir.

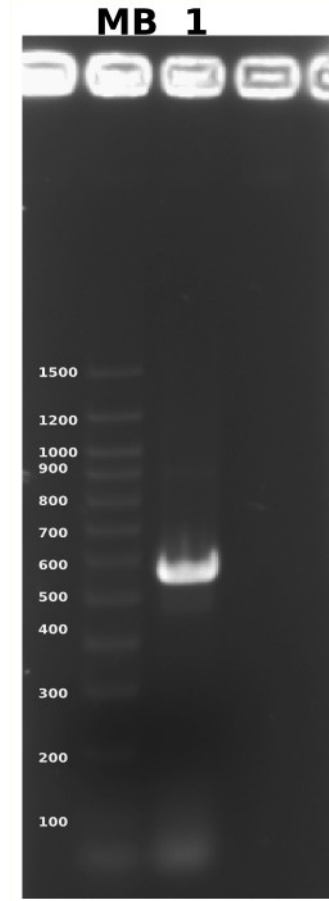


Şekil 5.1. IFN- γ gen dizisi



Şekil 5.2. Total RNA miktarı

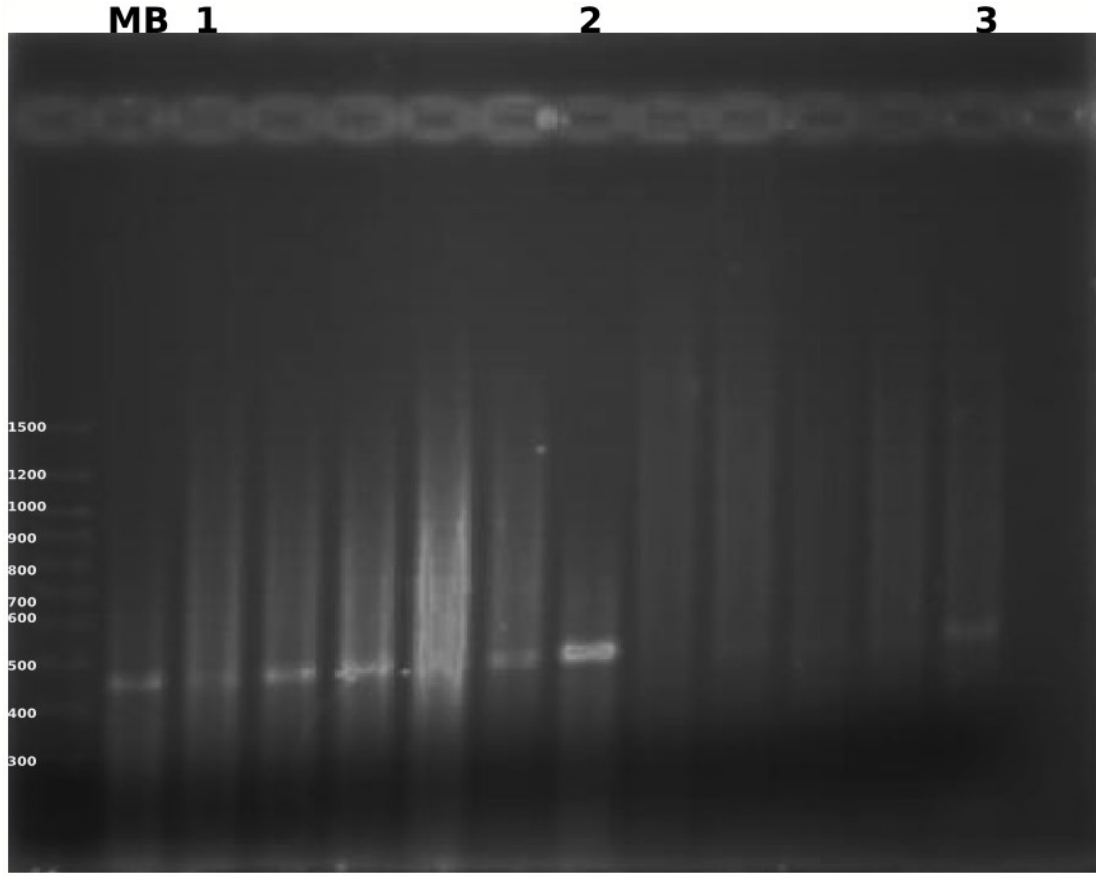
Bu amaçla NK3.3 hücrelerinin, U937 makrofaj hücre hattı ile kokültürü yapılmıştır. Ortama *Escherichia coli* O157:H7 lipopolisakaridinin fenol ekstraktı eklenerek 6 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelerden RNA izolasyonu bölüm 4.2.4.1'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. RNA miktarı ve saflığı nanodropta ölçülmüş ve 44-35 ng/µl arasında bulunmuştur (Şekil 5.2). Ters transkripsiyon reaksiyonlarında aynı miktarlar arasında RNA kullanmaya dikkat edilerek bölüm 4.2.5.2'de belirtildiği gibi cDNA elde edilmiştir. TT-PZT şartlarının normalizasyonu amacıyla insan beta aktin primerleri kullanılmıştır. Beta aktin geni insan hücrelerinde sürekli olarak üretimi gerçekleşen bir genidir ve TT-PZT şartlarının normalizasyonu için kullanılmıştır. Bu amaçla beta aktin PZT reaksiyonu kurulmuş (Çizelge 4.42 ve Çizelge 4.43) ve 563 baz çifti olacak şekilde doğru yerde görüntülenmiştir.



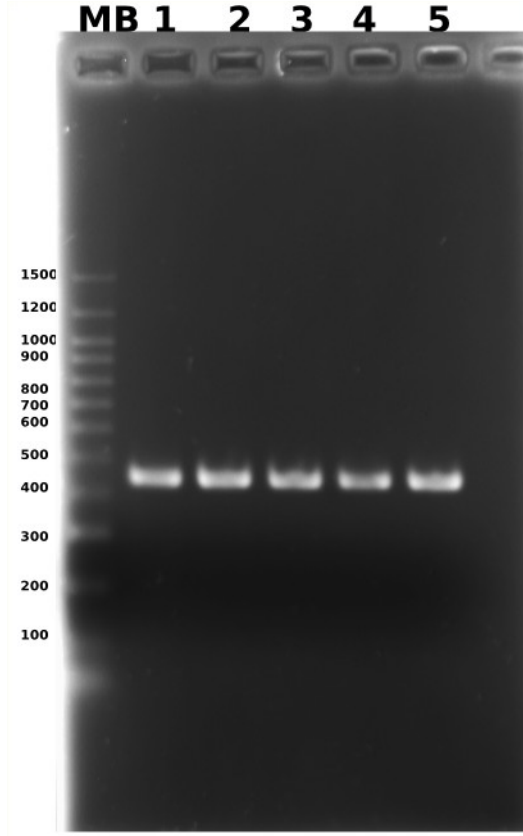
Şekil 5.3. Beta aktin PZT % 2'lik TAE agaroz jel görüntüsü MB: moleküler belirteç 1: Beta aktin

5.2. IFN- γ Geni Eldesi, Klonlanması ve Klonlamanın Doğrulanması

Çalışmamızda beta aktin ile optimizasyonu yapılan cDNA'dan IFN- γ geni elde etmek amacıyla IFN- γ genine spesifik olarak ve öncelikli olarak bakteride üretim için pET28a vektörüne klonlamaya uygun olacak şekilde dizayn edilmiş primer (Çizelge 4.44) ile PZT yapılmıştır. Bu amaçla gradient PZT ile optimal bağlanma sıcaklığı (Şekil 5.4) belirlendikten sonra IFN- γ geni özgün olmayan bantlardan kurtulmak amacıyla inen (touch down) PZT ile 431 baz çifti boyutunda doğru yerde elde edilmiştir (Şekil 5.5).

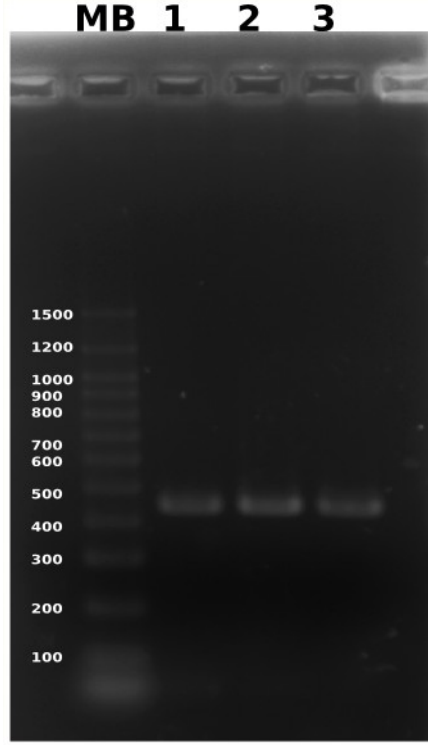


Şekil 5.4. IFN- γ gradient PZT % 1.5 TAE agaroz jel görüntüsü. İlk kuyuda 60°C'den başlayıp artan sıcaklıklarla 12. kuyuda 67°C'ye ulaşılmıştır. MB: moleküler belirteç 1: 60°C 2: 64°C (optimal bağlanma sıcaklığı) 3: 67°C derecelerini göstermektedir

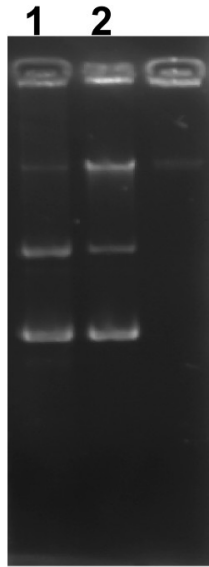


Şekil 5.5. IFN- γ inen (touch down) PZT %1.5'luk jel görüntüsü MB: moleküler belirteç 1,2,3,4,5 :IFN- γ geni görüntüsünü göstermektedir

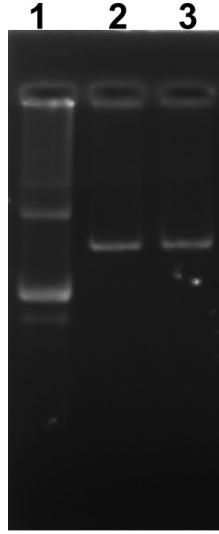
Bakteri üretici sisteminde IFN- γ protein ekspresyon vektörünün oluşturulması için, pET28a plazmiti üzerine, cDNA'den çoğaltılan IFN- γ gen segmenti aktarılmıştır. Gen klonlaması işlemleri, PZT ile elde edilen IFN- γ ürününün ve pET28a plazmitinin EcoRI ve NheI restriksiyon endonükleazlarla kesilmesini ve elde edilen kesim ürünlerinin ligasyonunu içermektedir. Plazmit kesim ürünleri ve IFN- γ PZT ürününün beklenen boyutta olduğu agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 5.6 ve Şekil 5.7). Ligasyon öncesinde yer alan kesim basamaklarında IFN- γ PZT ürünü ve plazmit vektörü bölüm 4.1.2.2'de yer alan bilgilere göre saflaştırılmıştır. Plazmit vektörün gerçekleştiği süpersarmal formların EcoRI ve NheI enzimleri ile kesilmesinin ardından tamamen kaybolması, yerini doğrusal plazmite ait tek bandın alması ile doğrulanmıştır (Şekil 5.8).



