



**HEMATOPOETİK HÜCRELERİN ÜRETİLMESİ, ÇOĞALTILMASI VE
FARKLILAŞMASINDA GÖREVLİ EPO VE TPO'NUN MEDİKAL
BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜN OLARAK ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

DUYGU DÜZGÜN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI
Dr. Öğr. Üyesi Seçil Erden Tayhan
Mayıs - 2019
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEMATOPOETİK HÜCRELERİN ÜRETİLMESİ, ÇOĞALTILMASI VE
FARKLILAŞMASINDA GÖREVLİ EPO VE TPO'NUN MEDİKAL
BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜN OLARAK ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU

DUYGU DÜZGÜN

TOKAT
Mayıs - 2019

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: 2016-60) ve TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik 2015-2 dönemi Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

Duygu DÜZGÜN tarafından hazırlanan "Hematopoetik Hücrelerin Üretimi, Çoğaltılması ve Farklaşmasında Görevli EPO ve TPO'nun Medikal Biyoteknolojik Ürün Olarak Üretimi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 31 MAYIS 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Seçil Erden Tayhan

Üye
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Üye
Doç. Dr. Ferda ESER
Amasya Üniversitesi



ONAY


Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
03-10-2019

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.



DUYGU DÜZGÜN

31 Mayıs 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEMATOPOETİK HÜCRELERİN ÜRETİLMESİ, ÇOĞALTILMASI VE FARKLILAŞMASINDA GÖREVLİ EPO VE TPO'NUN MEDİKAL BİYOTEKNOLOJİK ÜRÜN OLARAK ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

DUYGU DÜZGÜN

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ SEÇİL ERDEN TAYHAN

Hematopoetik büyüme faktörleri kan hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyaran sitokinlerdir. Eritropoetin (EPO) ve trombopoetin (TPO) başlıca hematopoetik büyüme faktörlerindedir. Eritropoetin kırmızı kan hücrelerinin oluşumu üzerindeki etkisi iyi bilinmektedir. Trombopoetin megakaryopoezi ve trombosit oluşumunu uyarmaktadır. Hematopoez sırasında, EPO ve TPO sinerjik ve antagonistik bir şekilde etkileşime girebilmektedirler. EPO ve TPO, reseptör bağlama alanlarında önemli bir homoloji sergilemektedirler (% 20 özdeşlik ve % 25 benzerlik). Bu tez çalışmasında, insan EPO proteininin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak bakteriyel ekspresyon sisteminde üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın üç amacı, biyoinformatik çalışmalar yapılarak *E.coli* pET30a ekspresyon sistemine klonlanmış halde dizinin temin edilmesi; *E.coli* BL21 pLysE hücrelerine transformasyonu sonucunda rekombinant olarak ekspresyonu ve saflaştırılması; endotel hücreler için biyolojik karakterizasyonunun belirlenmesidir. Transforme hücrelerin seçimi uygun antibiyotikli besiyerinde gerçekleştirilmiştir. EPO His-etiketi ile eksprese edildi ve Nikel temelli afinite kromatografisi teknikleri saflaştırma amacı ile kullanılmıştır. SDS-PAGE yöntemi ile kalitatif olarak analiz edilmiştir. Bu çalışmada üretilen rekombinant EPO'nun biyolojik olarak aktifliği insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kullanılarak yapılan poliferasyon analizi ile belirlenmiştir. Bununla birlikte; insan TPO proteininin rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak maya ekspresyon sisteminde üretimi için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, biyoinformatik çalışmalar sonunda elde edilen pPIC3.5K-TPO vektörü yapay olarak temin edilmiştir. pPIC3.5K-TPO kontsüktü lineer hale getirilmiştir. Fakat *Pichia pastoris* GS115 kompetent hücrelerine transformasyonu ve *Pichia pastoris* genomuna entegrasyonu sağlanamamıştır.

2019,68 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Hematopoetik büyüme faktörleri, rekombinant DNA teknolojisi, *E.coli*, *Pichia pastoris*

ABSTRACT

MASTER THESIS

PRODUCTION, PROPAGATION AND DIFFERENTIATION OF HEMATOPOETIC CELLS PRODUCING, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF EPO AND TPO AS MEDICAL BIOTECHNOLOGICAL PRODUCT

DUYGU DÜZGÜN

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

(SUPERVISOR:) ASST. PROF. DR. SEÇİL ERDEN TAYHAN

Hematopoietic growth factors are cytokines that stimulate the proliferation and differentiation of blood cells. Erythropoietin (EPO) and thrombopoietin (TPO) are the main hematopoietic growth factors. The effect of erythropoietin on the formation of red blood cells is well known. Thrombopoietin stimulates megakaryopoiesis and platelet formation. During hematopoiesis, EPO and TPO may interact in a synergistic and antagonistic manner. EPO and TPO exhibit significant homology in the receptor binding domains (20% identity and 25% similarity). In this thesis, human EPO protein was produced in bacterial expression system using recombinant DNA technology. The three objectives of this study were to provide the sequence cloned into the *E. coli* pET30a expression system by bioinformatics studies; Recombinant expression and purification by transformation into *E.coli* BL21 pLysE cells; Biological characterization for endothelial cells. The selection of transformed cells was carried out on the appropriate antibiotic medium. EPO was expressed with His-tag and Nickel-based affinity chromatography techniques were used for purification. It was analyzed qualitatively by SDS-PAGE method. The biological activity of the recombinant EPO produced in this study was determined by the polylation analysis using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). However; Studies have been carried out for the production of human TPO protein in yeast expression system using recombinant DNA technology. In this study, *pPIC3.5K-TPO* vector obtained as a result of bioinformatics studies is artificially provided. The *pPIC3.5K-TPO* construct was linearized. However, the transformation of *Pichia pastoris GS115* into competent cells and its integration into the *Pichia pastoris* genome could not be achieved.

2019,68 PAGE

KEY WORDS: Hematopoietic growth factors, recombinant DNA technology, *E. coli*, *Pichia pastoris*

ÖNSÖZ

Bir gün insanlığa bir katkı sağlamak ve problemlere çözüm getirebilmek için çıkmış olduğum bu yolda, bana dürüst bir şekilde emanet edilen bir çalışmada alın teri ile elimden gelenin fazlasını yapmayı, bu yolda ne olursa olsun hakkı ile ilerlemem gerektiğini bana öğreten ve gittiğim her yolda daima yoluma fener olan değerli öğretmenim Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye sonsuz teşekkür borçlu olduğumu belirtmek isterim.

Ekip ürünü olarak ortaya çıkan bu tez çalışmasında hem bilimsel anlamda hem de iradeli bir şekilde çalışmalarına devam etmemi sağlayan değerli öğretmenim Arş. Gör. Dr. Sema Bilgin'e ve danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN'a her şey için teşekkür ederim.

Hem lisans hayatım hem de yüksek lisans süreci boyunca deneyimlerini tüm kalbi ile paylaşan, vazgeçmemem için desteğini hiç esirgemeyen ve hayallerime ortak olan değerli öğretmenlerim Arş. Gör. Hülya KUDUĞ'a, Arş. Gör. Özlem KAPLAN'a ve Arş. Gör. Rizvan İMAMOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Lisans hayatımda, miras kadar değerli olan duruşunu bana yol gösterici olarak bıraktığı için değerli öğretmenim Volkan KÖSELİ'ye teşekkür ederim.

Hayallerime gittiğim bu yolda sevgiyi, saygıyı ve kalp kırmadan dürüst bir şekilde devam etmeyi öğreten değerli babam Hasan Düzgün'e ve annem Ayten Düzgün'e sonsuz teşekkür ederim.

DUYGU DÜZGÜN

31 Mayıs 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER	3
2.1. Rekombinant Protein Üretimi	3
2.2. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri..	4
2.2.1. Bakteriyel sistemler	5
2.2.2. Maya	6
2.2.3. Memeli ekspresyon sistemi	7
2.3. Pichia Pastoris	7
2.4. Hematopoetik Büyüme Faktörleri	8
2.5. Eritropoetin ve Trombopoetin	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	13
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	14
3.1.3. Kullanılan enzimler	16
3.1.4. Kullanılan çözeltiler	16
3.2. Yöntem	20
3.2.1. EPO ve TPO geninin optimizasyonu ve sentezi.....	20
3.2.2. HBF genlerinin uygun <i>E.coli</i> suşuna transforme edilmesi	23
3.2.3. Bakteriyel ekspresyon sisteminde EPO'nun üretimi	24
3.2.4. Maya ekspresyon sisteminde TPO'nun üretimi	34
4. BULGULAR.....	38
4.1. Kodon Optimizasyonu	38
4.2. Vektör Optimizasyonu	42
4.3. Yapay Gen Sentezi	43
4.4. Bakteriyel Ekspresyon Sisteminde EPO Proteinin Üretimi	45

4.4.1. EPO proteininin afinite kromatografisiyle saflaştırılması.....	46
4.4.2. EPO proteini için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması	47
4.4.3. EPO proteini saflaştırılması.....	47
4.4.4. Rekombinant EPO hücre canlılık testi sonucu	48
4.5. pPIC3.5K-TPO'nun Saflaştırılması	49
5. TARTIşMA VE SONUÇ	50
6. KAYNAKLAR	52
8. ÖZGEÇMİş	54



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Açıklama

bç	baz çifti
gr	gram
mg	miligram
ml	mililitre
μ M	mikromolar
M	molar
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)

Kısaltmalar

Açıklama

APS	Amonyumpersülfat
BSA	Sığır (Bovine) Serum Albümini
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
LB	Luria-Bertani
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromürün
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
PIPES	Piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)
PMSF	Fenil metil sülfonil florit

P. pastoris

Pichia pastoris

SDS

Sodyum dodesil sülfat

SDS PAGE

SDS poliakrilamid jel elektroforezi

TAE

Tris-asetat-EDTA

TEMED

N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin

EPO

Eritropoetin

TPO

Trombopoetin

rEPO

rekombinant eritropoetin

rTPO

rekombinant trombopoetin

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.1. pET30a-EPO konstrüktü.....	45
Şekil 4.2. pPIC3.5K-TPO konstrüktü.....	46
Şekil 4.3. %12'lik SDS-PAGE jel görüntüsü.....	47
Şekil 4.4. rEPO SDS-PAGE jel görüntüsü.....	48
Şekil 4.5. Yeniden katlanma (Refolding).....	49
Şekil 4.6. rEPO hücre canlılık-konsantrasyon grafiği.....	50
Şekil 4.7. Saflaştırılan plazmit DNA'nın %0.5'lik agaroz jelde analizi.....	50



ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Yaygın olarak kullanılan ekspresyon sistemleri.....	5
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar.....	13
Çizelge 3.2. Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler.....	14
Çizelge 3.3. Kullanılan enzimler.....	16
Çizelge 3.4. Sipariş edilen genleri taşıyan vektör sistemlerinin adı.....	23
Çizelge 3.5. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları.....	27
Çizelge 3.6. İnklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması denemeleri.....	28
Çizelge 3.7. Rekombinant EPO ve negatif kontrolün uygulama konsantrasyonları.....	34
Çizelge 3.8. pPIC3.5K-TPO vektörünün linelerizasyonu.....	36
Çizelge 4.1. Hücre canlılık testi.....	49

1. GİRİŞ

Günümüzde rekombinant teknoloji ürünü pek çok biyolojik madde üretilmektedir. Bu biyolojik maddeler arasında, medikal biyoteknolojik çalışmalarda büyük bir öneme sahip olan hematopoetik büyüme faktörleri de bulunmaktadır. Hematopoetik büyüme faktörleri olarak bilinen glikoprotein ailesi, hematopoetik öncü hücrelerin proliferasyonunda, farklılaşmasında ve olgun kan hücrelerinin aktivasyonunda önemli roller üstlenmektedirler.