Şekil 5.6. Guanidin ile saflaştırılmış IFN- γ PZT ürünü % 1.5'luk agaroz jel görüntüsü MB: moleküler belirteç 1, 2 ve 3: saf IFN- γ PZT ürünü göstermektedir



Şekil 5.7. PEG ile saflaştırılmış pET28a plazmit vektörü 1 ve 2 numaraları saf pET28a vektörünü göstermektedir

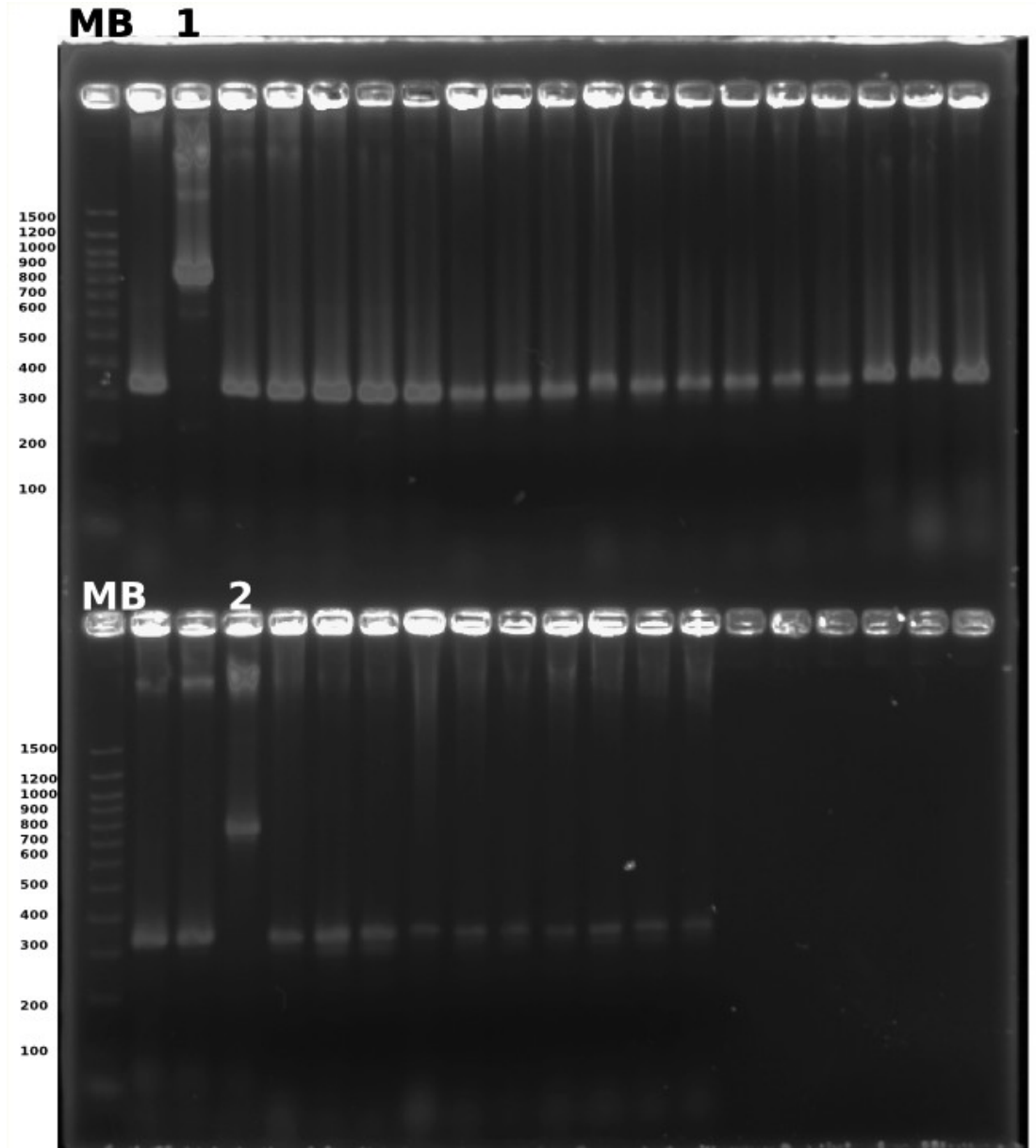


Şekil 5.8. Moleküler klonlamada restriksiyon endonükleaz ile kesim kontrolü 1:kesilmemiş pET28a 2: EcoRI ile kesilmiş pET28a 3:NheI ile kesilmiş pET28a göstermektedir

Elde edilen kesim ürünlerinin 1:2, 1:4 ve 1:8 oranlarında (1 insert konsantrasyonunu ifade etmektedir) ligasyonun ardından gerçekleştirilen gen aktarımı deneyi sonucu 7 ve 12 numaralı iki adet *E. coli* K12 JM109 transformant kolonisi elde edilmiştir. Bu kolonilerin “insert” alıp almadığının kontrolü, T7-5'-T7-3' primerleri kullanılarak PZT ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrası PZT ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenmiştir. Jel görüntüsü Şekil 5.10'da verilmektedir. Koloni tarama PZT'si ile T7 primerlerinin boş pET-28a üzerinde amplifiye ettiği parça uzunluğu 300 bç'dir. Çoklu klonlama bölgesine yapılan herhangi bir aktarım sonrasında ise T7 primerleri ile yapılacak PZT sonucu elde edilecek ürün boyunda, aktarılan gen bölgesinin büyüklüğü kadar (IFN- γ için 431 bç) bir artma görülmüştür. IFN- γ gen ürününün pET-28a vektörüne aktarılması sonrasında T7 primerleri ile yapılacak koloni tarama PZT sonucu 7 ve 12 numaralı kolonilerden beklenen büyüklükte (719 bç) ürünler elde edilmiştir.

Tespit edilen 7 ve 12 numaralı koloniler seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen ve saflaştırılan plazmit bakteri üretici sistemine aktarılmadan önce içerdiği IFN- γ dizisini tespit etmek amacıyla dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Seçilen K12 JM109 kolonisinden elde edilen pET-28a vektörünün IFN- γ gen dizisi analizi

BLAST algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Klonlamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Analiz neticesinde IFN- γ gen dizisi içerdiği ispatlanan suşlardan elde edilen plazmitler, protein ekspresyonu için daha uygun metabolik özelliklere sahip *E.coli* BL21 suşuna aktarılmıştır. Transformasyon sonrası başarılı kolonilerden bir tanesi seçilip indüklenmiştir.

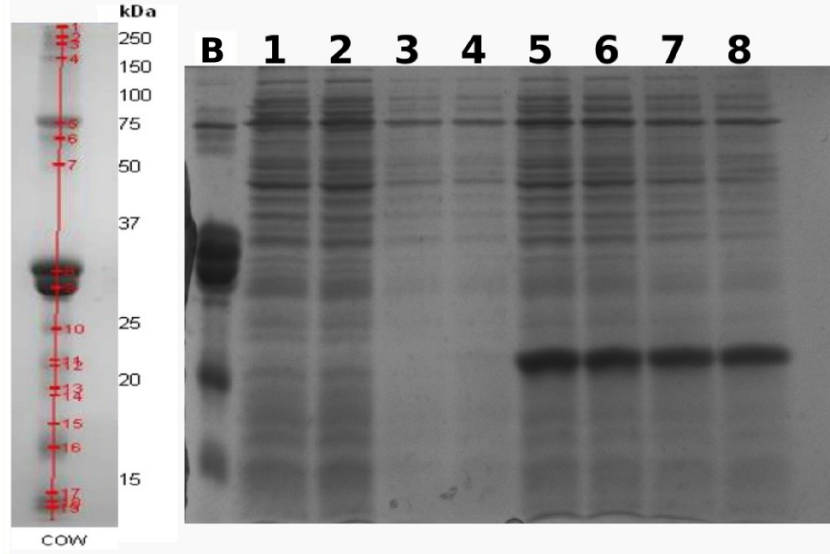


Şekil 5.9. Klonlama sonrası T7 primerleriyle koloni tarama PZT'si %2'lik agaroz jel görüntüsü MB: moleküler belirteç 1:7 numaralı koloni 2:12 numaralı koloni göstermektedir

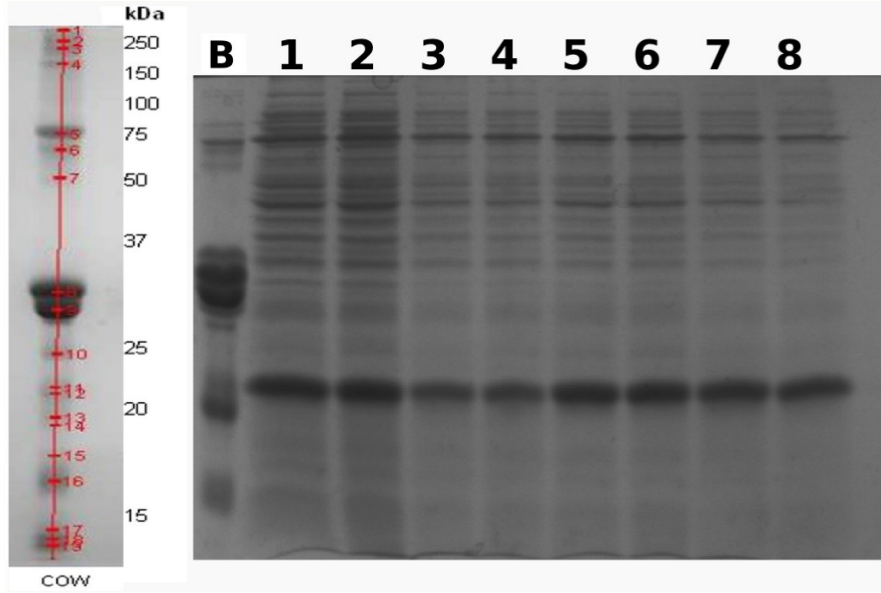
5.3. IFN- γ 'nın Bakteriyel Ekspresyon Analizi

İnterferon Gama üretiminde ön ekspresyon çalışmalarının yapılması ve başarılı transformantların seçimi için elde edilen BL21 hücreleri OD₆₀₀ nm'de 0.8 başlangıç bulanıklığında, 24 saat süresince, 22°C sıcaklıkta, 160 rpm çalkalama hızında ve 0.2 IPTG konsantrasyonunda indüklenmiştir. Elde edilen SDS-PAGE jel görüntüleri (Şekil 5.11 ve Şekil 5.9) sonucunda 19.228 kDa büyüklüğündeki interferon gama proteini doğru yerde görülmüş ve ekspresyon için seçilen başarılı transformant kolonilerden 12 nolu koloninin ekspresyonu plackett-burman tasarımında bulunan 2 seviyeli 6 adet farklı faktör göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Ardından elde edilen sonuçlar ile box-behnken analizinde yüzey yanıt modellemesi yapılarak uygun üretim koşulu belirlenmiştir. Her ekspresyon sonrası koloniler SDS-PAGE ile taranmış ve jel görüntüsü gel analyzer programı kullanılarak yapılmıştır.

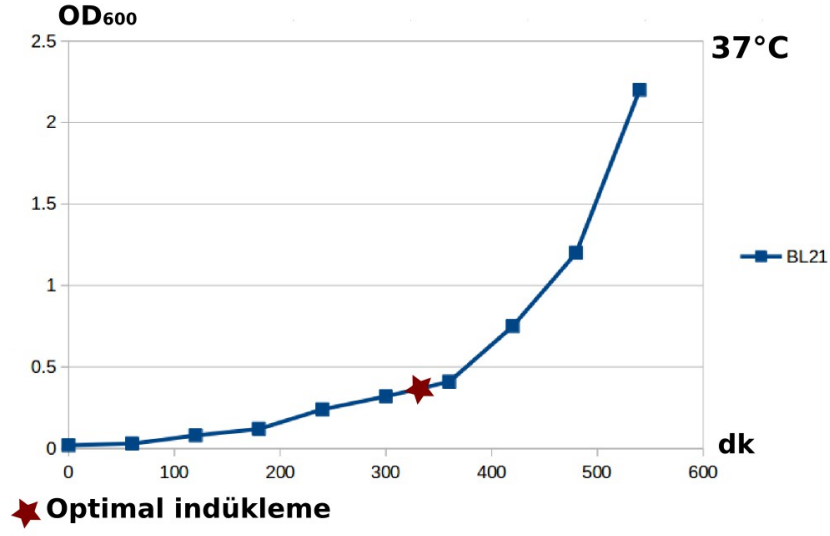
Bakteriyel ekspresyona hazır 12 numaralı IFN- γ içerikli transformant BL21 hücresi, ön kültüre alınarak tazelenmiştir. Tazelenen bu BL21 hücresi 37°C'de çalkalamalı inkübasyonda üreme eğrisi grafiğine göre belirlenen optimal indükleme zamanı olan erken ekspanansiyel faza (OD₆₀₀ 0.4 - 0.8) ulaştığında indüklenmişlerdir. Box-behnken RSM analizi sonucunda optimal üretim koşulu 37 °C sıcaklık, OD₆₀₀ 0.4 başlangıç bulanıklığı ve 12 saat indüksiyon olarak belirlenmiştir. Plackett-Burman ve Box-Behnken analizi üretim koşulları ile SDS-PAGE görüntüleri ve RSM analiz sonuçları aşağıda verilmektedir.



Şekil 5.10. Ekspresyon sonrası SDS-PAGE ile taranan koloniler B: belirteç 1, 2, 3, 4 numaraları boş pET28a içerikli BL21 hüresini ve 5, 6, 7, 8 numaraları IFN- γ içerikli pET28a içeren BL21/7-1 hücrelerini göstermektedir



Şekil 5.11. Ekspresyon sonrası SDS-PAGE ile taranan koloniler B: belirteç 1, 2, 3, 4 numaraları boş IFN- γ içerikli pET28a içeren BL21/7-2 ve 5, 6, 7, 8 numaraları IFN- γ içerikli pET28a içeren BL21/12 hücrelerini göstermektedir

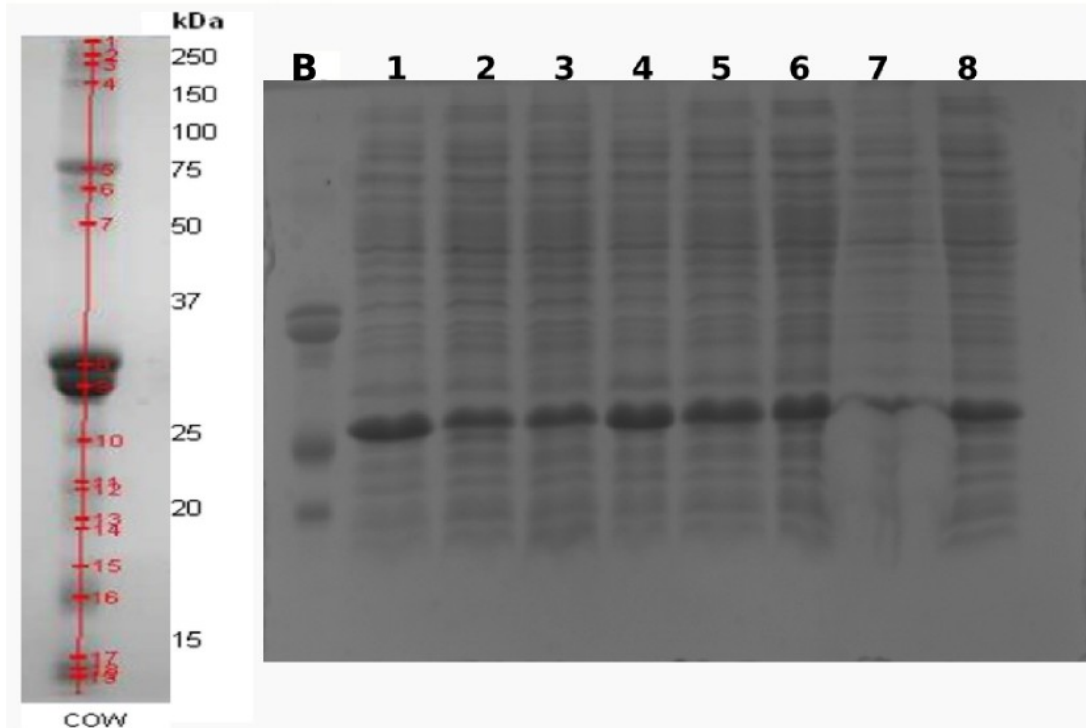


Şekil 5.12. BL21 37°C' üreme eğrisi grafiği ve optimal indükleme zamanı ve bulanıklığı

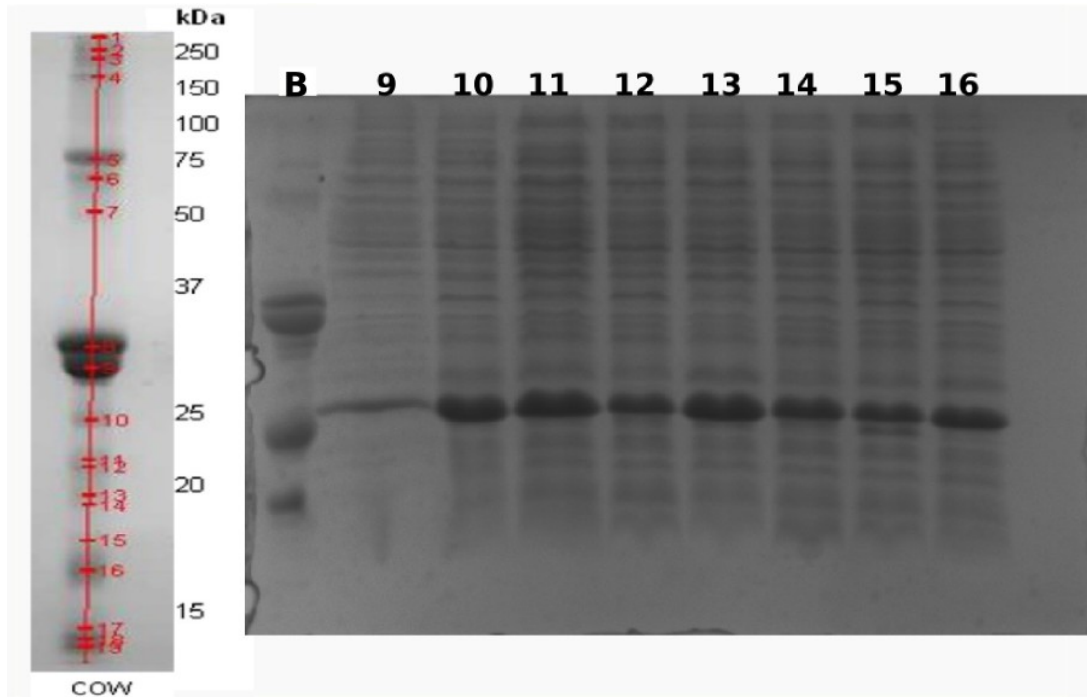
Üreme eğrisi grafiği *E.coli* BL21 suşunun belirlenen optimal bulanıklığa ulaştığı zamanın tayin edilmesi amacıyla yapılmıştır.

Çizelge 5.1. Plackett-Burman IFN- γ üretimi deney koşulları

Deney sırası	Sıcaklık (°C)	pH	IPTG (mM)	Başlangıç OD₆₀₀	İndüksiyon zamanı (saat)	Çalkalama Hızı (RPM)
1	37	7.5	0.02	0.4	12	100
2	22	7.5	0.2	0.8	12	100
3	22	5.5	0.2	0.4	24	100
4	37	5.5	0.2	0.8	12	100
5	22	5.5	0.02	0.4	12	100
6	22	5.5	0.02	0.8	12	200
7	37	5.5	0.02	0.4	24	200
8	22	7.5	0.02	0.4	24	200
9	22	5.5	0.2	0.8	24	200
10	37	7.5	0.2	0.8	24	100
11	37	7.5	0.02	0.8	12	200
12	22	7.5	0.2	0.4	12	200
13	37	5.5	0.02	0.8	24	100
14	37	7.5	0.2	0.8	24	200
15	22	7.5	0.02	0.8	24	100
16	37	5.5	0.2	0.4	12	200



Şekil 5.13. Plackett-Burman deney tasarımı matrisi ile elde edilen IFN- γ ifadenme yanıtlarının SDS-PAGE ile incelenmesi. B: belirteç 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 : deney sırasını göstermektedir



Şekil 5.14. Plackett-Burman deney tasarımı matrisi ile elde edilen IFN- γ ifadenme yanıtlarının SDS-PAGE ile incelenmesi. B: belirteç 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 : deney sırasını göstermektedir

Çizelge 5.2. Plackett-Burman deney tasarım matrisi denemeleri hücre lizatlarının SDS-PAGE protein bant profilleri

Deneme No	IFN-γ tepesinin eğri altı alanı	IFN-γ tepesi : toplam protein oranı
1	648	2.1891891892
2	283	0.6086021505
3	371	1.0108991826
4	635	1.0583333333
5	537	2.685
6	386	0.4237102086
7	175	0.8139534884
8	312	0.3653395785
9	187	0.4202247191
10	605	1.295503212
11	646	1.0205371248
12	404	1.150997151
13	654	0.6913319239
14	438	0.7487179487
15	254	0.2123745819
16	460	0.5808080808

Çizelge 5.3. Plackett-Burman analizinde faktörlerin tahmin edilen regresyon katsayılarına ait bilgiler

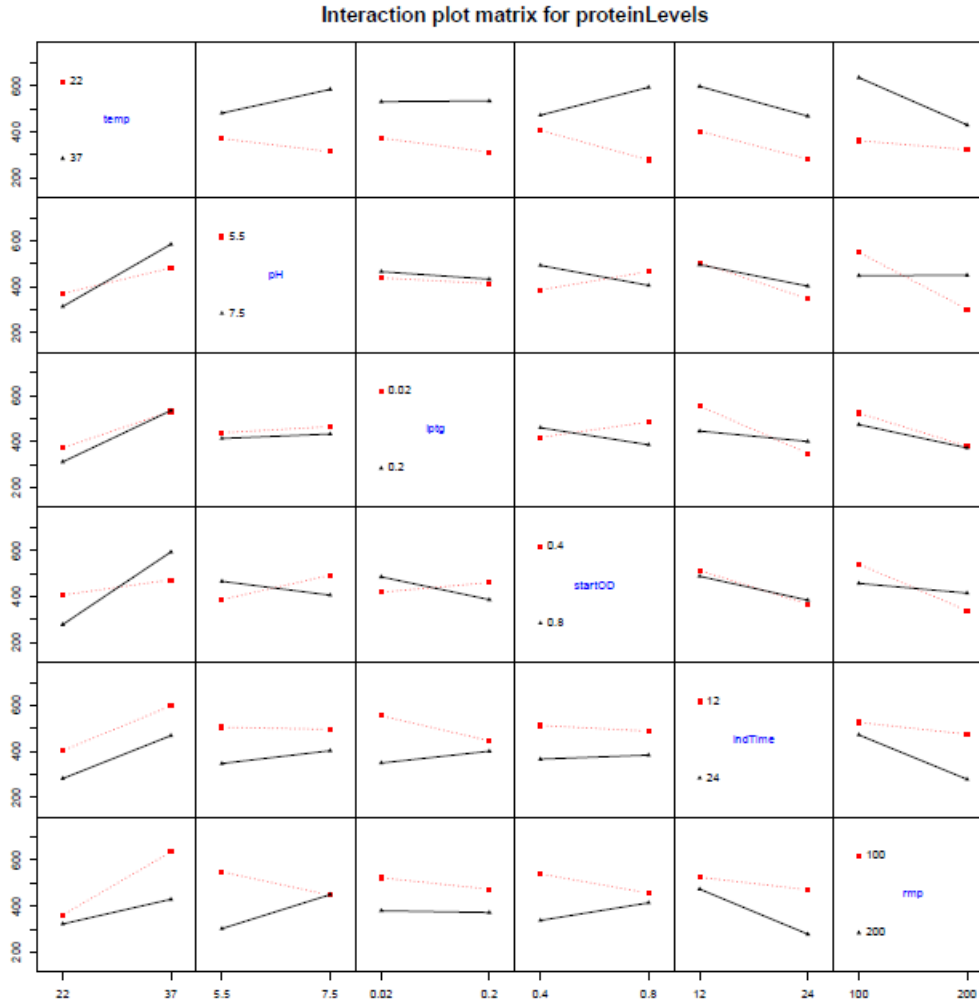
	β_0 ve β_1	Katsayı standart hataları	t istatistikleri	Pr(> t)	
Sabit değişkenler (intercept)	437.188	17.174	25.457	0.00154	**
temp1	95.438	17.174	5.557	0.03089	*
pH1	11.562	17.174	0.673	0.57016	
iptg1	-14.312	17.174	-0.833	0.4923	
startOD1	-1.813	17.174	-0.106	0.92558	
indTime1	-62.688	17.174	-3.65	0.06754	.
rmp1	-61.187	17.174	-3.563	0.07054	.
temp1:pH1	40.062	17.174	2.333	0.14487	
temp1:iptg1	16.188	17.174	0.943	0.4454	
temp1:startOD1	62.437	17.174	3.636	0.06803	.
temp1:indTime1	-1.937	17.174	-0.1130	0.92048	
temp1:rmp1	-41.688	17.174	-2.427	0.13595	
iptg1:startOD1	-35.312	17.174	-2.056	0.17607	
iptg1:rmp1	10.563	17.174	0.615	0.60119	
<p>Önemlilik kodları: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1</p> <p>β_0 ve β_1: Değişkenlere ait tahmin edilen katsayı değerleri</p> <p>Pr(> t): P-değerleri</p> <p>iptg: İndükleyici konsantrasyonu</p> <p>temp: Sıcaklık değişkeni</p>					

rmp: Çalkalama hızı

startOD: Başlangıç bulanıklığı

indTime: İndüksiyon süresi

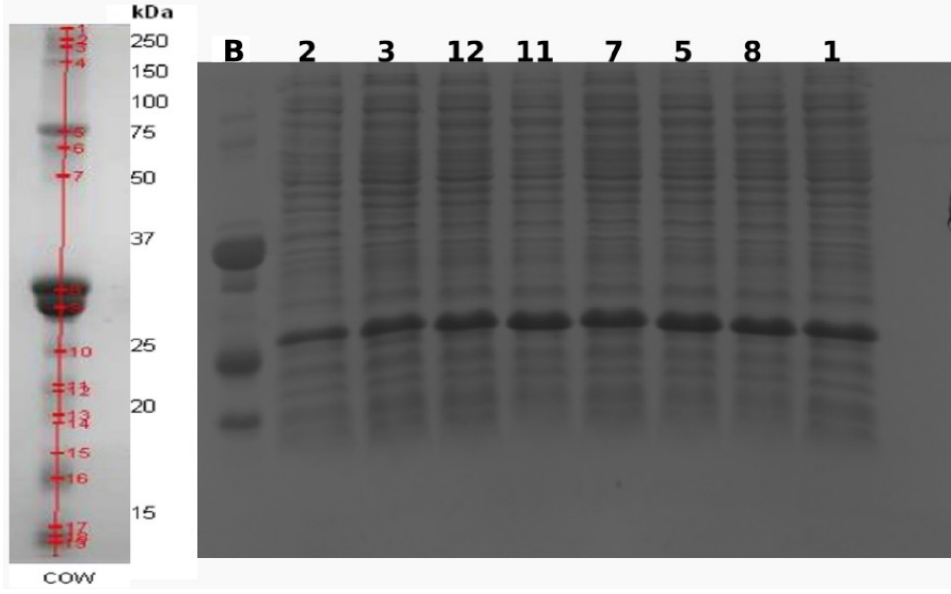
pH: Hidrojen gücü-asitlik



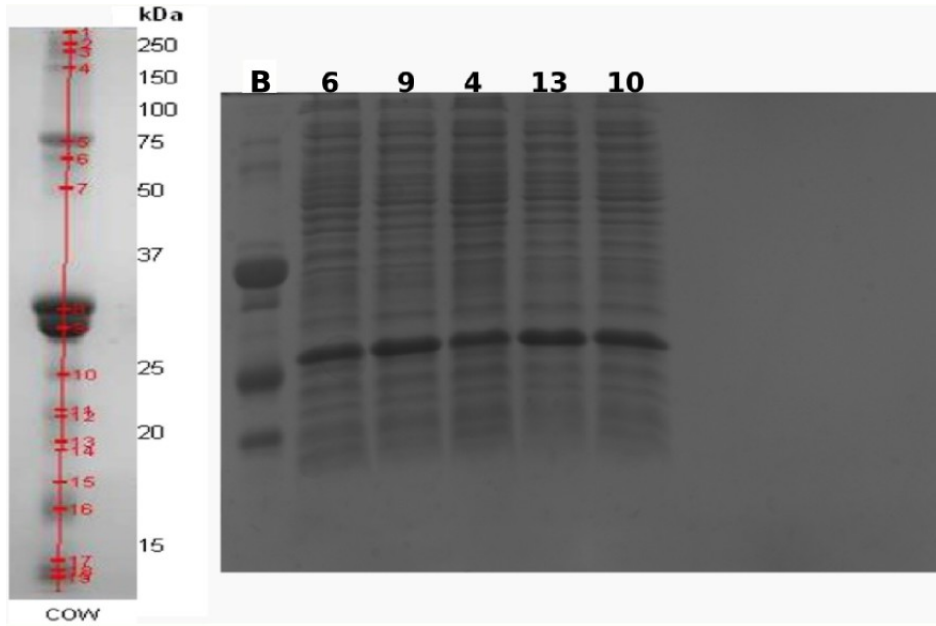
Şekil 5.15. Plackett-Burman tasarımı protein üretiminde faktörlerin etkileşim grafiği