Son zamanlarda hücrelerin farklılaşmasını ve proliferasyonunu uyaran birçok faktör tespit edilmiş ve ticari üretime uygun hale gelmiştir. Bunların arasında yer alan hematopoetik faktörlerin, periferel kan hücre sayılarını arttırarak kanser, anemi, nötropeni, vb. tedavilerinde yaygın olarak kullanılabilir hale getirilmesi günümüzde hedeflenmektedir.

Hematopoietik büyüme faktörleri (HGF); hematopoiezin regülasyonunu, hematopoietik progenitör (öncül) hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan çeşitli glikoproteinlerdir. Medikal biyoteknolojik ürün olarak geniş kullanım alanına sahip HBF'ler arasında yer alan ve klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılan farklılaşma faktörleri; EPO ve TPO olarak bilinmektedir.

Periferel kan hücrelerinin tümü pluripotent kök hücrelerinden çeşitlenmiştir. Bu hücreler yenilenebilir ve özel uyarıya cevap veren herhangi bir kan hücre tipine farklılaşabilir. Farklılaşmada etkili olan bu faktörlerin spesifik uyarımları kontrol etmesi klinik uygulamalarda çok önemlidir. Klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılan farklılaşma faktörlerinden bazıları eritropoetin (EPO) ve trombopoetin (TPO) olarak da bilinmektedir.

EPO ve TPO kemoterapi, radyoterapi ve kemik iliği transplantasyonuna bağlı trombositopenin ve çeşitli kan hastalıklarının (anemi, nötropeni vb.) tedavisinde kullanılmaktadır. Tedavi edici özellikte olan terapötik proteinler insan ve hayvanlardan yeterli saflıkta ve yüksek verimde ve gerektiği kadar elde edilemezler. Bu nedenle rekombinant DNA teknolojisi proteinlerin, bakteriler (en sık kullanılan *E.coli*) ve mayalar

gibi biyolojik fabrikalar olarak nitelendirilebilecek organizmalarda üretilmelerine olanak vermiştir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında hematopoetik faktörlerden olan EPO'nun bakteriyel ekspresyon vektöründe rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma üç temel basamaktan oluşmaktadır: EPO'nun uygun *E.coli* (DH5 α) suşuna transforme edilerek çoğaltılması işlemi gerçekleştirildikten sonra *E.coli* mikroorganizmasında üretimi gerçekleştirilmesi; üretilen rekombinant EPO'nun kantitatif analizinin yapılması; kantitatif analizi yapılan EPO'nun hem klinik hem de AR-GE amaçlı çalışmalarda kullanılmak üzere biyoaktivasyon çalışmaları ile biyolojik etkisinin tespit edilmesi sağlanmıştır.

Bununla birlikte ticari değeri oldukça yüksek olan TPO'nun laboratuvarımızda mevcut olan *Pichia pastoris* ökaryotik ekspresyon sisteminde üretilmesi için uygun kompetent hücrelerin hazırlanmıştır. Hazırlanan kompetent hücrelere transformasyon işlemi yapılmıştır ve TPO'nun linerize hale getirilmesi gerçekleştirilmiştir. Fakat linerize hale getirilen TPO'nun uygun kompetent hücrelere transformasyonu sağlanamamıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

2.1. Rekombinant Protein Üretimi

Yüksek verimli çalışmalar binlerce eş zamanlı biyolojik moleküllerinin tanımlanmasını veya elde edilmesini sağlayan ve böylece büyük çaplı tekrarlamayı mümkün kılan araştırmalar olarak tanımlanmaktadır (Jia ve Jeon, 2016). Bu teknoloji ilk otomatik DNA sekanslayıcıların geliştirildiği ve insan genom sekansının başlatıldığı zaman ortaya çıkmıştır (Hsiao ve Kuo, 2006). Genomik sonrası dönemde; yüksek verimli tekniklerin kullanımı DNA, RNA, proteinler, lipitler ve metabolitlerin ölçülmesi açısından çarpıcı bir biçimde artmıştır (Cameron ve ark., 2014). Sonuç olarak bu teknikler; kanser biyolojisi, ekoloji, hücre biyolojisi ve sistem biyolojisi ile ilgili çeşitli biyolojik soruları yanıtlamak için başarıyla uygulanmaktadır (Pepperkok ve Ellenberg, 2006).

Protein ekspresyonu ve saflaştırma biyokimyada merkezi bir rol oynamaktadır. Rekombinant proteinler prokaryotik sistemler (*Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis*), ökaryotik sistemler (maya, böcek hücreleri ve memeli hücreleri), veya in vitro sistemler kullanılarak ifade edilebilir. *E.coli* sistemi, rekombinant protein ekspresyonunu araştırmak için ilk tercih edilen konukçudur. Bunun en önemli sebepleri; *E.coli* hücrelerinin kolayca manipüle edilebilmesi, ucuz bir şekilde kültürlenebilmesi ve hızla büyümesi olarak belirlenmiştir (Rosano ve Ceccarelli, 2014). Son yıllarda, inklüzyon cisimciği, toksisite, protein inaktivasyonu, mRNA kararsızlığı ve post-translasyonel modifikasyonların eksikliğini içeren bu sistem problemlerinin üstesinden gelebilmek için yeni suşlar, vektörler ve etiketler geliştirilmiştir (Khow ve Suntrarachun, 2012). *E.coli* ekspresyon sistemi geniş ölçüde incelenmiştir. Fakat bu sistem kullanılarak yapılan protein ekspresyonu ve saflaştırılma işlemleri yoğun bir emek ve zaman alıcıdır (Lesley, 2001).

2.2. Rekombinant Protein Üretiminde Kullanılan Ekspresyon Sistemleri

Proteinlerin rekombinant üretimi bir DNA vektöründe hücrelerin istenen gen ile transfekte edilmesidir. Daha sonra gen konukçu hücresel makineleri kullanan bir proteine dönüşmektedir. Bu eksprese edilen proteinler daha sonra hücreleri parçalayarak bir sonraki adım olan saflaştırma basamağına geçilmektedir. Hem prokaryotik hem de ökaryotik ifade sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki sisteminde sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar vardır. Protein türü, işlevi ve istenen protein verimi gibi ekonomik ve kalitatif yönlerle bağlı olarak özel bir ekspresyon sistemi seçilmektedir. Bakteriyel, maya, böcek ve memeli ekspresyon sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda araştırmacılar hücresiz ifade sistemlerini de kullanmaktadır (Anonima, 2019).

Rekombinant protein ürününün özellikleri ve kullanım amacı konukçu sisteminin seçimini etkileyecektir. Bu nedenle tek bir 'ideal' sistem bulunmamaktadır. Yaygın olarak kullanılan ekspresyon sistemleri ve her bir sistemin örnek ürünleri Çizelge 1.1'de verilmektedir (Wyre, 2014).

Çizelge 1.1. Yaygın olarak kullanılan ekspresyon sistemleri

Expression system	Most common application	Advantages	Challenges
Mammalian 	<ul style="list-style-type: none"> • Functional assays • Structural analysis • Antibody production • Expression of complex proteins • Protein interactions • Virus production 	<ul style="list-style-type: none"> • Highest-level protein processing • Can produce proteins either transiently, or by stable expression • Robust optimized transient systems for rapid, ultrahigh-yield protein production 	<ul style="list-style-type: none"> • Gram-per-liter yields only possible in suspension cultures • More demanding culture conditions
Insect 	<ul style="list-style-type: none"> • Functional assays • Structural analysis • Expression of intracellular proteins • Expression of protein complexes • Virus production 	<ul style="list-style-type: none"> • Similar to mammalian protein processing • Can be used in static or suspension culture 	<ul style="list-style-type: none"> • More demanding culture conditions than prokaryotic systems • Production of recombinant baculovirus vectors is time consuming
Yeast 	<ul style="list-style-type: none"> • Structural analysis • Antibody generation • Functional analysis • Protein interactions 	<ul style="list-style-type: none"> • Eukaryotic protein processing • Scalable up to fermentation (grams per liter) • Simple media requirements 	<ul style="list-style-type: none"> • Fermentation required for very high yields • Growth conditions may require optimization
Bacterial 	<ul style="list-style-type: none"> • Structural analysis • Antibody generation • Functional assays • Protein interactions 	<ul style="list-style-type: none"> • Scalable • Low cost • Simple culture conditions 	<ul style="list-style-type: none"> • Protein solubility • May require protein-specific optimization • May be difficult to express some mammalian proteins
Algal 	<ul style="list-style-type: none"> • Studying photosynthesis, plant biology, lipid metabolism • Genetic engineering • Biofuel production 	<ul style="list-style-type: none"> • Genetic modification and expression systems for photosynthetic microalgae • Superb experimental control for biofuel, nutraceuticals, and specialty chemical production • Optimized system for robust selection and expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Nascent technology • Less developed compared to other host platforms
Cell-free 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxic proteins • Incorporation of unnatural label or amino acids • Functional assays • Protein interactions • Translational inhibitor screening 	<ul style="list-style-type: none"> • Open system; able to add unnatural components • Fast expression • Simple format 	<ul style="list-style-type: none"> • Scaling above multimilligram quantities may not be costly

2.2.1. Bakteriyeel sistemler

Verimlilik açısından, söz konusu ürün için mümkün olan en basit sistemi kullanmak avantaj sağlamaktadır. Bu bakımdan bakteriyeel sistemler birçok avantaja sahiptir: bunlar basit organizmalardır ve maliyeti düşük büyüme ortamı kullanan nispeten basit

biyoreaktörlerde yüksek ürün verimliliği ile hızla büyüebilirler. Bu nedenle, mikrobiyal konaklar rekombinant protein üretimi işlemleri için avantajlı olabilir (Wyre, 2014).

Bununla birlikte bakteriler, temel olarak daha karmaşık olan ökaryotik proteinler üretme yeteneklerini içeren belirli sınırlamalara sahiptir. İlk olarak, ökaryotik proteinler prokaryotlardan, özellikle glikosilasyon, karboksilasyon, hidroksilasyon, sülfat ve disülfür bağı oluşumunda içeren transkripsiyon sonrası modifikasyonlara (post-transyoneel modifikasyon) önemli ölçüde kalmaktadırlar (Walsh ve ark., 2006). Genellikle post-transyoneel modifikasyonlar işlev veya farmosötük olarak kullanılan proteinler için immünolojik cevapları önlemek için gerekli olabilir. Bakteriler çoğu post-transyoneel modifikasyonları üretmezler. Örneğin, ökaryotik hücrelerde glikosile edilmiş bir protein *E.coli*'de üretildiğinde glikositlememiş olacaktır. Kısmi veya doğal olarak glikosile edilmiş bir proteinin sentezi glikosilasyon yapılmadığında işlevselliğini önemli ölçüde sınırlandırabilir.

E.coli'de 210 kDa proteininin üretildiği rapor edilmiş olmasına rağmen, bakteriler daha büyük rekombinant proteinlerin sentezinde zorluklar ile karşılaşmaktadır (Doekel ve ark., 2002; Palomares ve ark., 2004), tipik olarak <30 kDa proteini üretmek için bakteri sistemi kullanılmaktadır (Demain ve Vaishnav, 2009).

E.coli'ye ek olarak, *Bacillus subtilis* ve *Baocillus megaterium* gibi bakterilerde rekombinant protein üretimi için konukçu olarak kullanılmıştır. Bakteriler genellikle endotoksin üretmedikleri ve sekresyonda daha verimli oldukları için güvenli organizmalar olarak kabul edilmektedirler (Palomares ve ark., 2004).

2.2.2. Maya

Özellikle *Saccharomyces cerevisiae* ve metilotrofik mayalar olan *Pichia pastoris* ve *Hansenula polymorpha* gibi birçok maya rekombinant protein üretiminde kullanılmaktadır (Nielsen, 2013). Mayaların yüksek hücre yoğunluklarına ve yüksek verimde rekombinant protein üretmede nispeten diğer sistemlere göre basit ve ucuzdur.

Ek olarak, mayalar proteinleri salgılar ve glikosile edebilir. Ancak mayadaki glikosilasyon memeli hücrelerinkinden önemli ölçüde farklıdır ve ürün fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyebilir (Walsh, 2010).

2.2.3. Memeli ekspresyon sistemi

Terapötik protein ve aşuların üretimi için ideal bir ekspresyon sistemidir. Bu ekspresyon sisteminde, viral bazlı vektörlerin yanı sıra plazmid bazlı vektörler de (adenoviral vektör, vaccinia vektör), istenen geni kültürlenmiş memeli hücrelerine transfekte etmek için kullanılmaktadır. Bu yöntemde proteinler hem geçici hem de stabil hücre kültürleriyle ifade edilebilir. Bu sistem istenen dönüşüm sonrası modifikasyonları ve uygun protein katlanmasını sağlamaktadır. Bu yöntemin temel dezavantajları; yavaş hücre büyümesi, pahalı ortam ve kültür koşulları (sürekli CO₂ beslemesi, pahalı transfeksiyon reaktifleri) nedeniyle yüksek verimde protein üretim maliyeti olmaktadır. Yüksek protein verimi sadece süspansiyon kültürleri ile elde edilebilir. Örneğin. Çin Hamsteri Yumurtalık (Chinese Hamster Ovarian (CHO)) hücreleri, İnsan Embriyonik Böbrek (HEK 293) hücreleridir (Rosano ve Ceccarelli, 2014).

2.3. Pichia Pastoris

Metilotrofik maya *Pichia pastoris* çeşitli uygulamalar için üretilmesi amaçlanan rekombinant proteinlerin ekspresyon sistemi olarak kullanılmaktadır. Tek bir karbon kaynağı olarak metanol, glikoz, gliserol veya etanol içeren ucuz ortamlarda hızla büyümektedir. *P. pastoris* birçok post-translasyonel modifikasyon yapar ve hücre içi veya hücre dışı olarak rekombinant proteinler üretmektedir. Bu özelliklerinden dolayı, *P. pastoris*; biyoteknoloji, ilaç endüstrisi ve araştırmacılar için oldukça tercih edilen bir konak organizma haline gelmiştir (Özçelik ve ark., 2019).

Pichia pastoris ekspresyon sistemi çeşitli rekombinant heterolog proteinlerin üretimi için başarıyla kullanılmaktadır (Weinacker ve ark., 2014). *Pichia pastoris*'de rekombinant protein üretimi diğer ökaryotik ve prokaryotik ekspresyon sistemlerine göre çeşitli avantajlara sahiptir: (1) yüksek hücre yoğunluklu fermantasyon kolaylığı ile birlikte hızlı büyüme hızı; (2) endotoksin ve bakteriyofaj kontaminasyonunun giderilmesi; (3) iyi karakterize edilmiş maya ekspresyon vektörlerinin genetik manipülasyon kolaylığı; (4)

polipeptit katlama, glikosilasyon, metilasyon, asilasyon, ve alt hücre bölümlerini hedeflemeyi içeren çeşitli post-translasyonel modifikasyonlar; ve (5) maya hücrelerinin hasadı olmadan büyüme ortamından saflaştırılabilen salgılanmış proteinleri üretme yeteneğine sahip olmasıdır (Li ve ark., 2007). Tüm bu özellikler *Pichia pastoris*'i hem temel laboratuvar araştırmaları hem de endüstriyel üretim için kullanışlı bir sistem haline getirmektedir (Weinacker ve ark., 2014).

P.Pastoris'in yüksek salgılama kapasitesine ve metanol kaynaklı alkol oksidaz (AOX1) ile indüklenebilen promotörlere sahip olması bu sistemi tercih edilebilir hale getirmektedir. Fakat metanol üzerinde büyüme, yüksek oksijen ihtiyacı, yüksek ısı üretimi ve yanıcı bir substrat kullanımı için güvenlik önlemleri gibi endüstriyel ölçekte üretim için teknolojik problemlere sahiptir (Zahrl ve ark., 2017).

Genellikle birçok bilimsel çalışmada rekombinant protein üretimi alkol oksidaz geninin (AOX1) promotörünün kontrolü altında gerçekleştirilmektedir. AOX1 promotörü metanol tarafından indüklenir ve glukoz ve etanol tarafından bastırılmaktadır. Son yıllarda AOX1 promotörünün düzenleme mekanizmaları çalışılmaktadır. Rekombinant protein üretiminde kullanılan bir başka promotör ise gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenazdan (GAP) elde edilmektedir. Son çalışmalar pAOX1 ve pGAP'a ek olarak yeni tanımlanmış *P. pastoris*'in promotörlerini araştırmaktadır (Özçelik ve ark., 2019).

2.4. Hematopoetik Büyüme Faktörleri

Hematopoetik büyüme faktörleri (HGF'ler) olarak bilinen glikoproteinler ailesi; ilkel hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin çoğalmasında, farklılaşmasında ve hayatta kalmasının yanı sıra bazı olgun hücrelerin fonksiyonel aktivasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu etkilere HGF'lerin hedef hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen spesifik reseptörlere yüksek afinite bağlanması aracılık etmektedir. Hematopoetik büyüme faktörlerinin (HGF'ler) uygulanmasıyla kemik iliği yetmezliğinin düzeltilmesi veya iyileştirilmesi, hematopoezde araştırmanın ana pratik amacı olmuştur ve olmaya devam

etmektedir. Bununla birlikte, bu amaç hematopoetik büyüme faktörü ailesinin karakterizasyonuna yol açan doku kültürü çalışması ve saflaştırılmış hormonların in vitro ve in vivo çalışmalarda yorumlanmasına sağlamak amacıyla yeterli miktarda üretilmesine izin veren genleri sağlayan rekombinant DNA teknolojisi olmadan elde edilememiştir (Sieff, 2019).

1960'ların başındaki öncü çalışmalarla başlayarak, normal ve lösemik kan progenitör hücrelerinin yarı katı kültürde çözünür büyüme faktörlerinin varlığında çoğalabildiği kabul edilmiştir (Bradley ve Metcalf, 1966). Bu faktörler, yarı katı bir ortama yerleştirilmiş kemik iliği hücreleri tarafından kan hücrelerinin oluşumunu destekleme yeteneklerinden dolayı koloni uyarıcı faktörler (CSFs) olarak adlandırılmışlardır.

1970'lerde ve 1980'lerde, farklı faktörlerin varlığında büyüyen farklı koloni türlerine dayanan çok sayıda CSFs türü olduğu ortaya çıkmıştır. Bu gözlem, kan hücrelerinin büyümesinin ve farklılaşmasının, progenitör hücrelerin farklı soy özellikleri olan CSF'lere maruz bırakılmasıyla kontrol edildiği hipotezini ortaya çıkarmıştır. 1980'lerde ve 1990'larda bu faktörlerin birçoğu ve reseptörleri için genlerin moleküler klonlanmasından sonra, rekombinant CSF'lerin yapısı, işlevi ve biyolojisinin yanı sıra ilgili genlerinin moleküler biyolojisinin detaylı olarak incelenmesi mümkün olmuştur. Bu analiz, bağışıklık sistemindeki hücrelerin düzenlenmesi ile ilgili benzer çalışmaların yanı sıra, şu anda genel olarak hematopoetik ve bağışıklık sistemlerini kontrol eden ve bütünleştiren sitokinler veya lenfohematopoetik sitokinler olarak bilinen geniş bir etkileşimli düzenleyici molekül ailesinin var olduğunun farkına varmıştır (Metcalf, 1994).

Bu etkileşimli sitokin ağı, interferonlar, interlekinler, tümör nekroz faktörleri ve hematopoetik büyüme faktörlerini (koloni uyarıcı faktörler dahil) içermektedir. HGF'lerin ve reseptörlerinin başarılı bir şekilde klonlanması, hematopoezin moleküler ve hücrel biyolojisinin analizi için in vivo ve in vitro olarak çeşitli faktörlerin biyolojisinin

değerlendirilmesi amacıyla rekombinant proteinlerin üretimi için inanılmaz bir dizi sağlamıştır (Sieff ve ark, 2019).

2.5. Eritropoetin ve Trombopoetin

Eritropoetin (EPO), glikoprotein yapısındadır ve kemik iliğinde eritroid seride yer alan öncül hücrelerin yapımını uyarır. Eritrosit maturasyonunun tamamlanması esas görevidir. Ayrıca, diğer başka faktörlerle birlikte, megakaryositopoiezi uyarıcı ve trombosit sayısını artırıcı bir etkiye sahiptir (Demircan ve ark., 1994).

Kemik iliğindeki eritrosit öncül hücrelerinin farklılaşmasını destekleyen ve eritrositler için sitokin görevi gören glikoprotein yapıda bir büyüme faktörü olan EPO, eritroid serinin öncül hücrelerinden olgun eritrositlerin çoğalması, farklılaşması ve olgunlaşmasını sağlamaktadır. İnsan EPO proteini 165 aminoasitten oluşmakta ve 30 kDa molekül ağırlığına sahip olup %40 karbonhidrat içermektedir (Inoue ve ark., 1995).

Yetişkin bireylerde böbrekte üretilirken fetal dönemde karaciğerde üretilmektedir. Normal böbrek, oksijen teminine elverişli eritrositleri korumak için EPO üretimini gerçekleştirmektedir. Dolayısıyla böbrek yetmezliği, EPO üretiminin yetersizliğinden dolayı şiddetli anemi ile sonuçlanabilmektedir. Bu örnekte de görüldüğü üzere anemi hastalarında uzun süren EPO tedavisi uygulanması kaçınılmazdır. Ancak bu, EPO'nun sınırlı miktarlarından dolayı zordur (Inoue ve ark., 1995).

İlk olarak 1890'larda anemik hayvanların serumunda bulunan EPO, çoğu araştırmacılar tarafından 1950 yıllarından itibaren çeşitli kaynaklardan izole edilmeye çalışılmıştır. Sonunda Miyake ve Goldwaser aplastik anemi hastalarının idrarlarından yüksek aktivite gösteren EPO'yu saflaştırmışlardır. Bu yıllarda yapılan çalışmalarda, saflaştırılmış kaynaktan elde edilen EPO geninin yapısal ve karakteristik bilgileri bu genin klonlanması ile ivme kazanmıştır (Inoue ve ark., 1995).

EPO dializ ve predializ aşamasındaki hastaların kronik renal yetmezliğine sekonder anemilerin tedavisinde, kronik hastalık anemisinde, kemoterapiye bağlı kemik iliği supresyonunda ve AIDS’li hastaların zidovudine ile tedavileri sırasında gelişen anemilerin tedavisinde; eritrositler seriyi uyarmak amacı ile kullanılmaktadır (Demircan ve ark., 1994). Rekombinant DNA teknolojisi öncesinde EPO’nun idrardan izole edilmesi, hedef hücrelerin heterojenitesi ve az miktarlarda protein izole edilebilmesi gibi durumlardan dolayı teknik kısıtlamalar ve zorluklar taşımaktaydı. Özellikle böbrek yetmezliğine bağlı anemi görülen hastalara kan transfüzyonu ile eritropoetin sağlanması, hemoliz, kan ile enfeksiyon taşınması, hızlı uygulama gerektirmesi, uygulama sonrasında diyaliz gerektirmesi ve aşırı demir depolanması gibi dezavantajlara sahiptir ve hasta refahını da olumsuz etkilemektedir.

Trombopoetin (TPO), megakaryositopoezin ve kandaki trombosit seviyelerinin primer hümmoral düzenleyicisi olan hematopoetik bir faktördür (Hoffman ve ark., 1996). TPO, in vitro olarak megakaryositlerin büyüme ve olgunlaşmasını uyaran bir seri spesifik sitokin olmasının yanında in vivo da güçlü bir trombopoetik büyüme faktördür (Kuter ve ark., 2002). Öncül hücrelerden olan megakaryositlerin proliferasyon ve olgunlaşmasını etkileyen, bir seri spesifik sitokin olan trombopoetin; dolaşım sistemindeki mevcut trombosit seviyelerinin ana fizyolojik düzenleyicisi olduğuna inanılır.