Çizelge 5.4. Box-Behnken IFN- γ üretimi deney koşulları

Deney sırası	Sıcaklık (°C)	pH	IPTG (mM)	Başlangıç OD₆₀₀	İndüksiyon zamanı (saat)	Çalkalama Hızı (RPM)
1	29.5	7.5	0.02	0.8	12	100
2	22	7.5	0.02	0.4	18	100
3	22	7.5	0.02	0.8	18	100
4	22	7.5	0.02	0.6	12	100
5	37	7.5	0.02	0.8	18	100
6	22	7.5	0.02	0.6	24	100
7	29.5	7.5	0.02	0.6	18	100
8	37	7.5	0.02	0.6	24	100
9	29.5	7.5	0.02	0.4	24	100
10	29.5	7.5	0.02	0.4	12	100
11	37	7.5	0.02	0.4	18	100
12	29.5	7.5	0.02	0.8	24	100
13	37	7.5	0.02	0.6	12	100



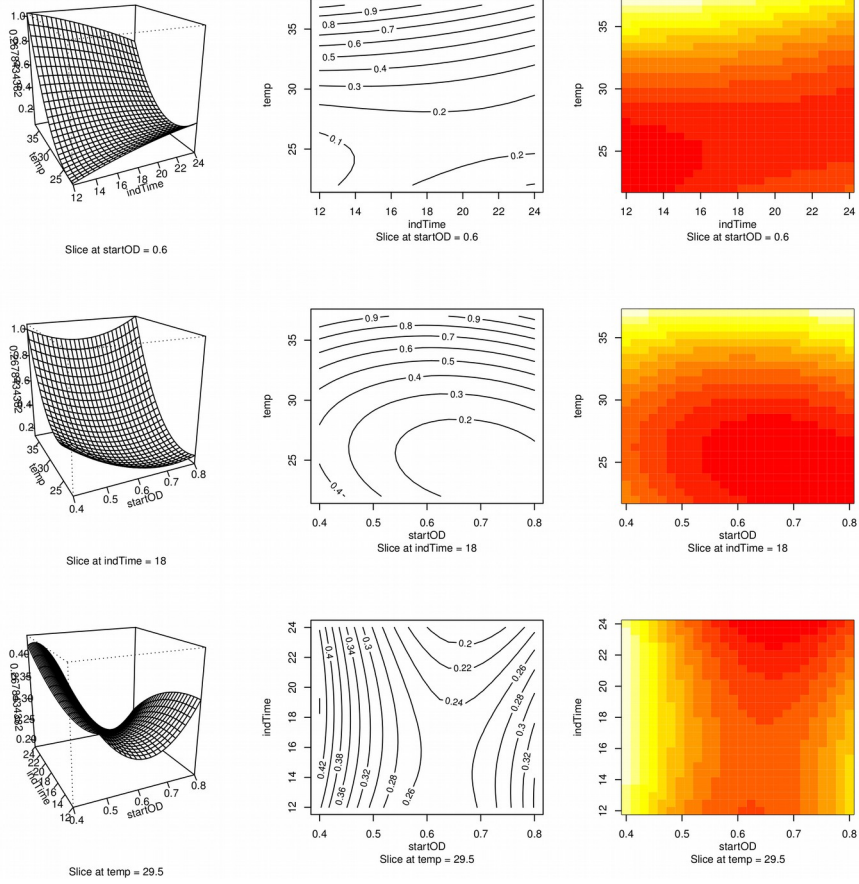
Şekil 5.16. Box-Behnken deney tasarımı matrisi ile elde edilen IFN- γ ifadenenme yanıtlarının SDS-PAGE ile incelenmesi. B: belirteç 2, 3, 12, 11, 7, 5, 8, 1 : deney sırasını göstermektedir



Şekil 5.17. Box-Behnken deney tasarımı matrisi ile elde edilen IFN- γ ifadenenme yanıtlarının SDS-PAGE ile incelenmesi. B: belirteç 6, 9, 4, 13, 10 : deney sırasını göstermektedir

Çizelge 5.5. Box-Behnken deney tasarım matrisi denemeleri hücre lizatlarının SDS-PAGE protein bant profilleri

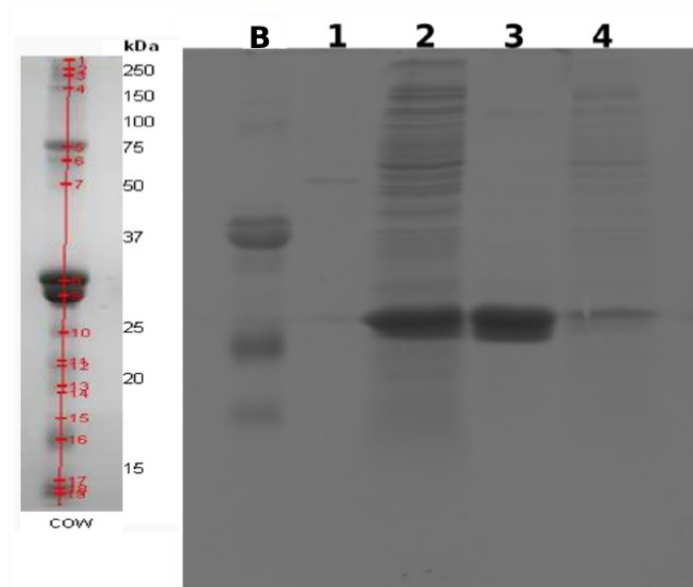
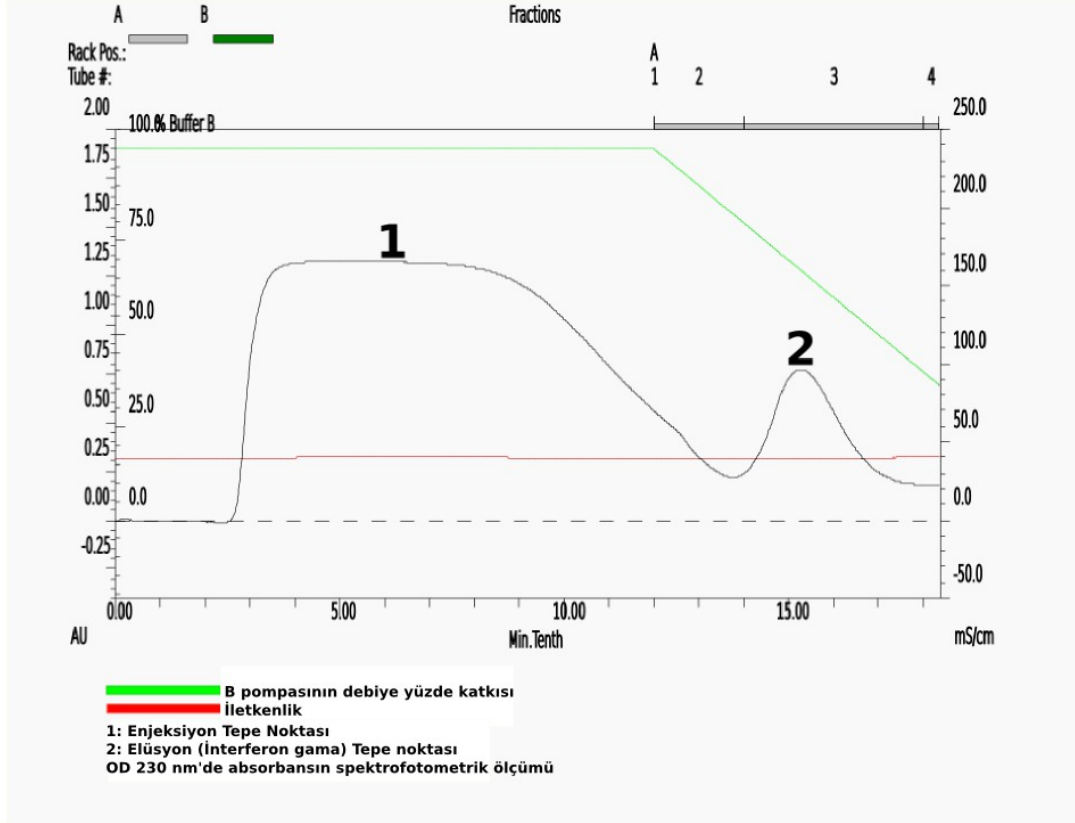
Deneme No	IFN-γ tepesinin eğri altı alanı	IFN-γ tepesi : toplam protein oranı
1	349	0.2678434382
2	290	0.4865771812
3	212	0.1576208178
4	239	0.1859922179
5	417	1.0347394541
6	279	0.2286885246
7	310	0.2520325203
8	385	0.5824508321
9	395	0.4925187032
10	366	0.2863849765
11	426	1.0390243902
12	314	0.3512304251
13	432	1.1020408163



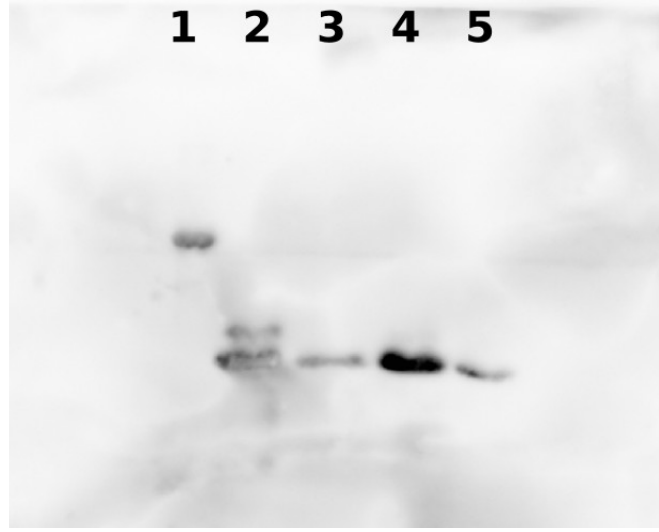
Şekil 5.18. Yanıt yüzeyi metodu (RSM) analiz sonuçları

5.4. Protein İzolasyonu ve Saflaştırılması

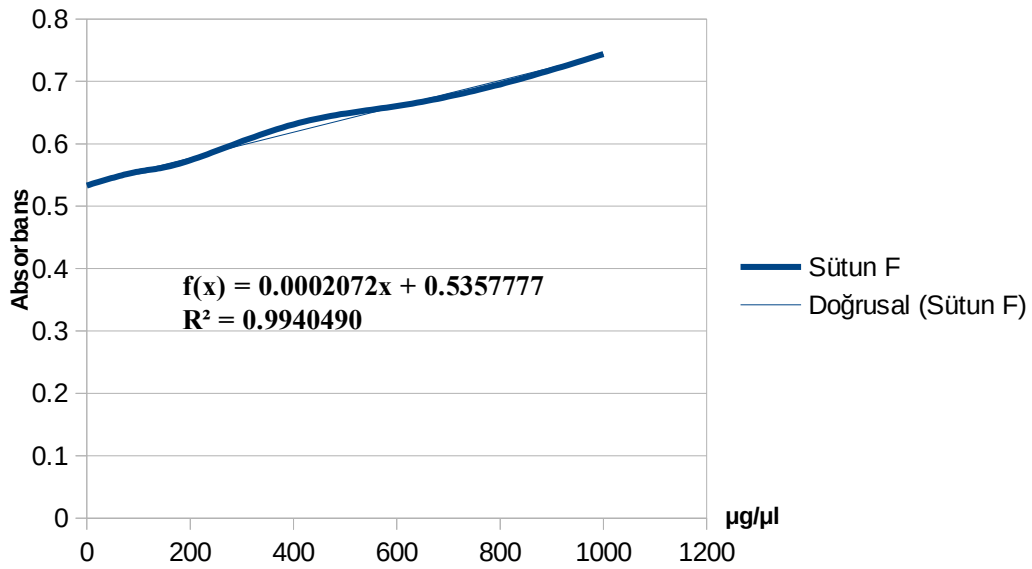
İndüksiyon sonucunda 12 numaralı IFN- γ içerikli transformant BL21 hücresi, rekombinant protein eldesi amacıyla lizis çözeltisi (Çizelge 4.29) ile parçalanmıştır. Elde edilen hücre parçası içeren protein çözeltisi, DNA'dan kaynaklanan viskoziteyi azaltmak için yapılan sonikasyonun ardından santrifüj yapılmış ve protein içeriği elde edilmiştir. Analiz amacıyla saflaştırma basamağından önce 1 ml karışık protein içeriği ayırılmıştır. Karışık protein içeriği kobalt bazlı afinite kromatografisi yöntemiyle CoIMAC 6 adlı protokole göre saflaştırılmıştır.



5.5. Protein Üretimini Doğrulanması ve Miktar Tayini



Şekil 5.21. Box-Behnken analizi ile saptanmış optimal üretim koşulları ile üretilen interferon gama western sonucu. 1: GFP 2: protein çözeltisi 3-5: tutunamayan hedef dışı proteinler (flow through) 4: saf interferon gama göstermektedir



Şekil 5.22. Bradford standart proteinlerin absorbans değer grafiği

Yapılan bradford analizi neticesinde saf olarak elde edilen İnterferon Gama protein konsantrasyonu 0.6 µg/µl bulunmuştur.

5.6. Rekombinant İnterferon Gama Etkinlik Sonuçları

SH-SY5H insan nöroblastom hücre hattında 24 saatlik ve 48 saatlik kontrol ve İnterferon Gama yanıtlarına bakıldığında sırasıyla; 24 saatlik MTT ile hücre canlılığı incelendiğinde 100.00 ± 2.38 ve 83.54 ± 6.86 , 48 saatlik MTT ile hücre canlılığı incelendiğinde 100.00 ± 1.41 ve 100.96 ± 0.23 bulunmuştur ve hücrelerde bir değişiklik saptanmamıştır (p-değeri: 0.127 ve 0.57). Ancak, hücreler tarafından üretilen C1q düzeylerine bakıldığında, kontrol ve İnterferon Gama yanıtları sırasıyla; 24 inkübasyonlarda 0.055 ± 0.00502 ve 0.24 ± 0.0012 ng/ml, 48 saatlik inkübasyonlarda 0.055 ± 0.0014 ve 0.24 ± 0.015 ng/ml olduğundan İnterferon Gama uygulanan grubunun kontrol grubuna göre daha fazla C1q sekrete ettiği görülmüştür (p-değeri: 0.00041 ve 0.0041).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Heterolog rekombinant protein üretimi ve üretilen bu proteinlerin kullanımı biyoteknolojinin önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin kullanıldığı protein üretimi yönteminde, fizyolojik sınırların çok üstünde bir üretimin arzu edildiği proteinin doğal kaynağından farklı bir organizmada üretimini beraberinde birçok sorun ve üretim zorluğu meydana getirmektedir (29). Rekombinant protein üretim teknolojisinde bakteri, maya, alg, memeli ekspresyon sistemleri gibi birçok sistem kullanılmaktadır (40). Ancak, temelde kısa süreli ve düşük maliyetli üretimin mümkün olduğu bakteriyel konakçı hücreler sık sık heterolog rekombinant protein üretiminde tercih edilmektedir. Bakteriyel konakçıda gerçekleştirilen üretimin, konakçı sistemine getirdiği yük ve stres konakçı homeostazında bozulmaya sebep olduğundan her zaman beklenen verimde protein üretimi gerçekleşmemektedir (57).

Bu tez çalışmasında, insan immün sisteminin sitokinlerinden biri olan ve bağışık yanıt düzenleyici rolü ile bilinen interferon gama proteininin üretimi *E.coli* BL21(DE3) suşu kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla ilgili proteinin gen dizisi, sahip olduğu T7-lac promotörü ile yüksek düzeyde rekombinant protein üretimi yapmayı sağlayan pET ekspresyon sistemlerinden pET28a vektörüne aktarılmıştır. Moleküler klonlama işlemleri sırasında, yüksek transformasyon verimi, *recA* genotipi ve T7RNAP geni bulundurmaması nedeni ile *E. coli* K12 JM109 hücreleri kullanılmıştır (58). Bu hücreler, T7 RNA polimeraza sahip olmadıklarından, pET sistemlerine klonlanmış genleri ifadelendirmemektedir. Böylece, üretilmek istenen heterolog protein, memeli bağışıklık sistemi proteinlerinde sıklıkla görüldüğü gibi, *E. coli* hücresi için toksik olsa bile, bakteri hücresinde kaçak ifadenme meydana gelmemektedir. Otto ve ark., ekspresyon konağı hücrelerin, toksik protein kodlayan plazmid vektörlerde promotör delesyonları oluşturabileceklerini bildirmiştir (59). Bu çalışmada, moleküler klonlama işlemleri sırasında “insert” DNA'sının *E. coli* K12 JM109 hücrelerinde korunduğu DNA dizi analizi ile saptanmıştır. Doğru gen dizisini içeren plazmitler, metabolik özellikleri ile fabrika hücre olarak kullanılmaya uygun olan ve genoma entegre lac promotörü ile indüklenebilen T7 RNA polimeraz geni bulunduran *E.coli* BL21(DE3)

bakteri hücrelerine aktarılmıştır (60).

Bakteriyel protein ifadelendirme sistemleri, hız, maliyet ve manipülasyon kolaylığı yönünden önemli avantajlar sunmaktadır. Bununla birlikte, bakteri hücreleri kısıtlı metabolik rezervleri nedeni ile bazı proteinleri yetersiz üretebilmekte, bazı proteinlerin ise fonksiyonel katlanmalarını gerçekleştirememektedir (46,47,61).

İfadenme düzeylerinin artırılması ve fonksiyonel katlanmış protein eldesi, heterolog rekombinant protein üreten mikrobiyal fabrika hücre uygulamalarında iki temel hedefi oluşturmaktadır. Besiyeri bileşenleri, fiziksel koşullar, fabrika hücrelerin genetik alt yapısı ve tasarımı gibi çok sayıda faktörün etkisi altındaki bu süreçlerin optimizasyonu için istatistiksel deney tasarımları, süre ve maliyet yönünden önemli avantajlar sağlamaktadır (43,46,62).

Çalışmamızda, öncelikle protein ifadenme düzeylerinde etkili faktörlerin taranması ve sonrasında ise etkili bulunan faktörlerin yanıt etkisinin doğrusal modellerinin ve yanıt yüzeylerinin modellendiği iki kademeli bir yaklaşım benimsenmiştir.

Çalışmamızda Plackett-Burman deney tasarımı ile taranacak faktörlerin seçiminde ön çalışmalarda öne çıkan bir dizi faktör ile benzer özellikler gösteren proteinler ile geliştirilen çalışmalarda test edilen faktörler dikkate alınmıştır (61,63,64).

Optimal üretim koşullunun belirlenmesi amacıyla ilk olarak 2 seviyeli kısmi faktöriyel analiz olan Plackett-Burman analizinde; farklı IPTG konsantrasyonları, indükleme süreleri, indüksiyon başlangıç OD, çalkalama hızı, ortam sıcaklığı ve besiyeri pH'sı değişkenler olarak belirlenmiş ve analizin vermiş olduğu deney düzeneği doğrultusunda üretim yapılmıştır. Üretim sonuçları, SDS-PAGE jel görüntü analizi neticesinde faktörlerin birbirleriyle olan ilişkileri ve protein üretiminde faktörlerin önemlilik düzeyleri ile elde edilmiştir. İlk gerçekleştirilen analiz sonuçları neticesinde indüksiyon zamanı, başlangıç OD'si ve sıcaklık önemli değişkenler olarak belirlenmiştir. Belirlenen 3 farklı değişkenin optimal seviyelerinin belirlenmesi amacıyla box-behnken deney düzeği ile üretim gerçekleştirilmiş ve SDS-PAGE jel analizi ile elde edilen protein bant profillerinin incelenmesi sonucunda yüzey yanıt

modellemesi (RSM) ile uygun indüksiyon koşulları belirlenmiştir. RSM analizi ile elde edilen optimal üretim koşulları dikkate alınarak nihai IFN- γ üretimi yapılmıştır. IFN- γ saflaştırması amacıyla afinite kromatografi olan kobalt bazlı Co-IMAC kromatografi kullanılmıştır. Protein kantitasyonu Bradford ile gerçekleştirilmiştir. Saf IFN- γ aktivitesi, nöron hücrelerinde MTT analizi ve C1q düzeyinin tahmini ile yapılmıştır.

Heterolog rekombinant protein üretiminde, pET-28 vektörüne aktarılan genlerin ekspresyonu, bir laktoz analogu olan IPTG'ye bağlıdır (65). IPTG, bakteri hücreleri tarafından metabolize edilmeden ortamda lac operonu inhibitörünü bağlayarak lac operonunun aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu galaktopiranozidin konsantrasyonu Ca ve arkadaşlarının (66) yaptığı çalışmaların aksine yaptığı çalışmaların aksine Plackett-Burman analizi neticesinde 0.02 mM gibi düşük IPTG konsantrasyonlarında bile indüksiyonun başarılı şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Bu sebepten IPTG üretiminde önemli bir değişikliğe yol açmadığı kanısına varılmış ve üretimde IPTG konsantrasyonu 0.02 mM olarak sabitlenmiştir. Hedef genin T7 RNA polimeraz aracılı transkripsiyonu ve translasyonu, söz konusu enzimin hücre içinde az sayıda bulunmasıyla bile doygunluğa ulaşabilmektedir. *E. coli* BL21 (DE3) suşundaki T7RNAP geni *lacUV5* promotörü kontrolü altındadır. Ortamda çok az miktarda substrat ya da analogu (IPTG) bulunması yeterli T7RNAP aktivitesine hemen ulaşılması ile sonuçlanmaktadır (60,61).

Plackett-Burman analizi neticesinde ortaya çıkan faktör etkileşim matrisi ve tahmin edilen regresyon kat sayılarına ait bilgiler incelendiğinde çalkalama hızının 200 rpm yerine 100 rpm olarak ayarlanması protein veriminde çarpıcı şekilde artışa yol açmıştır. Sadeghi ve arkadaşlarının (67) yapmış olduğu çalışmada da, düşük çalkalama hızlarının protein veriminde olumlu etki gösterdiğini bildirmiştir. Bu durum, hızlı çalkalanmadan doğan mekanik hasarın hücrede protein verimine olumsuz etki yaptığı düşünülmüştür. Bir diğer değişken olan ortam pH'sı, 7.5 ile 5.5 değerleri denemiş ve Plackett-Burman analizi neticesinde protein üretiminde anlamlı fark gözlenmemiştir (p-değeri: 0.57016). Bu amaçla nötral pH'ya yakın olan pH 7.5 üretimde tercih edilmiştir.

İki seviyeli faktöryel tasarımlar ana etkilerin ve etkileşimlerin saptanmasında ilk adımı oluşturmaktadır. Çalışmamızda, Plackett-Burman tarama testinde IFN- γ ifadelenme düzeyi üzerinde etkili olduğu gözlenen faktörlerden inkübasyon sıcaklığı, indüksiyon başlangıç hücre yoğunluğu ve indüksiyon süresinin yanıt yüzey modellemesi üç seviyeli Box-Behnken deney tasarımı ile gerçekleştirilmiştir. İncelenen faktörlerin yanıt etkisi, ikinci dereceden doğrusal modeller olarak ifade edilmiştir. İkili etkileşimler kontür grafikler ve üç boyutlu yanıt yüzeyleri olarak görselleştirilmiştir.

Rekombinant IFN- γ üretiminde yüksek inkübasyon sıcaklığının ifadelenme düzeyini artırdığı saptanmıştır. Çalışmamızda, SDS-PAGE bant profillemesi ile yanıt olarak ölçülen protein ifadelenme düzeyleri ve hesaplanan oranlar, standart lizis protokolu ile çözünür duruma geçirilen bakteriyel protein fraksiyonunu içermektedir. Rekombinant protein üretiminde, fabrika hücre başına en fazla miktarda proteinin, en kısa sürede üretmesi hedeflenmektedir. Ancak, hızlı üretim sırasında hücrenin şaperon rezervi yetersiz kalarak sentezlene proteinlerin çoğunun hatalı katlanmasına yol açabilir (68,69).

Çalışmamızda kültürün 37°C sıcaklıkta indüklenmesi, hücrenin şaperon sentezine olumlu katkı yaparak, lizis sonrası oluşan pellette çözünmez halde kalan inklüzyon cismi fraksiyonundan bağımsız olarak daha çok miktarda çözünür protein oluşturuyor olabilir.