Trombosit seviyelerinin ana fizyolojik düzenleyicisi olan TPO’nun hümmoral bir faktör olduğu 1958’de Keleman ve ark., tarafından belirtilmiştir (Lok ve ark., 1994). TPO glikoprotein yapısında olup başlıca promegakaryoblastlara ve olgunlaşma evrelerindeki mega-karyositlere etki ederek endomitozu, hücre büyüklüğünü ve sitoplazmik olgunlaşmayı artırır. Megakaryositlerden trombositlerin üretimini ve salınımını sağlar. Dolaşımdaki trombosit sayısı TPO üretiminin düzenleyicisidir (Demircan ve ark., 1994).

Yakın zamanlardaki çalışmalar, kemik iliğindeki megakaryositlerin boyutu ve sayısındaki artışa neden olan trombositlerin sayısını düzenleyen TPO’nun, trombositopenik hayvanların plazmasında bir aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Sayısız laboratuvar çalışmalarında çeşitli hücre hatlarındaki koşullu ortamlardan ve

trombositopenik plazmadan TPO'nun saflaştırılması ve karakterizasyonu denenmiştir (Lok ve ark., 1994). TPO'nun aktivitesi; ploidizasyon, trombosit spesifik proteinlerin ekspresyonu ve radyoaktif işaretli sülfür bileşiklerinin bileşimi ile ölçülen in vivo trombosit üretimin de içinde bulunduğu birkaç kriter ile analiz edilir. Ancak TPO'nun kesin tespiti, bazı ağır biyoanalizler ve başlangıç maddelerinin düşük spesifik aktivitesi ile engellenmiştir (Lok ve ark., 1994).

İnsan trombopoetini, kemoterapi, iritasyon ve kemik iliği transplantasyonu ile ilişkili trombositopenilerin iyileştirilmesi için potansiyel bir terapötik glikoproteindir. hTPO (human trombopoein) cDNA'sı koloni uyarıcı faktörler ve interlökinler gibi sitokinlerin neredeyse iki katı büyüklüğünde olan 332 aminoasitle proteini şifrelerler (Sung ve ark., 2004). Olgunlaşan protein iki bölge içerir. Bu bölgeler; eritropoetin ile homoloji gösteren ve ana biyolojik aktivitenin olduğu amino-terminal bölgesi ve 6 adet N-glikozillenme bölgesi içeren karboksi terminal bölgesidir (Sung ve ark., 2004).

TPO; EPO'dan hem etki şekli hem de molekül ağırlıklı olarak farklıdır. Hipoksi, eritropoezi stimule ettiği halde trombopoezi etkilemez ve hatta düşük PO₂ trombopoezi inhibe edebilir. Ancak deney hayvanlarında yüksek doz EPO uygulanmasının trombosit üretimini stimule edebileceği gösterilmiştir. Bu etki EPO ve TPO'in moleküler yapı olarak benzer özellikler taşımaları ve yüksek dozlardaki EPO'nun megakaryositler seri hücreleri üzerindeki TPO reseptörlerini uyarabilmeleri ile açıklanmaya çalışılmaktadır (Demircan ve ark., 1994).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma-Model
Agaroz jel elektroforez seti	Biorad
Elektroporator	Multiporator/Ependorf Eparotor
Mikrodalga fırın	Arçelik- MD500
PCR makinesi	Biorad- DNA Engine
Güç kaynağı (SDS ve agaroz jel elektroforezi için)	Biorad

Çizelge 3.1. (Devamı) Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma-Model
Termostatlı blok ısıtıcı	Biorad-Bio TDB-100
Spin cihazı	Biosan-Combi Spin FVL 2400N
Çalkalayıcı inkübatör	Biosan-ES 20
Mikro santrifüj	Hettich
-80 dondurucu	Hettich
Otoklav	HMC-Hirayama
UV/VIS Spektrofotometresi	Denovix DS-11 FX+
Etüv	Memmert
Ultra santrifüj	Vision-VS 30 000i
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Velp Scientifica ARE

Buzdolabı	Vestel-GTP 455A
Kar makinesi	Vision
Çalkalayıcı inkübatör	Zhicheng-ZHWY-111C
İnverted mikroskop	Olympus CKX41
CO2'li inkübatör	Esco
Laminar akışlı steril kabin	Esco Airstream
Sirkülatörlü su banyosu	Nüve
Soğutmalı santrifüj	Nüve

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler

Kimyasal Malzeme/Kit	Firma
Maya ekstrakt	Difco
Ampisilin	Sigma Aldrich
Metanol	Merck
PMSF	Sigma Aldrich
SDS	Serva
Tripton	BD BactoTM
Pepton	Merck
Tris	Sigma Aldrich
Orange G	Alfa Aesar
Etidyum bromür	ICN
dNTPs	Biobasic

Çizelge 3.2 (Devamı) Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler

Maya ekstraktı	LabM
NaCl	Carlo Erba
MgCl ₂	Riedel de Haën/ Qiagen
MgSO ₄ .7H ₂ O	Riedel de Haën
DTT	Applichem
Agar	BD Bacto™ Agar
YPD-agar	BD Bacto™ Agar
Gliserol	Euromedex
Tris/HCl	Amresco
SDS	Serva
EDTA	Amresco
Etanol	Merck
Metanol	Merck
Tris	Sigma
Ni-NTA Agaroz	Qiagen

Çizelge 3.2 (Devamı) Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler

Kimyasal Malzeme/Kit	Firma
İmidazol	Merck
DMSO	Merck
Diyaliz Membranı	Spectro/Por
Akrilamid	Amresco
APS	Biorad
TEMED	Biorad
HCl	Merck
B-merkaptolanol	Merck

Bromfenol Blue	Pancreac
Glisin	Merck
Coomassie Brilliant Blue	Ambresco
Glasiyel Asetik Asit	Merck
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biochrom
FBS (Fetal Bovine Serum)	Capricorn
DMSO (hücre kültürü için)	Origen Biomedical
PBS	Biochrom
Tripsin-EDTA	Biochrom
MTT	Alfa Aesar
Jelden DNA saflaştırma kiti	Geneaid
Plazmid DNA saflaştırma kiti	Geneaid
G418 disulfate salt	Sigma-aldrich

3.1.3. Kullanılan enzimler

Çalışmada kullanılan enzimler Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan enzimler

Enzim	Firma
Sac I	Takara
Blg II	Takara

3.1.4. Kullanılan çözeltiler

Tampon çözeltiler ve hazırlanışları

Tris-HCl tamponu (100 mM pH 8) (100 ml): 1,21 gr Tris yaklaşık 90 ml saf suda çözüldükten sonra pH HCl ile 8'e ayarlanarak toplam hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlanmış +4°C'de saklanmıştır.

Tris-HCl stok çözeltisi (1 M pH 7.4) (1 litre): 121.14 gr Tris 800 ml deiyonize suda çözülmüş konsantre HCl çözeltisi ile pH 7.0 olarak ayarlandıktan sonra toplam hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121°C’de 15 dakika otoklavlanmıştır. +4°C’de saklanmıştır.

%10 Gliserol stok çözeltisi (50 ml): 100 ml gliserol 900 ml deiyonize suda çözülerek 0.22 µm’lik steril filtreden geçirilmiştir. +4°C’de saklanmıştır.

10X Dekstroz çözeltisi: 200 ml D-glikozu 1000 ml su içinde çözülmüştür. Daha sonra 15 dakika otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 0.22 µm’lik steril filtreden geçirilmiş ve +4°C’de saklanmıştır.

Fosfat tamponu (100 mM pH 7.4) (1 litre): 7.8 gr NaH₂PO₄.2H₂O bir miktar saf su içerisinde çözüldükten sonra derişik HCl ile pH 7.4’e ayarlanarak son hacim 1 litreye tamamlanmıştır. +4°C’de saklanmıştır.

10X Elektroporasyon çözeltisi (pH 7.4) (25mM Tris, 10mM MgCl₂) (50ml): 0.15 gr Tris ve 0.1 gr MgCl₂ 50 ml deiyonize suda çözülmüştür. 5 ml’sine 45 ml deiyonize su eklenerek 1X kullanım konsantrasyonuna seyreltilmiştir. pH 7.4 olarak ayarlandıktan sonra 0.22 µl’lik steril filtreden geçirilerek steril edilmiştir. +4°C’de saklanmıştır.

DTT çözeltisi (50 mM) (50 ml): 0.386 gr DTT 50 ml deiyonize suda çözüldükten sonra 0.22 µl’lik steril filtreden geçirilerek steril edilmiştir. -20°C’de saklanmıştır.

Yıkama çözeltisi (10 mM DTT, YPD, 40 mM HEPES)(pH 8.0) (50 ml): Önceden hazırlanmış ve steril olan 10 ml 50 mM DTT, 20 ml 100 mM HEPES ve 20 ml YPD karıştırılarak steril şişede +4°C’de saklanmıştır.

MTT çözeltisi (5mg/ml): 5 mg MTT, 1 ml divalent katyonları içermeyen (Ca⁺² ve Mg⁺²) içermeyen fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde çözülmüştür. -20°C’de karanlıkta saklanmıştır.

PBS çözeltisi (1litre): 8.766 gr NaCl, 0.296 gr NaH₂PO₄ ve 2.9 gr Na₂HPO₄ karıştırılarak pH değeri 0.5 M NaOH ile 7.0 olarak ayarlanmıştır. +4°C’de karanlıkta saklanmıştır.

Sıvı ve katı besiyerleri

LB/LB Agar Besiyeri: 25 gr LB (Luria-Bertani) dehidre besiyeri 1 litre distile suda çözülmüştür. 2 adet stok şişesine 400'er ml olacak şekilde ve üzerine 6'şar gr agar ilave edilip otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Kalan LB çözeltisi yaklaşık 5 ml olacak şekilde deney tüplerine konulmuş ve ağız kısımları alüminyum folyo ile kapatılarak otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

YPD-agar Besiyeri: 10 gram yeast extract ve 20 gram pepton 900 ml distile su içinde çözülmüş ve otoklavlanmıştır. Otoklav işlemi tamamlandıktan sonra steril 100 ml 10X dekstroz eklenmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

Sodyum Dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi ve gümüş boyamada kullanılan çözeltiler

Ayırma jeli tamponu: 18,2 gr Tris (1,5 M) ve 0,4 gr SDS (%0,4 w/v) yaklaşık 90 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M HCl ile 8,8' ayarlanıp toplam hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme jeli tamponu (4xTris-HCl/SDS): 6,05 gr Tris (0,5 M) yaklaşık 90 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M HCl ile 6,8' ayarlanıp toplam hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlanmış. 0,4 gr SDS (%0,4 w/v) ilave edilerek +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Numune tamponu (2x): 25 ml 4x Tris-HCl/SDS (pH6,8), 20 ml gliserol (%20 w/v), 4 gr SDS (%4 w/v), 2 ml β-merkaptoetanol, 1 mg bromfenol mavisi ve 53 ml suyun karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Amonyum persülfat (APS) çözeltisi(%10w/v): 0,1 gr APS 1 ml saf suda çözüldü.

SDS-PAGE yürütme tamponu(5X): 15 gr Tris, 72 gr glisin ve 5 gr SDS yaklaşık 900 ml suda çözüldükten sonra toplam hacmi saf suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Jel boyama çözeltisi: 0,5 gr Coomassie brilliant blue 250 ml metanol, 50 ml glasiyel asetik asitte çözüldükten sonra toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Boya uzaklaştırma çözeltisi: 250 ml metanol ve 50 ml glasiyel asetik asit karıştırılarak toplam hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

Sabitleyici çözelti: 100 ml metanol , 24 ml asetik asit ve 100 µl formalin (%35'lik formaldehit çözeltisi) 67 ml distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Yıkama çözeltisi: 73 ml etanol ve 127 ml distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

Sodyum tiyosülfat çözeltisi (%0.02 Na₂S₂O₃): 0.04 gr sodyum tiyosülfat 200 ml distile suda çözülmüştür.