Çalışmamızda indüksiyon süresini 12 saat ile sınırlı tutmanın IFN- γ eldesini artırdığı gözlenmiştir. Rekombinant protein üretimini olumsuz yönde etkileyen faktörlerden biri de hücrel proteazlardır. İnkübasyon süresi uzadıkça kültür koşullarının bozulması hücrelerde strese yol açmaktadır. Proteaz ifadelenmesinde artış *E. coli* hücrelerinin stres yanıtlarından birini oluşturmaktadır (68). Bulgularımız, IFN- γ üretim düzeylerinin stres yanıtı ile azaldığı yönündedir. Yanıt yüzeyi ve kontür grafikleri, düşük sıcaklıkta 24 saat inkübasyonun, elde edilen IFN- γ miktarında aynı sıcaklıkta 12 saat inkübasyona göre bir artışa işaret etmektedir. Bu durum, düşük sıcaklıkta ifadelenen proteinin daha çok inklüzyon cismi halinde bulunması ve proteolitik aktiviteden kurtulmasına bağlı olabilir.

Yanıt yüzeyi modelleri ve kontür grafikler, çalışmamızda kullandığımız IFN- γ üreticisi fabrika hücrelerin düşük bulanıklıklarda indüklenmesinin protein üretimine marjinal düzeyde olumlu katkı yaptığına işaret etmektedir. Heterolog proteinlerin bir kısmının ekspresyon konağı bakteri hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği bilinmektedir (59). Toksik proteinlerin makul miktarlarda elde edilebilmesi için uygulanan yöntemlerden biri de, daha yoğun bir biyokütle ile indüklemeye başlamaktır. Çalışmamızda, indüksiyon başlangıç biyokütlesinin diğer faktörler kadar etkili olmaması, ürettiğimiz IFN- γ 'nın hücre metabolizmasına getirdiği yükün fabrika hücrelerin üreme motivasyonu ile doğrudan çelişmemesi ile açıklanabilir.

Nöron hücrelerinde yapılan etkinlik deneylerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar kıyaslandığında IFN- γ 'nın C1q düzeyleri üzerinde farklılık yaratmadığı aynı zamanda MTT deneyleri neticesinde hücre canlılığı üzerinde çarpıcı bir etki göstermediği ancak, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında C1q düzeylerinde anlamlı düzeyde farklılıklar meydana getirdiği saptanmıştır. Bu durum interferon gama sitokinin pleotropik etki göstererek kompleman sistemi proteini C1q düzeyinde artış sağlamasıyla açıklanabilmektedir (4).

6.1. Sonuç

Bu tez çalışmasında, ilk analiz sonuçları ışığında önemli olduğu düşünülen sıcaklık, başlangıç OD'si ve indüksiyon zamanı önemli faktörler olarak saptanmıştır. Bu faktörlerin optimal değerleri için box-behnken analizinde yer alan RSM analizi kullanılmıştır. Bu analiz neticesinde elde edilen ikili faktör karşılaştırma yüzey modelleme sonuçları, 37°C derecede 12 saatlik indüksiyonun 24 saatlik indüksiyona göre protein üretim veriminde çok fark oluşturmamasına karşın 37°C derecede 0.4 OD başlangıç bulanıklığının 0.8 OD'ye göre verimde büyük bir artış sağladığı görülmüştür. Indüksiyon zamanı ve başlangıç OD'si arasındaki ilişki göz önünde bulundurulduğunda 12 saatlik indüksiyon zamanı ile 0.4 OD ile başlatılan üretim veriminin oldukça yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Bu bilgiler ışığında optimal üretim koşulu 0.4 OD başlangıç bulanıklığında 12 saatlik indüksiyon zamanı olmak üzere 37°C ortam sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Belirlenen ortam sıcaklığı Zhu ve arkadaşlarının (70) yaptığı araştırmada, interferon gama üretiminde optimal sıcaklık

olarak gösterilmiştir. Deney sonucunda gerçekleştirilen protein izolasyonu ve jel elektroforezi ile elde edilen bant profilleri, 37°C derecede 0.4 OD'de 12 saat boyunca indüksiyonun, mutlak interferon gama proteini üretimini arttırdığını teyit etmektedir. Bununla birlikte uzun indüksiyon koşulları meydana gelen verim azlığı artmış protein degradasyonu ile açıklanabilir.

Tez çalışmasında, SH-SY5Y insan nöroblastom hücre hattı kullanılarak interferon gama aktivite deneyi Sara ve arkadaşlarının (71) çalışmalarında yapmış oldukları gibi interferon gama aktivite ölçümü ile benzerlik göstermektedir. Bu deneyde, IFN- γ 'nın hücreler üzerindeki etkisinin anlaşılması için IFN- γ ile muamele edilmemiş kontrol grubu ve aynı zamanda MTT deneyi ile hücre canlılıkları kontrol edilmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyonun ardından hücre süpernatantları toplanmıştır. MTT deneyi neticesinde elde edilen sonuçlar IFN- γ 'nın hücre canlılıkları üzerinde çarpıcı bir etkisinin olmadığı (p-değeri: 0.127 ve 0.57) ancak, C1q düzeylerinde bir artış sağladığı görülmüştür (p-değeri: 0.00041 ve 0.0041). Böylece rekombinant IFN- γ proteinin etkin bir protein olduğu kanıtlanmıştır.

Rekombinant heterolog protein sentezi, biyoteknolojik üretim ve araştırma alanında merkezi öneme sahip olmasına karşın, henüz tam olarak teknoloji haline gelmemiş bir araçtır. Ekspresyon vektörlerine klonlanarak konak hücrelere aktarılan her bir hedef genden optimum düzeyde, uygun katlanmış konformasyonda ve fonksiyonel olarak aktif formda protein sentez ettirilmesi ve eldesi, o proteine özgül bir optimizasyon ile mümkün olabilmektedir. Protein sentezinde başarılı, aktif ve verimi yüksek protein üretim yapılması, üretim koşullarının modellenmesi ve belli standartlarda olması neticesinde meydana gelmektedir.

KAYNAKLAR

1. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol.* 2007 Jan 10;127(3):335–47.
2. Berg H, Walter M, Mauch L, Seissler J, Northemann W. Recombinant human preproinsulin expression, purification and reaction with insulin autoantibodies in sera from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol Methods.* 1993 Sep 15;164(2):221–31.
3. Higgins SJ, Hames BD. *Protein expression: a practical approach.* Oxford; New York: Oxford University Press; 1999.
4. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163–89.
5. Davidson College. Interferon Gamma (IFN-g) [Internet]. Davidson College; Available from: http://www.bio.davidson.edu/courses/immunology/students/spring2006/v_alvarez/ifn-gamma.html
6. Farrar MA, Schreiber RD. The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor. *Annu Rev Immunol.* 1993;11(1):571–611.
7. Babaeipour V, Shojaosadati SA, Khalilzadeh R, Maghsoudi N, Farnoud AM. Enhancement of human gamma-interferon production in recombinant E. coli using batch cultivation. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010 Apr;160(8):2366–76.
8. Arase H, Arase N, Saito T. Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J Exp Med.* 1996 May 1;183(5):2391–6.
9. Aslan N, Ayyildiz A. İnterferon Reseptör Sistemleri VeSinyal İleti Mekanizmaları. *Türkiye Klin Tıp Bilim Derg.* 1998;18(6):351–9.
10. Ball ED, Guyre PM, Shen L, Glynn JM, Maliszewski CR, Baker PE, et al. Gamma interferon induces monocytoïd differentiation in the HL-60 cell line. *J Clin Invest.* 1984 Apr;73(4):1072–7.
11. Bossie A, Vitetta ES. IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching. *Cell Immunol.* 1991 Jun;135(1):95–104.
12. Bruin AM de, Demirel Ö, Hooibrink B, Brandts CH, Nolte MA. Interferon- γ impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood.* 2013 May

- 2;121(18):3578–85.
13. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1988 Oct 1;141(7):2407–12.
 14. Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol*. 1988 Oct;18(10):1587–92.
 15. Ellis TN, Beaman BL. Interferon gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology*. 2004 May;112(1):2–12.
 16. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2249–54.
 17. Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature*. 1982 August;298(5877):859–63.
 18. Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J Exp Med*. 1983 Dec 1;158(6):2058–80.
 19. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond Ser B Contain Pap Biol Character R Soc G B*. 1957 Sep 12;147(927):258–67.
 20. Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. *Kuby Immunology*, Sixth Edition. 6th edition. New York: W. H. Freeman & Company; 2006. 574 p.
 21. *MLS CDSE. Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective*. 3 edition. Philadelphia, PA.: F.A. Davis Company; 2009. 480 p.
 22. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology (Immunobiology: The Immune System (Janeway))*. 7 edition. Garland Science; 2007.
 23. Ralph P, Harris PE, Punjabi CJ, Welte K, Litcofsky PB, Ho MK, et al. Lymphokine inducing “terminal differentiation” of the human monoblast leukemia line U937: a role for gamma interferon. *Blood*. 1983 Dec;62(6):1169–75.
 24. Roitt I. *Essential Immunology*, Seventh Edition. 7th edition. Oxford; Boston; St. Louis, Mo.: Blackwell Scientific Publications; 1991. 356 p.
 25. T S, J P, K C, I J. N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. [Internet]. 1995 [cited 2014 May 24]. Available from: <http://www.biochemj.org/bj/308/bj3080009.htm>

26. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol.* 2012 Feb;91(2):299–309.
27. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol.* 1995 Oct 1;58(4):373–81.
28. Stryjewska A, Kiepusa K, Librowski T, Lochyński S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacol Rep PR.* 2013;65(5):1075–85.
29. Jenkins N. Modifications of therapeutic proteins: challenges and prospects. *Cytotechnology.* 2007 Apr 1;53(1-3):121–5.
30. De Groot AS. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. *Drug Discov Today.* 2006 Mar;11(5-6):203–9.
31. Schwartz T, Blobel G. Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. *Cell.* 2003 Mar 21;112(6):793–803.
32. Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:529–50.
33. Zhong X, Wright JF. Biological Insights into Therapeutic Protein Modifications throughout Trafficking and Their Biopharmaceutical Applications. *Int J Cell Biol* [Internet]. 2013 Apr 18 [cited 2014 Mar 3];2013. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijcb/2013/273086/abs/>
34. Walsh G. *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology.* Chichester: John Wiley and Sons; 2003.
35. Lebrilla CB, Mahal LK. Post-translation modifications. *Curr Opin Chem Biol.* 2009 Oct;13(4):373–4.
36. C K Derian WV. Inhibitors of 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases block aspartyl beta-hydroxylation of recombinant human factor IX in several mammalian expression systems. *J Biol Chem.* 1989;264(12):6615–8.
37. Protein expression (biotechnology) [Internet]. Wikipedia, the free encyclopedia. 2014 [cited 2014 Feb 28]. Available from: [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Protein_expression_\(biotechnology\)&oldid=596188351](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Protein_expression_(biotechnology)&oldid=596188351)
38. Opdenakker G, Rudd PM, Ponting CP, Dwek RA. Concepts and principles of glycobiology. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1993 Nov;7(14):1330–7.
39. Sealover NR, Davis AM, Brooks JK, George HJ, Kayser KJ, Lin N. Engineering Chinese Hamster Ovary (CHO) cells for producing recombinant proteins with simple glycoforms by zinc-finger nuclease (ZFN)—mediated gene knockout of

- mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (Mgat1). *J Biotechnol.* 2013 Aug 10;167(1):24–32.
40. Rader RA, Biotechnology Information Institute. *Biopharmaceutical products in the U.S. and European markets.* Rockville, MD: Biotechnology Information Institute; 2007.
 41. Shimizu Y, Kuruma Y, Ying B-W, Umekage S, Ueda T. Cell-free translation systems for protein engineering. *FEBS J.* 2006 Sep 1;273(18):4133–40.
 42. Kent SBH. Total chemical synthesis of proteins. *Chem Soc Rev.* 2009;38(2):338.
 43. Chou C-F, Shen S, Tan Y-J, Fielding BC, Tan THP, Fu J, et al. A novel cell-based binding assay system reconstituting interaction between SARS-CoV S protein and its cellular receptor. *J Virol Methods.* 2005 Jan;123(1):41–8.
 44. Joly JC, Leung WS, Swartz JR. Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Mar 17;95(6):2773–7.
 45. *E. coli* genotypes - OpenWetWare [Internet]. *E. coli* genotypes. [cited 2014 Dec 14]. Available from: http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes
 46. Keskin Gündoğdu T, Deniz İ, Çalışkan G, Şahin ES, Azbar N. Experimental design methods for bioengineering applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2014 Nov 6;1–21.
 47. Papanephytous CP, Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. *Protein Expr Purif.* 2014 Feb;94:22–32.
 48. Plackett RL, Burman JP. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika.* 1946 Jun 1;33(4):305–25.
 49. Cui F, Zhao L. Optimization of Xylanase Production from *Penicillium* sp.WX-Z1 by a Two-Step Statistical Strategy: Plackett-Burman and Box-Behnken Experimental Design. *Int J Mol Sci.* 2012 Aug 23;13(8):10630–46.
 50. Thakkar A, Saraf M. Application of Statistically Based Experimental Designs to Optimize Cellulase Production and Identification of Gene. *Nat Prod Bioprospecting.* 2014 Dec 1;4(6):341–51.
 51. Brjan Strannegård. Interferons and their therapeutic applications [Internet]. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC); 2000. Available from: <http://www.ifcc.org/ifcc-communications-publications-division-%28cpd%29/ifcc-publications/ejifcc-%28journal%29/e-journal-volumes/ejifcc-2000-vol-11/vol-11-n%C2%B0-3/interferons-and-their-therapeutic-applications/>
 52. Taniguchi T, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M. Molecular cloning of human

- interferon cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Jul;77(7):4003–6.
53. Goldsby RA, Goldsby RA. *Immunology*. New York, N.Y: W. H. Freeman; 2003.
 54. Burmester G-R, Pezzutto A, Ulrichs T, Aicher A. *Color atlas of immunology*. Stuttgart; New York: Thieme; 2003.
 55. Ye J, Ortaldo JR, Conlon K, Winkler-Pickett R, Young HA. Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *J Leukoc Biol*. 1995 Aug;58(2):225–33.
 56. SH-SY5Y [Internet]. Wikipedia, the free encyclopedia. 2015 [cited 2015 May 14]. Available from: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=SH-SY5Y&oldid=652957235>
 57. Boor KJ. Bacterial Stress Responses: What Doesn't Kill Them Can Make Them Stronger. *PLoS Biol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Apr 20];4(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1326283/>
 58. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press; 2001. 1365 p.
 59. Otto CM, Niagro F, Su X, Rawlings CA. Expression of recombinant feline tumor necrosis factor is toxic to *Escherichia coli*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995 Nov;2(6):740–6.
 60. Robichon C, Luo J, Causey TB, Benner JS, Samuelson JC. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) Derivative Strains To Minimize *E. coli* Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography ▽. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Jul;77(13):4634–46.
 61. Kramer G, Paul A, Kreusch A, Schüler S, Wiederanders B, Schilling K. Optimized folding and activation of recombinant procathepsin L and S produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2007 Jul 1;54(1):147–56.
 62. Islam RS, Tisi D, Levy MS, Lye GJ. Framework for the Rapid Optimization of Soluble Protein Expression in *Escherichia coli* Combining Microscale Experiments and Statistical Experimental Design. *Biotechnol Prog*. 2007 Jan 1;23(4):785–93.
 63. Chew FN, Tan WS, Boo HC, Tey BT. STATISTICAL OPTIMIZATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN PRODUCTION FROM *Escherichia coli* BL21(DE3). *Prep Biochem Biotechnol*. 2012 Apr 3;42(6):535–50.
 64. Moura MVH, Dobler L, Gutarra MLE, Almeida RV. Studying the expression of a lipase from *Pyrococcus furiosus* using response surfaces. *Protein Expr Purif*. 2013 Mar;88(1):26–32.
 65. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2005 Jan 26;115(2):113–28.

66. Galloway CA, Sowden MP, Smith HC. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *BioTechniques*. 2003 Mar;34(3):524–6, 528, 530.
67. Sadeghi HMM, Rabbani M, Rismani E, Moazen F, Khodabakhsh F, Dormiani K, et al. Optimization of the expression of reteplase in *Escherichia coli*. *Res Pharm Sci*. 2011;6(2):87–92.
68. Baig F, Fernando LP, Salazar MA, Powell RR, Bruce TF, Harcum SW. Dynamic Transcriptional Response of *Escherichia coli* to Inclusion Body Formation. *Biotechnol Bioeng*. 2014 May;111(5):980–99.
69. Zhang A, Mu H, Zhang W, Cui G, Zhu J, Duan J. Chitosan Coupling Makes Microbial Biofilms Susceptible to Antibiotics. *Sci Rep* [Internet]. 2013 Nov 28 [cited 2013 Dec 2];3. Available from: http://www.nature.com/srep/2013/131128/srep03364/full/srep03364.html?WT.ec_id=SREP-631-20131201
70. Zhu F, Wang Q, Pu H, Gu S, Luo L, Yin Z. Optimization of soluble human interferon- γ production in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013 Feb;29(2):319–25.
71. Sara Crisafulli YP. Interferon gamma: activity and ELISA detection comparisons. *BioTechniques*. 2008;45(1):101–2.
72. Aune TM, Pogue SL. Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest*. 1989 Sep 1;84(3):863–75.

EKLER

EK 1 – Tez deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler

EK 2 – Tez deneylerinde kullanılan enzimler ve kitler

EK 3 – Tez deneylerinde kullanılan laboratuvar cihaz ve gereçleri

EK.4 – Tez deneylerinde kullanılan R-kodları

Ek 1 Tez Deneylerinde Kullanılan Malzemeler

Malzemenin Adı	Markası	Katalog Numarası	Kullanım Amacı
Agar (bakteriyel)	Bioshop	#AGR001.1	Besiyeri hazırlanması
Agaroz	Bioshop	#AGA001.500	Jel Elektroforezi
Akrilamid	Bioshop	#ACR001.500	Jel Elektroforezi
Amonyum persülfat (APS)	Bioshop	#AMP001.25	Jel Elektroforezi
Bisakrilamid	Bioshop	#BIS001.100	Jel Elektroforezi
Borik Asit	Bioshop	#BOR001.1	Tampon hazırlama
Brom fenol mavisi (BPB)	Bioshop	#BRO777.25	Tampon hazırlama
Commassie Brilliant Blue R-250	Bioshop	#CBB250.25	Jel Elektroforezi
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Bioshop	#DMS555.500	Transformasyon
EDTA	Bioshop	#EDT001.1	Tampon hazırlama
Etidyum bromür	Bioshop	#ETB333.5	Jel Elektroforezi
Etanol	Tekkim	TK.200655.0250	Genel kullanım
Etanol	JT Baker	8462	Genel kullanım
Etanol (masa alkolü)			Temizlik
Fenol kloroform izoamil alkol	Amresco	K169-400ML	DNA İzolasyonu
Glasiyal asetik asit	Riedel	27225	Tampon hazırlama
Glasiyal asetik asit	Tekkim	TK.010030.0250	Tampon hazırlama

		0	
Glasiyal asetik asit	Bioshop	#ACE222.1	Tampon hazırlama
Gliserol	Bioshop	#GLY002.1	Tampon hazırlama
Glisin	Bioshop	#GLN001.1	Tampon hazırlama
Glisin USP/BP	Kimetsan	#KIM- GLN/01CP/1205 18	Tampon hazırlama
D(+) Glukoz monohidrat	Aklar		Besiyeri hazırlama
Guanidyum (guanidine thiocyanate)	Fluka	50980	DNA İzolasyonu / Saflaştırma
Guanidyum (guanidine thiocyanate)	Sigma	#G9277	DNA İzolasyonu / Saflaştırma
IPTG			Protein ekspresyonu
İsopropanol	Tekkim	TK.090250.0250 0	Genel kullanım
İsopropanol	Fisher Bioreagents	#UN1219	Genel kullanım
Kanamisin	Vetap		Antibiyotik
Luria Bertani besiyesi (LB Broth)	Bioshop	#LBL405.1	Besiyeri hazırlama
Maya özütü (granüle)	Merck	1.03753.0500	Besiyeri hazırlama
Maya özütü (toz)	Bioshop	#YEX401.1	Besiyeri hazırlama
Magnezyum klorür (MgCl ₂ .6H ₂ O)	Acros	#413415000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Merck	1.05882.2500	Besiyeri / Tampon hazırlama
Magnezyum sülfat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Acros	#213115000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum klorür (NaCl)	Fischer Scientific	BP358-1	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum klorür (NaCl)	Amresco	x190-1KG	Besiyeri / Tampon hazırlama

Sodyum asetat (NaOAC)	Riedel	25022	DNA İzolasyonu
Sodyum hikroksit (NaOH)	Riedel	06203	Besiyeri / Tampon hazırlama
Sodyum hikroksit (NaOH)	Fischer Scientific	BP359-500	Besiyeri / Tampon hazırlama
PBS			Genel kullanım
Polietilen glikol (PEG) 6000	Bioshop	#PEG600.1	Transformasyon
Pepton (bakteriyolojik)	Conda Pronadisa	1616.00	Besiyeri hazırlama
Pepton (bakteriyolojik)	Bioshop	#YEX401.1	Besiyeri hazırlama
Potasyum asetat	Fischer Scientific	#P/3760/60	Tampon hazırlama
Potasyum klorür	Merck	1.04936.1000	Besiyeri / Tampon hazırlama
Potasyum fosfat	Acros	#215470010	Tampon hazırlama
ProteinazK			Protein izolasyonu
SDS (sodyum dodesil sülfat)	Bioshop	#SDS001.100	Tampon hazırlama
Süttozu	Pýnar		PAGE Belirteci
TEMED	Amresco	#0761-50ML	Jel Elektrofrezisi
Tris (hidrometil) aminometan	Bioshop	#TRS001.1	Tampon hazırlama
Trizma Baz	Sigma	T1503-1KG	Tampon hazırlama
Tris hidroklorür	Bioshop	#TRS002.500	Tampon hazırlama
Tripton	Conda Pronadisa	1612.00	Besiyeri hazırlama
Triton			Protein izolasyonu

Ek 2 Tez Deneylerinde Kullanılan Enzimler ve Kitler

Wizard® PCR Preps DNA Purification system	Promega	#A2180	Saflaştırma
Pierce™ Blue Prestained Protein Molecular Weight Marker Mix	Thermo Scientific	#26681	SDS-PAGE belirteci

Taq polymerase	Sibenzyme	#E341	PCR/PZT
NheI Restriction Endonuclease	New England BioLabs (NEB)	#R0131S	Restriksiyon endonükleaz kesimi
EcoRI Restriction Endonuclease	New England BioLabs (NEB)	#R0101S	Restriksiyon endonükleaz kesimi
T4 DNA Ligase	Fermentas	#EL0014	Ligasyon
Dnase I, Rnase-free	Thermo Scientific	#EN0521	DNA'dan arındırma

Ek 3 Tez DeneYlerinde Kullanılan Laboratuvar Cihazı ve Gereçleri

Kullanılan Cihaz	Markası	Katalog Numarası
Çalkalamalı İnkübator	SheaLab	SL
Düşük Basınçlı Kromotografi	BioRad	Biologic DueFlow
Buz Makinesi	Scotsman	AF80
Soğutmalı Santrifüj (KÜÇÜK)	Thermo	IEC MICROCL 17R Centrifuge
Soğutmalı Santrifüj (ORTA)	Sigma	3K30
Soğutmalı Santrifüj (BÜYÜK)	Beckman Coulter	Allegra X-15R Centrifuge
Orbital Shaker	FinePCR	SH30
Thermal Cycler (BIOMETRA)	Biometra	Thermocycler
Thermal Cycler (BIORAD)	BioRad	DNA Engine Gradient Cycler

Spektrofotometre	BioRad	
Nanodrop	NanoDrop	ND-1000
Versadoc Görüntüleme Sistemi	BioRad	VersaDoc Imaging System
Agaroz Elektroforez	Thermo	owl
Page	BioRad	Mini Protean Tetra System
İnkübatör	Binder	
İki Yana Çalkalamalı Shaker	Daigger Rocker	
Ph Metre	Hanna instruments HI221	
Ph Metre Kağıdı	Sigma	P-4661
Ph Metre Kağıdı	Merck	1.09535.0001
CO ₂ İnkübatörü	Sanyo	MCO-20AIC
Su Cihazı	Millipore	ELIX + MilliQ (Gradient)
Su Banyosu	Lab Line	Aquabath
Mikroskop	Leica	DM LS2
Floresan Mikroskop	Zeiss	Axio Version 4.3 Imager M1
Otoklav	ALP	
Vorteks	Labnet	VX100
Pastör Fırını	Memmert	
Tartı	Shimadzu	AX200 / BX320H
Magnetik Karıştırıcı	Cimarec	
Sonikatör	Sonics	Vibra Cell

Ek 4 Tez Deneylerinde Kullanılan R-Kodları

- Plackett-Burman deneysel tasarım R-kodu

```
library("FrF2")

# factors with predefined levels
factorNamesL = list(temp = c(22, 37),
  pH = c(5.5, 7.5),
  iptg = c(0.02, 0.2),
  startOD = c(0.4, 0.8),
  indTime = c(12, 24),
  rmp = c(100, 200))

# RESPONSE: protein production
proteinLevels <- c(
  648,
  283,
  371,
  635,
  537,
  386,
  175,
  312,
  187,
  605,
  646,
  404,
  654,
  438,
  254,
  460
)

proteinRatio <- c(
  2.1891891892,
  0.6086021505,
  1.0108991826,
  1.0583333333,
  2.685,
  0.4237102086,
  0.8139534884,
  0.3653395785,
  0.4202247191,
  1.295503212,
  1.0205371248,
  1.150997151,
  0.6913319239,
  0.7487179487,
  0.2123745819,
  0.5808080808
)

# RESPONSE: macrophage neopterin production
neoptrnLevels <- c(0,
  0,
  0,
  0,
  0,
  0)

# replicating a fractional design is not so useful

planAnnotated <- FrF2(nruns = 16,
  nfactors = length(factorNamesL),
  factor.names = factorNamesL,
  replications = 1,
  seed = 1024,
)
planResponse <- add.response(planAnnotated, proteinLevels)
summary(planResponse)
IAPlot(planResponse)
summary(lm(planResponse))
```