Gümüş nitrat çözeltisi(%0.2 AgNO₃, %0.076 formalin): 0.4 gr AgNO₃ 200 ml distile suda çözülür ve 152 µl formalin(%35'lik formaldehit çözeltisi) eklenmiştir.

Karbonat çözeltisi (%6 Na₂CO₃, %0.05 formalin, %0.0004 Na₂S₂O₃): 24 gr Na₂CO₃, 200 µl formalin (%35'lik formaldehit çözeltisi) ve 8 ml %0.02 Na₂S₂O₃ 392 ml distile suda çözülerek elde edilmiştir.

Durdurucu çözelti (%50 metanol, %12 asetik asit) : 100 ml metanol, 24 ml asetik asit ve 76 ml distile su karıştırılmıştır.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Etilendiamin tetra asetik asit (0,5 M pH 8 EDTA): 186,1 gr Na₂EDTA.2H₂O 700 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M NaOH ile 8,0'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Tris Asetat EDTA (50xTAE) tamponu: 242 gr Tris, 57,1 ml glasiyel asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) bir miktar suda çözüldükten sonra pH'sı glasiyel asetik asitle 8,5'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Örnek yükleme boyası (6x): 25 mg bromfenol mavisi ve 3 ml gliserol saf su ile iyice karıştırılarak toplam hacmi 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Protein saflaştırmada kullanılan çözeltiler

NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu (100 mM pH 7,6): 65 ml 0,2 M NaH₂PO₄ ve 0,2 M 435 ml Na₂HPO₄ karıştırıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme tamponu (100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH 7,6): 2,92 gr NaCl 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (100 mM pH 7,6) çözülmüştür.

Yıkama tamponu (25 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH 7,6): 0,85 gr imidazol, 2,92 gr NaCl 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (100 mM pH 7,6) çözülmüştür.

Elüsyon tamponu (300 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH 7,6): 10,21 g imidazol, 2,92 g NaCl 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponunda (100 mM pH 7,6) çözülmüştür.

Refolding (Yeniden Katlama) için kullanılan çözeltiler

Süspansiyon Tamponu: 50 mM Tris-HCl (pH:8.0), 1 mM DTT, 2 mM PMSF olacak şekilde saf suda çözülmüştür.

Resüspansiyon Tamponu: 50 mM Tris-HCl (pH:8.0), %2.5 triton X-100, %20 sükröz olacak şekilde saf suda çözülmüştür.

Çözme (Solubilizing) Tamponu: 50 mM Tris-HCl (pH:8.0) 8 M Üre pH:8.0 olacak şekilde saf suda çözülmüştür.

Yeniden Katlama (Refolding) Tamponu: 100 mM Tris-HCl, 10 mM DTT, %20 gliserol pH:8.0 olacak şekilde saf suda çözülmüştür.

Diyaliz Çözeltisi: 100 mM NaCl içeren 20 mM Tris HCl, pH:8.0 olacak şekilde saf suda çözülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. EPO ve TPO geninin optimizasyonu ve sentezi

EPO'ya ait sekans dizisinin elde edilmesi:

Rekombinant olarak üretimi amaçlanan ve GenBank: AGW15567.1 erişim numarasına sahip EPO genine ait nükleotit sekansına NCBI (The National Center for Biotechnology Information) veri tabanı kullanılarak ulaşılmıştır. İnsana ait EPO'a ait sekans dizisi 579 baz çifti büyüklüğünde ve 194 aminoasitlik bir proteinin ekspresyonundan sorumludur. Bu proteinin büyüklüğü ise 21.8 kilodaltondur.

EPO'nun kodon optimizasyonu:

İnsan EPO geninin *E.coli* K12 mikroorganizmasında yüksek verimde ekspresyonu için hedef genin ilk olarak belirlenen organizmaya göre optimizasyon işleminin yapılması gerekmektedir. Kodon optimizasyonu için Jcat (The Codon Adaptation Tool) veri tabanı kullanılmıştır. Bu veri tabanı bir proteine ait DNA sekansının prokaryotik/ökaryotik konukçu hücrelerde yüksek verimlilikte üretimi sağlayabilmek için uygun sekans dizisinin elde edilmesinde kolaylık sağlamaktadır.

Optimize edilmiş EPO dizisinin pET30a vektör sistemine göre optimizasyonu:

Kodon optimizasyonu gerçekleştirilen EPO geni pET30a vektör sistemine klonlanması hedeflenmiştir. Bunun için vektör sistemine ait çoklu klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon enzim kesim bölgelerinden uygun olan iki tanesi seçilmiştir. Bu restriksiyon enzimlerinin hedef geni iç bölgesinden kesmemesine dikkat edilmiştir.

Optimize edilmiş dizinin amino ucuna *NdeI*-6HIS-TOL-Tev ve kesim bölgesi *KpnI* eklenmiştir. Bu histidin etiketi hedef proteinin büyüme ortamından afinite kromatografisi ile saflaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Optimize edilmiş dizinin karboksil ucuna stop kodonu (TGA) eklenmiştir. Stop kodonunun ardından *KpnI* ve *BamHI* enzim kesim bölgeleri eklenmiştir.

Optimize edilmiş EPO dizisinin yapay olarak sentezi:

Optimize edilen dizinin yapay sentezi Biomatik firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Dizi *E.coli* pET30a ekspresyon sistemine *NdeI* ve *BamHI* enzimleri ile klonlanmış halde temin edilmiştir.

TPO'ya ait sekans dizisinin elde edilmesi:

Rekombinant olarak üretimi amaçlanan ve GenBank: AAB03393.1 erişim numarasına sahip TPO genine ait nükleotit sekansına NCBI (The National Center for Biotechnology

Information) veri tabanı kullanılarak ulaşılmıştır. İnsana ait TPO'a ait sekans dizisi 1059 baz çifti büyüklüğünde ve 353 aminoasitlik bir proteinin ekspresyonundan sorumludur. Bu proteinin büyüklüğü ise 37.9 kilodaltondur.

TPO'nun kodon optimizasyonu:

İnsan TPO geninin *Pichia pastoris* organizmasında yüksek verimde ekspresyonu için hedef genin ilk olarak belirlenen organizmaya göre optimizasyon işleminin yapılması gerekmektedir. Kodon optimizasyonu için farklı veri tabanları (Jcat-The Codon Adaptation Tool, vs) kullanılmıştır. Bu veri tabanları bir proteine ait DNA sekansının prokaryotik/ökaryotik konukçu hücrelerde yüksek verimlilikte üretimi sağlayabilmek için uygun sekans dizisinin elde edilmesinde kolaylık sağlamaktadır.

Optimize edilmiş TPO dizisinin pPIC3,5K vektör sistemine göre optimizasyonu:

Kodon optimizasyonu gerçekleştirilen TPO geni pPIC3,5K vektör sistemine klonlanması hedeflenmiştir. Bunun için vektör sistemine ait çoklu klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon enzim kesim bölgelerinden uygun olan iki tanesi seçilmiştir. Bu restriksiyon enzimlerinin hedef geni iç bölgesinden kesmemesine dikkat edilmiştir.

Optimize edilmiş dizinin amino ucuna BamHI-ApaI-PIR-SacII-6HIS-TEV ve kesim bölgesi eklenmiştir. Bu histidin etiketi hedef proteinin büyüme ortamından afinite kromatografisi ile saflaştırılmasına olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte, PIR dizisi; hedef proteinin doğal formunda büyüme ortamına salınabilmesi için gereklidir. Optimize edilmiş dizinin karboksil ucuna stop kodonu (TGA) eklenmiştir. Stop kodonunun ardından *MluI*, *EcoRI* ve *NotI* enzim kesim bölgeleri eklenmiştir.

Optimize edilmiş TPO dizisinin yapay olarak sentezi:

Optimize edilen dizinin yapay sentezi Biomatik firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Dizi *Pichia pastoris* pPIC3,5K ekspresyon sistemine BamHI ve NotI enzimleri ile klonlanmış halde temin edilmiştir.

3.2.2. HBF genlerinin uygun *E.coli* suşuna transforme edilmesi

Optimizasyon sonucu sipariş edilen genler Biomatik firmasından liyofilize halde gelmiştir. Liyofilize halde gelen genler 40 µl nuclease-free suda vortekslenerek iyice çözülmüştür. Ardından -20 °C ‘muhafaza edilmiştir. -20 °C ‘ye kaldırılan genlerin konsantrasyonu nanodropda 260 nm’de absorbans değeri okunarak 100 ng/µl olarak belirlenmiştir.

Not: Sipariş edilen genler istenilen vektör sistemi içinde gelmiştir. Vektör sistemleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Sipariş edilen genleri taşıyan vektör sistemlerinin adı

İstenilen Gen	Genin İstenildiği Vektör Sistemi
Eritropoetin (EPO)	pET30a
Trombopoetin (TPO)	pPİC3.5K

Nanodropta konsantrasyonları belirlenen plazmitler (EPO-pET30a/TPO-pPİC3.5K) çoğaltılmak amacıyla *E.coli* DH5a hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon işlemi aşağıda verilen protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir;

- ❖ -80 °C’den buz banyosu ile alınan kompetent hcrelerden 200 µL alınarak üzerine 1 µL plazmit (EPO-pET30a/TPO-pPİC3.5K) ilave edilmiş ve 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.
- ❖ Transformasyon karışımı 1 saatin ardından 2 dakika 42 °C’de ısı şokuna maruz bırakılmıştır.
- ❖ Ardından tekrar buz banyosuna alınarak 5 dakika bekletilmiştir.
- ❖ Transformasyon karışımının üzerine 300 µL LB (Luria Bertani) besiyeri eklenerek 37 °C’de 240 rpm’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ İnkübasyonun ardından her bir transformasyon karışımı seçici besi yeri içeren petriye sprader ile yayıldı ve 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

Not: EPO-pET30a plazmitinin kanamisin, TPO-pPİC3,5K plazmitinin ampisilin antibiyotiğine direnç geni bulunmaktadır.

3.2.3. Bakteriyel ekspresyon sisteminde EPO'nun üretimi

Biomatik firması tarafından *E.coli* pET30a ekspresyon sistemine NdeI ve BamHI enzimleri ile klonlanmış halde temin edildiği için deneysel çalışmalara, rekombinant konstrüktün ekspresyon hücrelerine transformasyonu ile başlanmıştır. Ekspresyon için uygun hücreler olan *E.coli* BL21 pLysE hücreleri transformasyon işlemi gerçekleştirilmeden önce kompetent hale getirilmiştir.

E.coli BL21 pLysE hücrelerinin kompetent hale getirilmesi:

- ❖ Bir gecelik sıvı *E.coli* kültürünün 1 ml'si 50 mL LB besiyerine inoküle edildi ve 37 °C'de OD₆₀₀(Optik Dansite): 0,5-0,7 olana kadar inkübe edilmiştir.
- ❖ İnkübasyon sonunda kültür steril bir falkon tüpüne konularak +4 °C'de 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. LB besi yerinde oluşan süpernatant kısmı atılmıştır.
- ❖ Pelet üzerine 50 mL soğuk FSB eklenip vortex kullanılarak süspansiyon edildi ve 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.
- ❖ 1 saatin ardından hücre süspansiyonu +4 °C'de 4000 rpm'de 5 dk daha santrifüjlenme işlemine tabi tutulmuştur.
- ❖ Santrifüjün ardından süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 8 mL soğuk FSB eklenip yavaşça süspansiyon edildi ve üzerine 560 µL DMSO (%100'lük) ilave edilip 3 saat buz banyosunda inkübasyona bırakılmıştır.

3 saatin ardından hücreler kompetent hale getirilen hücre süspansiyonu 600'er µL'lik küçük hacimler halinde soğutulmuş steril ependorf tüplerine konuldu ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Kompetent hale getirilen *E.coli* BL21 pLysE hücrelerine rekombinant konstrüktün transformasyonu

- ❖ Soğutulmuş steril ependorf tüpüne 200 µL bir önceki işlem basamağında hazırlanan kompetent hücre süspansiyonu konulmuştur.

- ❖ 200 µL kompetent hücre süspansiyonu üzerine 1 µL plazmid DNA (EPO-pET30a) eklendi ve 1 saat buzda bekletilmiştir.
- ❖ 1 saatin ardından 42 °C'lik su banyosunda ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra tekrar 5 dk buzda bekletilmiştir.
- ❖ Transformasyon karışımının üzerine 300 µL LB besi yeri eklendi ve 37 °C'de 240 rpm'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ LB agar seçici besi yerine (200 mL LB-agara 200 µL 50 mg/ml'lik kanamisin ve 34 mg/ml'lik kloramfenikol çözeltisi ilave edilerek petri kaplarına dökülerek LB agarın katılması beklendi.) ekim yapılarak 37 °C'de bir gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.

pET30a-EPO Proteininin üretilmesi (indüksiyonu)

- ❖ pET30a-EPO plazmit DNA'sı ile transforme olmuş ve koloni oluşumu gözlemlenen BL21 pLysE petrilerinden birer koloni alınarak; 4 µL 50 mg/ml kanamisin ve 4 µL 34 mg/ml kloramfenikol ihtiva eden 4 mL'lik steril LB tüplerine inoküle edildi ve 240 rpm 37 °C'de bir gece inkübe edilmiştir.
- ❖ Ertesi sabah steril 600 mL'lik erlenlerde üretime geçilmiştir. *E.coli* BL21 pLysE hücreleri ekilecek erlenlere 600 µL 50 mg/ml kanamisin ve 600 µL 34 mg/ml kloramfenikol eklenmiştir. Bir gün önce ekilen ve büyüme görülen tüplerdeki hücre kültürülerinden 1'er ml 600 ml'lik LB besiyeri içeren 2 L'lik erlenlere inoküle edilmiştir. 240 rpm 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ Her saat başı 600 nm'deki absorbanları okunarak yetiştirilmiştir. Erlenlerdeki kültürlerde OD:0,5-0,7 arasında bir değere ulaştığında, 1 M 600 µL IPTG (İzopropil β-D-1 tiyogalaktopiranozid) ile indüklenmiştir.
- ❖ IPTG ile 4 saatlik inkübasyonun ardından erlenler alınarak; 250 mL'lik santrifüj tüplerinde, +4 °C'de 8000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenme işlemi gerçekleştirilmiştir.
- ❖ Toplanan *E.coli* BL21 pLysE hücreleri -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

E.coli BL21 pLysE hücrelerinin parçalanması

- ❖ -20 °C’de muhafaza edilen indüklenmiş haldeki *E.coli* BL21 pLysE hücreleri buza gömüldü. Üzerine 100 mM Tris tamponundan (pH = 7,5) 50 mL eklenerek süspanse hale getirilmiştir.
- ❖ Süspansiyona 100 mM benzamidinden 100 µL eklendi ve vortekslendi. Üzerine 100 mM PMSF’den 100 µL eklendi ve buz üzerine alınmıştır.
- ❖ *E.coli* BL21 pLysE hücreleri buz banyosuna gömülü halde 3 mm ucu olan sonikatörle 7-8 tur yapılarak 1.5 saat parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- ❖ Parçalanmayan hücreleri ayırmak amacıyla +4 °C’de 6000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant ayrı bir tüpe alındı. Pelet üzerine 25 mL Tris tamponu eklenerek önceki işlemler tekrar edilmiştir.
- ❖ Bu şekilde tekrarlanan işlemlerin ardından parçalanmış hücreleri içeren süpernatantlar birleştirilmiştir.

Ultrasantrifüj ile proteinlerin ayrımı

Süpernatant 30 000 rpm’de ve +4 °C’de 1 saat santrifüjlenerek, karışımdaki hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürülmüştür.

Afinite kromatografisi ile EPO proteininin saflaştırılması

- ❖ Saflaştırma yapılacak olan polikarbonat kolan içerisine “Ni-NTA Agaroz Resin” reçineden (nikel bağlı dolgu maddesi) 500 µL konulduktan sonra, kolon 50 mL 100 mM Tris/HCL (pH:7,5) tamponuyla yıkanmıştır.
- ❖ Santrifüj sonrasında alınan protein karışımı kolona tatbik edildi ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanmıştır.
- ❖ Protein yüklenmiş kolon 50 mL 100 mM Tris/HCL (pH = 7,5) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş diğer proteinlerin ayrılması sağlanmıştır.
- ❖ Kolondan tutunmayan proteinleri iyi bir şekilde uzaklaştırabilmek adına 25 mL 10 mM imidazol içeren yıkama tamponu ile yıkanarak kolona tutunmuş diğer proteinlerin ayrılması sağlanmıştır.

- ❖ 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCL (pH = 7,5) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein 250 µL'lik fraksiyonlar halinde 20 mL ile elüe edildi ve bütün fraksiyonlar toplanarak +4 °C'de saklanmıştır.

SDS-PAGE ile EPO proteininin kalitatif analizi

Rekombinant EPO proteininin kantitatif olarak analiz edilmesi amacıyla SDS-PAGE işlemi %12'lik ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli kullanarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşenler	%4'lük	%12'lik
	Yükleme Jeli (ml)	Ayırma Jeli (ml)
Saf su	2.55	4
%40 akrilamid	0.35	2.7
Ayırma jeli tamponu	-	2.25
Yükleme jeli tamponu	1	-
%10 Amonyum persülfat (APS)	0.05	0.05
N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)	0.01	0.02

Toplanan her fraksiyondan ve yıkama sonrası elde edilen çözeltilerden alınan 100 µL'lik numuneler 100 µL jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100 °C'de 3 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS-PAGE (sodyumdodesülfat poliakrilamid jel elektroforezi) jelinin kuyucuklarına 10'ar µL yüklenmiştir.

SDS-PAGE tamamlandıktan sonra distile su ile yıkanan jel sonrasında Coomassie mavisi ile boyandı. Boyanan jelden boya destain solüsyonu ile uzaklaştırıldıktan sonra bir tarayıcı ile taranarak jel görüntüsü dijital ortama alınmıştır.

Rekombinant EPO proteini için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması

SDS-PAGE görüntüsüne göre EPO proteininin pelette olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçta elde edilmeye çalışılan proteinin inklüzyon cisimcikleri şeklinde çöktüğü anlaşılmıştır. Hücrelerin inklüzyon cisimciği oluşturmasını engellemek için *Rosetta Gami 2 (DE3)*

hücreleri kompetent hale getirilmiştir (Bkz: başlık 3.2.3) ve hazır hale getirilen kompetent hücrelere plazmit DNA'nın (pET30a-EPO) ısı şoku ile transformasyonu gerçekleştirilmiştir (Bkz: başlık 3.2.3.1). Sonrasında 2 farklı sıcaklıkta (37 °C ve 27 °C), 2 farklı IPTG konsantrasyonu (1 mM ve 0.1 mM) iki farklı besiyeri (M9 minimal besi yeri ve LB besiyeri) ve bu parametrelerin kombinasyonlarında Rosetta Gami 2 (DE3) hücreleri yetiştirilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. İnküzyon cisimciği oluşumunun azaltılması denemeleri

Besiyeri	Sıcaklık		IPTG konsantrasyonu
	37 °C	27°C	
Minimal Besiyeri (M9)	4 saat inkübasyon	12 saat inkübasyon	1 mM IPTG
Minimal Besiyeri (M9)	4 saat inkübasyon	12 saat inkübasyon	0.1 mM IPTG
LB Besiyeri	4 saat inkübasyon	8 saat inkübasyon	1 mM IPTG
LB Besiyeri	4 saat inkübasyon	8 saat inkübasyon	0.1 mM IPTG

Rekombinant EPO proteini için refolding (yeniden katlama)

İnküzyon cisimciğinin oluşumu ilgili başlık altında verilen deneysel çalışmalarla engellenemediğinden proteinin inküzyon cisimcikleri çözülerek yeniden katlanmasıyla elde edilmesine karar verilmiştir. Bu süreçte aşağıdaki protokol kullanılmıştır:

- ❖ Rosetta Gami 2 (DE3) hücrelerinde 37°C'de ve LB besiyerinde büyütülen hücreler OD:0.6 olduğunda 1 M IPTG ile indüklenmiş ve indüklemeden 6 saat sonra toplandı. Toplanan hücreler -20°C'ye kaldırılmıştır.
- ❖ -20°C'den alınan hücreler Tris-HCl tamponu (50 mM tris, 0.1 mM DTT, 2 mM PMSF pH:8.0) ile süspansiyon hale getirilmiştir. Süspansiyon hücrelere lizozim enzimi de eklenerek

90 dk sonikatörle parçalanmıştır. Parçalamanın sonrasında 12 000 rpm de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjle elde edilen pelet iki kez resüspanسیون buffer (50 mM tris-HCl (pH:8.0), %2.5 triton X-100, %20 sükröz) ile süspanse edilerek yıkanmış (5ml/g) ve pelet 12 000 rpm de 15 dk santrifüjle toplanmıştır.

- ❖ Yıkanan pelet 8 M üre içeren 50 mM Tris-HCl buffer (pH:8.0) ile (5ml/g) 5 saat nazikçe karıştırılarak çözülmüştür. Sonrasında 12 000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılmıştır. Elde edilen süpernatant üzerine damla damla soğuk refolding (yeniden katlama) buffer (100 mM tris-HCl, 10 mM DTT, %20 gliserol (pH:8.0)) final protein konsantrasyonu 0.2 mg/ml'den az olacak şekilde eklendi ve 16 saat 4°C'de nazikçe karıştırılmıştır. Sonrasında 12 000 rpm de 15 dk santrifüj yapıldı. Sonrasında süpernatant alınarak 100 mM NaCl içeren 20 mM Tris HCl (pH:8.0) diyaliz edilmiştir.
- ❖ Diyaliz ürünü yükleme tamponuyla (100 mM Tris/HCl (pH:7.5)) yıkanmış Ni-NTA agaroz içeren kolona tatbik edilmiştir. Kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplanmıştır. Protein yüklenmiş kolon 10 mM imidazol içeren 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş diğer proteinlerin ayrılması sağlanmıştır. Sonrasında 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein elüe edilmiştir. Toplanan her fraksiyondan alınan numuneler jel yükleme tamponuyla karıştırılmıştır, 100°C'de 2 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS PAGE jelinin kuyucuklarına yüklenmiştir. Sonrasında boyanan jel fazla boyası çıkarıldıktan sonra bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alınmıştır.

rEPO'nun biyoaktivasyon çalışmaları

pET30a-EPO vektör sisteminde gelen genimizin ekspresyonu gerçekleştirilmiş olup kantitatif analizi yapılmıştır. rEPO 'nun klinik ve AR-GE amaçlı çalışmalarda kullanılmak üzere biyoaktivasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Endotel hücreleri için DMEM besi ortamının hazırlanması:

İnsan göbek bağı endotel hücreleri (HUVEC -Human Umbilical Vein Endothelial Cells) rekombinant EPO proteininin endotel hücrelerinin canlılığına olan etkisinin araştırılması amacıyla DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi ortamında %5 CO₂ içeren

nemli 37° C'lik etüvde aseptik koşullar göz önünde bulundurularak geliştirilmişlerdir. Gerekli olan besi ortamının içeriği aşağıda belirtilmiştir.