- Box-Behnken deneysel tasarım R-kodu

```

library("DoE.wrapper")
library("rsm")

bbdFactors = list(temp = c(22, 37),
                 indTime = c(12, 24),
                 startOD = c(0.4, 0.8)
                )

bbdPlan = bbd.design(nfactors = 3,
                   ncenter = 1,
                   factor.names = bbdFactors,
                   seed = 1024
                  )

bbdPlan

bbdResponse = c(
  0.2678434382,
  0.4865771812,
  0.1576208178,
  0.1859922179,
  1.0347394541,
  0.2286885246,
  0.2520325203,
  0.5824508321,
  0.4925187032,
  0.2863849765,
  1.0390243902,
  0.3512304251,
  1.1020408163
)

bbdPlanResponse <- add.response(design = bbdPlan, response = bbdResponse)

codedBbdPlan = code.design(bbdPlan)
#decode.design(bbdPlan)
f = rsmformula(design = bbdPlanResponse,
              degree = 2,
              coded = FALSE
              )

linmod = rsm(formula = f, data = bbdPlan)
print(linmod)
steepest(linmod)

#GRAPHICS
par(mfrow = c(3, 3))

persp.lm(linmod, temp ~ indTime, zlab = bbdResponse)
contour.lm(linmod, temp ~ indTime)
image.lm(linmod, temp ~ indTime)

persp.lm(linmod, temp ~ startOD, zlab = bbdResponse)
contour.lm(linmod, temp ~ startOD)
image.lm(linmod, temp ~ startOD)

persp.lm(linmod, indTime ~ startOD, zlab = bbdResponse)
contour.lm(linmod, indTime ~ startOD)
image.lm(linmod, indTime ~ startOD)

```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Pelin KOLÇAK

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 30/11/1988

Medeni Hali : Bekar

Uyruğu: TC

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Kurumu (Kurum ve Yıl)

- **Lisans** : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2011
- **Lise** : Kocatepe Mimar Kemal Anadolu Lisesi, 2007

Çalıştığı Kurumlar: 2C Biyoteknoloji Sağlık Laboratuvar ve Tıbbi Cihazlar araştırma Geliştirme San. Tic. Ltd. Şti., 2014-

Yayımlar

Kolçak P, Can C, Engin D. Production of active human interferon gamma in *Escherichia coli* cells. 2014 September; 8 – 10. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium (Poster).

Can C, Kolçak P, Yalınkılıç A, Engin D. Production of active human interferon alpha *Escherichia coli* cells. 2014 September; 8 – 10. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium (Poster).

PRODUCTION OF ACTIVE HUMAN INTERFERON GAMMA IN *Escherichia coli* CELLS

Pelin Kolçak, Ceren Can, Doruk Engin

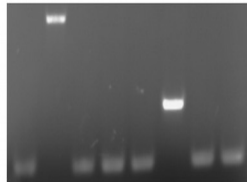
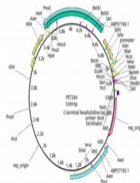


introduction

Interferon- γ (IFN- γ) is the only member of type II class interferons with antiviral, immunoregulatory and anti-tumor activities. This cytokine has well known promoting effect on NK cells, T – cells, B – cells and macrophages. IFN- γ favor Th1 differentiation from undifferentiated Th0 cells, which in turn cause more IFN- γ secretion in a positive feedback manner. IFN- γ has been shown to be a key immunoregulatory molecule. There are numerous studies that IFN- γ has been used in a various clinical indications including cancer, tuberculosis, hepatitis, chronic granulomatous disease, osteopetrosis, scleroderma. In recent years, anti-IFN- γ antibodies were subjected to trials against autoimmune diseases.

In this study, we aimed to establish a bacterial cells to produce active recombinant human IFN- γ . For this purpose, we designed and constructed an expression plasmid encoding full coding sequence of IFN- γ and optimized the expression and purification conditions. Lastly, we have conducted activity assays in U937 human macrophage cell line.

cloning of IFN- γ CDS



mRNA purification

Buffy coat was separated from 5 ml of blood. White blood cells were subjected to 6 M guanidium to facilitate lysis. Phenol chloroform extraction was performed to isolate and purify total RNA from the cells.

Cloning of human IFN- γ CDS in bacterial expression vector

We have designed oligonucleotide primers according to the Genbank record NM_000619. Reverse transcription of mRNA was followed by amplification of mature IFN- γ coding portion of the CDS. Both plasmid vector pET28a and IFN- γ amplification product was double digested with NheI and EcoRI restriction endonucleases. After ligation of the digested insert and vector, transformation of *Escherichia coli* JM109 cells with this circularized DNA was performed by using PEG6K – DMSO protocol. Transformants were selected on Luria Bertani agar plates supplemented with kanamycin. After overnight incubation, colony PCR was performed to determine the bacterial colonies that held the plasmids with cloned insert. The selected colonies were confirmed to have correctly positioned insert by using Sanger DNA sequencing.

expression & purification

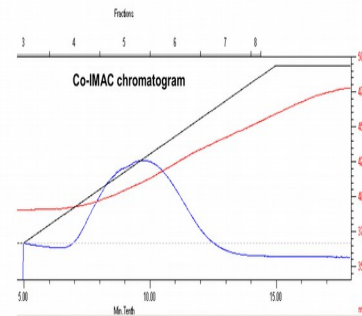
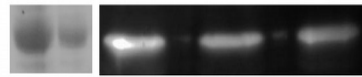
Preparation of expression host cells

Midiprep plasmid isolation was performed to obtain bulk IFN- γ expression plasmid. Purified plasmid was transferred to *Escherichia coli* BL21 cells. Transformed bacterial colonies were selected by using kanamycin LB plates.

Preliminary recombinant protein expression experiments

E. coli BL21 cells with IFN- γ cloned expression plasmid were subjected to expression optimization experiments. Biomass population density, IPTG concentration, incubation temperature, medium composition were optimized in 2 ml scale. Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was performed to analyse IFN- γ synthesis yields. western blotting was performed to confirm recombinant IFN- γ production.

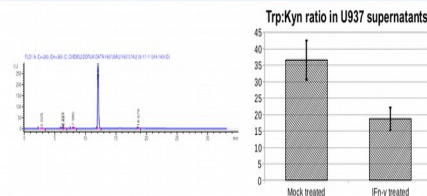
Coomassie Blue Staining & Western Blotting



Small scale expression and purification of IFN- γ

After preliminary optimization experiments, IFN- γ expression was performed in 100 and 250 ml scales. Following incubation of the induced culture, bacterial cells were harvested. The bacterial pellet was lysed to release IFN- γ . After clearing the lysate by centrifugation followed by filtration, chromatographic purification of the recombinant protein was performed. The expanded volume lysate was injected to cobalt loaded immobilized metal affinity column. After washing steps, elution was performed by using an increasing gradient of imidazole. Sephadex G25 group separating size exclusion column was used to remove imidazole from the final product. Purified product was analyzed in polyacrylamide gel electrophoresis and western blot. Bradford assay was used to quatitate the purified product.

activity testing



Assaying the activity of recombinant IFN- γ

U937 human macrophage cell line was used to assay the physiological activity of recombinant IFN- γ . Cells were treated either with recombinant GFP (as an irrelevant protein) or IFN- γ in 100 pg/ml concentration. After 6 hours of incubation, culture supernatants were collected. Following protein precipitation with trichloroacetic acid, tryptophane and kynurenine levels were measured by using C18 chromatography. Tryptophane levels were detected fluorometrically (Ex: 285 nm, Em: 360 nm), while kynurenine detection was done spectrophotometrically at 360 nm. Kynurenine / Tryptophane ratio was calculated for each culture supernatant.

REFERENCES

- Miller CHT, Maher SG, Young HA. Clinical Use of Interferon- γ . *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009 Dec 1;1182(1):69-79.
- Farrar MA, Schreiber RD. The Molecular Cell Biology of Interferon-gamma and its Receptor. *Annual Review of Immunology*. 1993;11(1):571-611.
- Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances*. 2012 Sep;30(5):1102-7.
- Yip YK, Barrowdough BS, Urban C, Vlicek J. Purification of two subspecies of human gamma (immune) interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Mar;79(6):1820-4.
- Taniguchi T, Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M. Molecular cloning of human interferon cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980 Jul;77(7):4003-6.

PRODUCTION OF ACTIVE HUMAN INTERFERON ALPHA IN *Escherichia coli* CELLS

Ceren Can, Pelin Kolcak, Aslinur Yalinkilic, Doruk Engin

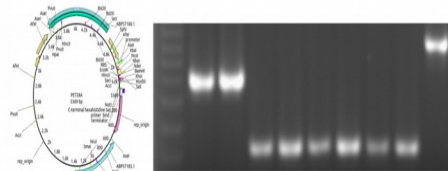


introduction

Interferons are a class of glycoproteins that take place in the first line of defence against microbes. Interferon alpha (IFN- α) is a family of at least 23 different cytokines with antiviral, antiparasitic, antiproliferative activities. This cytokine mainly originates from monocyte/macrophages, lymphoblastoid cells, fibroblasts in the context of microbial infections.

Along with somatostatin and insulin, recombinant IFN- α is one of the first available therapeutic peptide and mainly employed in cancer chemotherapy and in the treatment of chronic hepatitis B and C. The market share of IFN- α , IFN- γ and IFN- β is expected to increase as new therapeutic indications are investigated and explored.

cloning of IFN- α CDS



DNA purification

DNA purification was performed from buffy coat separated from 5 ml of blood by using phenol chloroform protocol.

Cloning of human IFN- α CDS in bacterial expression vector

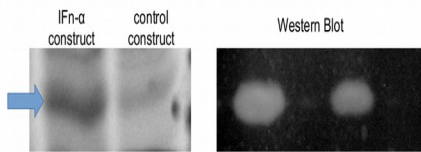
We have designed oligonucleotide primers according to the Genbank record NG_029154. As IFN- α coding sequence does not have any introns we have directly amplified mature peptide sequence segment from purified DNA. Both plasmid vector pET28a and IFN- α amplification product was double digested with EcoRI and Sall restriction endonucleases. After ligation of the digested insert and vector, transformation of *Escherichia coli* JM109 cells with this circularized DNA was performed by using PEG6K – DMSO protocol. Transformants were selected on Luria Bertani agar plates supplemented with kanamycin. After overnight incubation, colony PCR was performed to determine the bacterial colonies that held the plasmids with cloned insert. The selected colonies were confirmed to have correctly positioned insert by using Sanger DNA sequencing.



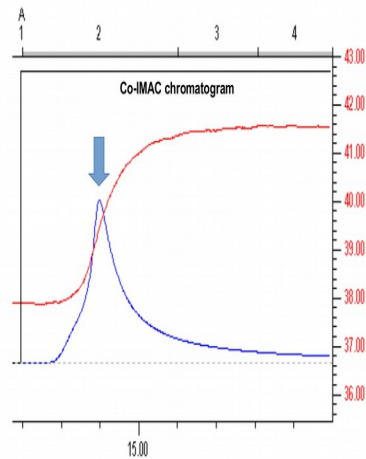
REFERENCES

- Schroder K, Herzig PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004 Feb;75(2):163-89.
- Yoon S, Hirata RDC, Nguyen NY, Cui R, Russo M, Hirata MH. Expression and biological activity of two recombinant polypeptides related to subunit 1 of the Interferon- α receptor. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2000 Jul;33(7):771-8.
- Lobstein J, Ehrlich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M, Shuffie, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact.* 2012 May 8;11:56.
- Vogel SN, Friedman RM, Hogan MM. Measurement of antiviral activity induced by interferons alpha, beta, and gamma. *Curr Protoc Immunol.* 2001 May;Chapter 6 Unit 6.9.
- Kim CS, Jung JH, Wakita T, Yoon SK, Jang SK. Monitoring the Antiviral Effect of Alpha Interferon on Individual Cells. *J Virol.* 2007 Aug 15;81(16):8814-20.
- Sarsini-Filipowicz M, Wang X, Yan M, Duong FHT, Pol V, Hilton DJ, et al. Alpha Interferon Induces Long-Lasting Refractoriness of JAK-STAT Signaling in the Mouse Liver through Induction of USP18/UBP43. *Mol Cell Biol.* 2009 Sep 1;29(17):4841-51.

expression & purification

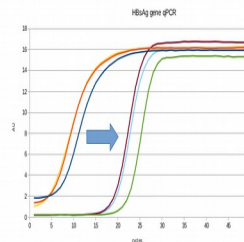


Preliminary expression studies revealed 24.795 kDa protein band which was later confirmed to be IFN- α product by staining with anti-His6 antibodies



The pellet from 250 ml scale culture was lysed and purified with cobalt chelation column (Figure 3). Single step elution was performed to prevent the expansion of the fraction volume. Imidazole was removed by using Sephadex G25 group separating column.

activity testing



IFN- α and GFP treated Hep3G culture supernatants were collected. HBSAg gene was amplified and $\Delta\Delta C_t$ values were calculated for IFN- α treated group. There was 3.22 \pm 0.43 fold decrease in HBSAg gene copy in interferon treated cells.