DMEM besi ortamının içeriği:

- DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium)
- %1 L-glutamin
- %15 FBS (Fetal Bovine Serum)
- %0.1 gentamisin

Endotel hücrelerinin çözülmesi ve kültürü:

-80 °C'de muhafaza edilen cryo-tüp 3/4'ü çözününceye kadar 37°C su banyosunda bekletilmiştir. Dış kısmı alkolle silinerek steril edilen cryo-tüp laminar akışlı kabinde önceden 37°C'ye ısıtılmış yaklaşık 1 ml besi ortamı ilave edilmiştir ve cryo-tüp içeriği bir santrifüj tüpüne geçirilerek toplam hacim 10 ml'ye ulaşıncaya kadar besi ortamı ilave edilmiştir. 800 rpm de 5 dk 4°C de santrifüj edilen hücrelerden besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Böylece besi ortamı ile birlikte kriyoprotektan (DMSO) uzaklaştırılmıştır. Hücreler önceden hazırlanmış ve 37°C sıcaklığa ulaşmış olan antibiyotikli DMEM besi ortamı ile süspanse edildikten sonra yaklaşık 12 ml besi ortamı ile karıştırılarak %5 CO₂ içeren nemli 37° C'lik etüvde büyümeye bırakılmıştır. Yaklaşık 2 saat inkübasyonun ardından hücreleri kültür kabına tutunup tutunmadıklarını inverted mikroskop altında inceleyerek gözlenmiştir. 24-48 saat inkübasyon sürelerinde hücrelerin büyümeleri inverted mikroskop ile incelenmiştir.

Endotel hücrelerinin pasajlanması ve dondurulması:

Besi ortamındaki nutrientlerin tükenmesi hücre kültürünün üreme hızının düşmesine ya da hücrelerin ölümü ile sonuçlanabilmektedir. Bu sebepten dolayı inverted mikroskop altında çoğaldıkları yüzeyi %70-80 oranında kaplayan HUVEC kültürünün bir kısmı dondurularak saklanırken bir kısmının besi ortamının değiştirilmesi ile kültürüne devam edilmiştir.

- ❖ Pasajlama işlemi sırasında kullanılacak olan DMEM besi ortamı, PBS (Ca²⁺, Mg²⁺ içermeyen) ve Tripsin-EDTA sıcak su banyosunda bekletilerek 37 °C sıcaklığa ulaşmaları sağlanmıştır. Malzemeler ve inkübatördeki hücreleri içeren kültür kabı laminer flow kabine alınmadan önce %70'lik alkol ile steril hale getirilmiştir.
- ❖ Kültür kabındaki besi ortamı atık kabına yavaşça dökülerek uzaklaştırılmıştır.
- ❖ Kültür kabının yüzeyi PBS ile bir kez yıkanmıştır. Bunun için kültür kabının hücre bulunmayan yüzeyine doğru PBS ilave edilmiştir (5 ml/25 cm²) ve hücreler üzerinde PBS yavaşça dolaştırıldıktan sonra PBS atık kabına boşaltılarak uzaklaştırılmıştır.
- ❖ Hücrelerin kültür kabı yüzeyinden kalkmaları amacı ile 1 ml Tripsin-EDTA çözeltisi hücrelerin üzerine bırakılmıştır. Tripsin-EDTA çözeltisini ilave edildikten sonra 37°C'deki inkübatörde yaklaşık 2-3 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ Yüzeyden ayrılmayan hücreler için mekanik etki uygulanmıştır ve inverted mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları gözlemlenmiştir.
- ❖ Hücelere toksik etki gösteren Tripsin-EDTA çözeltisinin serumlu besi ortamı ile inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. 8-10 ml besi ortamı ilave edilmiştir ve pipet yardımıyla köpük oluşmamasına özen gösterilerek hücreler besi ortamında süspansiyon edilmiştir.
- ❖ Santrifüj işlemi öncesinde hücre sayımı için 100 µl hücre süspansiyonu 100 µl tripan mavisi ile pipet yardımıyla homojenize edilmiştir.

Hücre Sayımı:

Thoma lamı üzerine bırakılan bir miktar hücre süspansiyonunun 10X büyütme ile inverted mikroskopta sayımı gerçekleştirilmiştir. 4 büyük karede hücreler hemositometre ile sayılmıştır. Hemositometre ile sayım yapıldığında yaklaşık olarak bir karede 60 canlı hücre olduğu gözlemlendi ve toplam 4 karede 240 canlı hücre sayılmıştır.

Thoma lamında sayım sonucu toplam hücre miktarını hesaplayabilmek için kullanılan formül:

Ax10⁴xSF/ Toplam sayılan kare

A: Sayılan karelerdeki toplam hücre sayısı

10⁴: 0.1mm³ deki sayım sonucu 1ml'deki sayıya dönüştürmek için katsayı

SF: Seyreltme faktörü

Sonuç olarak hücre konsantrasyonu $240 \times 10.000 \times 2/4 = 12 \times 10^5$ h/ml olarak belirlenmiştir. 10 ml örnek olduğu için; 12×10^5 h/ml $\times 10$ ml = 12 milyon hücre hesaplandı. 12 milyon hücre olduğu için pasajlama oranı 1/4 olarak belirlenmiştir.

- ❖ Hücre süspansiyonunun yarısı pasajlama diğer yarısı dondurma için kullanılmıştır. Bu yüzden hücreler ikiye bölünerek iki ayrı steril santrifüj tüpünde 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan besi ortamı steril şartlarda uzaklaştırıldıktan sonra, kalan az miktar besi ortamı ile hücre pelleti homojenize edilmiştir. Süspansiyon haline getirilen hücreler üzerine 6 ml taze besi ortamı eklenmiştir.
- ❖ Pasajlama oranı 1/4 olduğu için 3'er ml hücre süspansiyonu 2 adet steril kültür kaplarına ilave edilmiştir. 9 ml taze besi ortamı ilavesi ile kültür hacmi 12 ml olarak tamamlanmıştır. Etiketlenen kültür kapları 37°C deki % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.
- ❖ Diğer santrifüj tüpündeki hücreler dondurularak saklanmıştır. Bunun için hücre pelleti elde edildikten sonra 0,4 ml DMSO ve 3,6 ml serum (SBS) karıştırılarak 4 ml dondurma ortamı hazırlanmıştır.
- ❖ Hücreler dondurma ortamı ile birleştirildikten sonra 4 cryo-tüp 1'er ml olacak şekilde hızlıca bölünmüştür. Hazırlanan cryo-tüp -80° C'de saklanmıştır.

Rekombinant EPO'nun endotel hücre büyümesine olan etkisi (MTT Testi):

Rekombinant EPO'nun HUVEC kültürünün canlılığı üzerine olan etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Bu deneyde spektrofotometrik analiz ile 100-0.0781 mg/ml ve 80-0.0781 mg/ml iki farklı başlangıç konsantrasyon aralığında rekombinant EPO'nun etkin konsantrasyonu değeri dilüsyon işlemi yapılarak araştırılmıştır. Negatif kontrol olarak EPO'nun içinde bulunmadığı DMEM besi ortamı kullanılmıştır. MTT testi şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- ❖ 100 µl hücre süspansiyonu ($\approx 4 \times 10^3$ hücre/kuyucuk) 96 gözlü steril hücre kültürü plakalarının belirlenen kuyucuklarına en az üç tekrarlı olacak şekilde pipetleme işlemi yapılarak hücreler eşit bir şekilde dağıtılmıştır.

- ❖ Hücreler 96 gözlü steril hücre kültürü platelerinde 37°C'deki % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir.
- ❖ 24 saat inkübasyonun ardından kuyucukların besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Besi ortamı (DMEM) ile 100-80 mg/ml konsantrasyonlarından seyretelen rekombinant EPO ve negatif kontrolün belirlenen konsantrasyonlardaki dilusyon örnekleri kuyucuklara belirlenen plate düzenine göre ilave edilmiştir. 24. saat sonra MTT testi sonuçlarını almak üzere hücreler 37°C'deki % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.
- ❖ İnkübasyon sonunda hücre kültürü platelerinin besi ortamı uzaklaştırılmıştır ve hücrelerin üzerine 0,5 mg/ml konsantrasyonda MTT içeren besi ortamı eklenir.
- ❖ Hücreler karanlıkta 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenip, 5 dakika boyunca hücreler karanlıkta bekletilmiştir. Böylece DMSO eklenmesi ile formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır.
- ❖ Mikroplaka okuyucu cihaz ile 570 nm dalga boyunda plakaların absorbans değerleri kaydedilmiştir.
- ❖ Elde edilen absorbans değerleri 'Graphpad' programı kullanılarak örneklerin en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı olarak tanımlanan EC50 değerleri ng/ml cinsinden hesaplanmıştır.

Çizelge 3.7. Rekombinant EPO ve negatif kontrolün uygulama konsantrasyonları

mg/ml	EPO	NK
100	0.7635	0.784286
80	0.923875	0.784286
50	0.910675	0.784286
40	0.931	0.784286
25	0.9819	0.784286
20	0.929425	0.784286
12,5	0.8559	0.784286
10	0.8781	0.784286
6.25	0.8859	0.784286
5	0.919075	0.784286
3.125	0.863975	0.784286
2.5	0.818425	0.784286
1.5625	0.9087	0.784286
1.25	0.90535	0.784286
0.78125	0.8105	0.784286
0.625	0.81315	0.784286
0.390625	0.78065	0.784286
0.3125	0.838025	0.784286
0.195313	0.8117	0.784286
0.15625	0.758575	0.784286
0.097656	0.74075	0.784286
0.078125	0.705025	0.784286

3.2.4. Maya ekspresyon sisteminde TPO'nun üretimi

E.coli DH5a hücrelerine pPIC3.5K-TPO plazmidini transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası oluşan koloniler ampisilin ihtiva eden 4 mL'lik sıvı LB besiyerine tek koloni olarak inoküle edilerek 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Rekombinant konstrukt, santrifüjle toplanan hücrelerden plazmid DNA saflaştırma kiti (Geneaid ® Presto™ Mini Plasmid Kit) kullanılarak aşağıdaki protokole göre saflaştırılmıştır. Protokol aşağıdaki gibidir:

- ❖ Hücre peleti 200 µl PD1 çözeltisi ile vortekslenerek süspanse hale getirilmiştir.
- ❖ Hücre parçalama çözeltisi olarak 200 µl PD2 eklendi, alt üst edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir.
- ❖ Nötralizasyon çözeltisi olarak 350 µl PD3 eklenmiştir ve birkaç defa alt-üst edilerek karıştırılmıştır.
- ❖ Santrifüj tüpleri maksimum hızda (15000 rpm) 5-6 dakika santrifüjlendi.

- ❖ Süpernatant pipet yardımıyla toplama tüpüne yerleştirilen mini kolona aktarılmıştır. 15000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır.
- ❖ 400 µl kolon yıkama çözeltisi (W1 Buffer) kolona verilmiştir ve 15000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır.
- ❖ 600 µl kolon yıkama çözeltisi (Wash Buffer) kolona verilmiştir ve 15000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek kolonun altında kalan kısım uzaklaştırılmıştır. 600 µl yıkama çözeltisi ile bu işlem tekrarlanmıştır.
- ❖ Kolon boş olarak 15000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenerek yıkama çözeltisi kolondan tamamen uzaklaştırılmıştır.
- ❖ Kolon steril santrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. 50 µl nükleaz içermeyen su kolona verilmiş ve 60 °C'de sıcaklığındaki su banyosunda 2 dakika inkübe edilmiştir.
- ❖ 15000 rpm'de 2 dakika santrifüjlenerek plazmid DNA'lar saf olarak elde edilmiştir.
- ❖ Plazmid DNA'lar PCR ile analizinde ve restriksiyon enzim analizinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

pPIC3.5K-TPO geninin ekspresyonu

pPIC3.5K-TPO vektörünün *Pichia pastoris* GS115 maya hücrelerinde ekprese edilmesi için vektörün öncelikle *Pichia pastoris* genomuna AOX1 lokusundan entegre olması gerekmektedir. Entegrasyon için pPIC3.5K-TPO konstrüktü *Sac I* restriksiyon enzimi ile kesilerek lineer hale getirilmiştir. Lineerize edilmiş vektör DNA'sı *Pichia pastoris* GS115 hücrelerine elektroporasyon ile transfer edilme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

pPIC3.5K-TPO vektörünün lineerizasyonu

pPIC3.5K-TPO vektörünün *Pichia pastoris* GS115 maya hücreleri genomuna entegre olabilmesi için *Sac I* veya *Bgl II* restriksiyon enzimleri ile lineer hale getirilmesi gerekmektedir. *Sac I* enzimi pPIC3.5K-TPO vektöründe başka bir kesim bölgesine sahip olmamasından dolayı lineerizasyon için bu enzim tercih edilmiştir.

Çizelge 3.8. pPIC3.5K-TPO vektörünün linelerizasyonu

Bileşen	Miktar
pPIC3.5K-TPO (110 ng/μL)	10 μL
10 X Tampon K (Takara)	2 μL
% 0.1 BSA (Takara)	2 μL
<i>Sac I</i> (Takara 1000 U)	1 μL
Distile Su	5 μL
Toplam	20 μL

Çizelge 3.8’da reaksiyon bileşenleri verilen restriksiyon kesim reaksiyonu toplam üç reaksiyon (60 μl) olacak şekilde 37°C’de 4 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyon ayrı santrifüj tüpünde olacak şekilde bileşenler eklendikten sonra mikrosantrifüj ile hızlıca döndürülerek 37°C’deki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Her saat başı tüpler mikrosantrifüj hızlıca döndürülerek reaksiyona devam edilmiştir. 3. saat sonunda daha verimli kesim için *Sac I* enziminden 1 μl daha eklenerek 1 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. 4. saat sonunda üç tüp içeriği tek bir tüpte birleştirilerek Jel Ekstraksiyon Kit (GENEAID Gel Extraction Kit) ile yukarıda belirtildiği şekilde saflaştırılmıştır.

pPIC3.5K-TPO vektörünün maya hücrelerine elektroporasyon ile transformasyonu

Elektrokompetent *Pichia pastoris* GS115 hücrelerinin hazırlanması:

Ön Kültür:

- -80°C’de stoklanmış halde bulunan *Pichia pastoris* GS115 hücrelerinden YPD-Agar (Yeast extract Peptone Dextrose) besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekim yapılmış ve 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
- 48 saat sonunda oluşan koloniler 4 ml YPD sıvı besiyeri içeren tüplere inoküle edildi. 30°C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında 1 gece inkübe edilmiştir.
- 25 μl gecelik kültür içerisinde 500 ml YPD besiyeri içeren erlene inoküle edildi. 30°C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelerin kompetent hale getirilmesi:

- Kültürün 600 nm'de absorpsiyon değeri 1.3-1.5 değerine ulaştığında hücreler steril falkon tüpünde +4 °C'de 5 dakika boyunca 1.500 g'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Pelet 500 mL buz soğukluğundaki steril su ile çözüldü. Daha sonra +4 °C'de 5 dakika boyunca 1.500 g'de santrifüj edilmiştir.
- Pelet 250 mL buz soğukluğundaki steril su ile çözüldü. Süspanse hale getirilen pelet +4 °C'de 5 dakika boyunca 1.500 g'de santrifüj edilmiştir.
- Pelet tekrardan 20 mL 1 M buz soğukluğundaki sorbitol ile çözüldü. Süspanse hale getirilen pelet +4 °C'de 5 dakika boyunca 1.500 g'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjün ardından pelet 1 mL 1 M buz soğukluğundaki sorbitol ile çözülmüştür.
- Hücreler elektroporasyon işlemi için kompetent hale getirilmiştir.

Elektroporasyon:

100 µl *Pichia pastoris* GS115 kompetent hücreler ile 20 µl lineer pPIC3.5K-TPO vektör DNA'sı steril santrifüj tüpü içerisinde pipet yardımıyla karıştırılmıştır. Karışım önceden buz içerisinde soğutulmuş steril elektroporasyon küvetine aktarılmıştır.

- 'Biorad Gen Pulser Xcell Eparator' cihazına yerleştirilen küvete 2.1 milisaniye 2000 V elektrik akımı uygulanmıştır.
- Elektroporasyon sonrasında hızlı bir şekilde hücreler üzerine soğuk 1M sorbitol içeren YPD besiyeri (Outgrowth medium) ilave edildi ve 30°C'de üç saat karıştırılmaksızın inkübe edilmiştir.
- Hücreler 0.5 mg/ml G418 antibiyotiği içeren YPD-Agar besiyerine yayma ekim yapıldıktan sonra 30°C'de koloni oluşumu gözleninceye kadar (10 gün) inkübasyona bırakılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kodon Optimizasyonu

NCBI (The National Center for Biotechnology Information) veri tabanı aracılığı ile ulaşılan insan EPO ve TPO genlerine ait DNA sekansları aşağıdaki gibidir:

EPO'nun DNA sekansı:

```
10      20      30      40      50      60
ATGGGCGTGC ACGAGTGCCC CGCCTGGCTG TGGCTGCTGC TGAGCCTGCT GAGCCTGCCC

70      80      90      100     110     120
CTGGGCCTGC CCGTGCTGGG CGCCCCCCC AGGCTGATCT GCGACAGCAG GGTGCTGGAG

130     140     150     160     170     180
AGGTACTTGC TGGAGGCCAA GGAGGCCGAG AACATCACCA CCGCCTGCGC CGAGCACTGC

190     200     210     220     230     240
AGCCTGAACG AGAACATCAC CGTGCCCGAC ACCAAGGTGA ACTTCTACGC CTGGAAGAGG

250     260     270     280     290     300
ATGGAGGTGG GCCAGCAGGC CGTGGAGGTG TGGCAGGGCC TGGCCCTGCT GAGCGAGGCC

310     320     330     340     350     360
GTGCTGAGGG GCCAGGCCCT GCTGGTGAAC AGCAGCCAGC CCTGGGAGCC CCTGCAGCTG

370     380     390     400     410     420
CACGTGGACA AGGCCGTGAG CGGCCTGAGG AGCCTGACCA CCCTGCTGAG GGCCTGGGC

430     440     450     460     470     480
GCCCAGAAGG AGGCCATCAG CCCCCCGAC GCCGCCAGCG CCGCCCCCT GAGGACCATC

490     500     510     520     530     540
ACCGCCGACA CCTTCAGGAA GCTGTTCAAG GTGTACAGCA ACTTCCTGAG GGGCAAGCTG

550     560     570
AAGCTGTACA CCGGCAGAGC CTGCAGGACC GCGACAGG
```

Yukarıda görülen insan EPO genine ait DNA sekansı 579 baz çifti büyüklüğünde olup 194 aminoasit büyüklüğünde bir proteine aittir. Bu hematopoetik büyüme faktörüne ait aminoasit dizisi aşağıdaki gibidir:

İnsan EPO'a ait aminoasit sekansı:

MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNEN
ITVPDTKVNIFYAWKRMEVGGQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVS
GLRSLTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKL
KLYTGEACRTGDR

İnsan EPO'a ait sekansın E.coli K12 bakteriyel sistemine göre optimize edilmiş hali:

10 20 30 40 50 60
ATGGGAGTTC ACGAATGTCC CGCGTGGTTG TGGCTGCTTT TAAGTTTATT ATCTTTGCCT
70 80 90 100 110 120
TTAGGCTTAC CCGTCCTTGG AGCCCTCCA CGTCTGATCT GCGACTCACG TGTATTGGAA
130 140 150 160 170 180
CGCTACCTGC TGAAGCAAA AGAGGCGGAG AATATCACGA CGGGATGCGC CGAGCATTGC
190 200 210 220 230 240
TCTTTGAATG AGAACATTAC TGTCCAGAT ACTAAAGTGA ACTTTTACGC TTGGAAGCGT
250 260 270 280 290 300
ATGGAGGTTG GTCAGCAAGC TGTGGAGGTC TGGCAGGGTT TAGCCTTGTT GTCGGAAGCG
310 320 330 340 350 360
GTGTTACGCG GGCAGGCGTT ACTTGTTAAT TCGAGCCAAC CTTGGGAGCC TTTGCAACTG
370 380 390 400 410 420
CATGTTGACA AAGCGGTCTC CGGGCTGCGC TCCTTGACCA CTTTGTACG TGCCTTGGC
430 440 450 460 470 480
GCACAAAAGG AGGCCATCTC ACCGCCCGAT GCCGCGTCAG CTGCTCCATT ACGCACTATC
490 500 510 520 530 540
ACCGCAGACA CATTCCGTAA GCTTTTCCGT GTTTACAGTA ATTTCTTACG TGGCAAGCTG
550 560 570
AAACTTTACA CTGGCGAGGC CTGCCGTACC GGCGATAGG

İnsan EPO'a ait sekans ve E.coli K12 bakteriyel sistemine göre optimize edilmiş DNA sekansı karşılaştırıldığında beklenildiği üzere iki sekansa ait aminoasit dizisinin aynı olduğu görülmektedir.

TPO'nun DNA sekansı:

10 20 30 40 50 60
ATGGAGCTGA CTGAATTGCT CCTCGTGGTC ATGCTTCTCC CAACTGCAAG GCTAACGCTG

70 80 90 100 110 120
TCCAGCCCGG CTCCTCCTGC TTGTGACCTC CGAGTCCTCA GTAAACTGCT TCGTGACTCC

130 140 150 160 170 180
CATGTCCTTC ACAGCAAACCT GAGCCAGTGC CCAGAGGTTC ACCCTTTGCC TACACCTGTC

190 200 210 220 230 240
CTGCTGCCTG CTGTGGACTT TAGCTTGGGA GAATGGAAAA CCCAGATGGA GGAGACCAAG

250 260 270 280 290 300
GCACAGGACA TTCTGGGAGC AGTGACCCTT CTGCTGGAGG GAGTGATGGC AGCACGGGGA

310 320 330 340 350 360
CAACTGGGAC CCACTGCGCT CTCATCCCTC CTGGGGCAGC TTTCTGAACA GGTCCGTCTC

370 380 390 400 410 420
CTCCTTGGGG CCCTGCAGAG CCTCCTTGGG ACCCAGCTTC CTCACAGGG CAGGACCACA

430 440 450 460 470 480
GCTCACAAGG ATCCCAATGC CATCTTCCTG AGCTTCCAAC ACCTGCTCCG AGGAAAGGTG

490 500 510 520 530 540
CGTTTCCTGA TGCTTGTAGG AGGGTCCACC CTCTGCGTCA GCGGGGCCCC ACCCACCACA

550 560 570 580 590 600
GCTGTCCCA GCAGAACCTC TCTAGTCCTC AACTGAAACG AGCTCCAAA CAGGACTTCT

610 620 630 640 650 660
GGATTGTTGG AGACAAACTT CACTGCCTCA GCCAGAACA CTGGCTCTGG GCTTCTGAAG

670 680 690 700 710 720
TGGCAGCAGG GATTCAGAGC CAAGATTCCT GGTCTGCTGA ACCAAACCTC CAGGTCCCTG

730 740 750 760 770 780
GACCAAATCC CCGGATACCT GAACAGGATA CACGAACTCT TGAATGGAAC TCGTGGACTC

790 800 810 820 830 840
TTTCTTGGAC CCTCACGCAG GACCCTAGGA GCCCCGACA TTTCTCAGA AACATCAGAC

850 860 870 880 890 900
ACAGGCTCCC TGCCACCCAA CCTCCAGCCT GGATATTCTC CTCCCAAC CCATCCTCCT

910 920 930 940 950 960
ACTGGACAGT ATACGCTCTT CCCTCTTCCA CCCACCTTGC CCACCCTGT GGTCCAGCTC

970 980 990 1000 1010 1020
CACCCCTGC TTCCTGACCC TTCTGCTCCA ACGCCACCC CTACCAGCCC TCTTCTAAAC

TPO ' nun DNA sekansı devamı

1030 1040 1050 1060
ACATCCTACA CCCACTGCCA GAATCTGTCT CAGGAAGGGT AA

Yukarıda görülen insan TPO genine ait DNA sekansı 1059 baz çifti büyüklüğünde olup 353 aminoasit büyüklüğünde bir proteine aittir. Bu hematopoetik büyüme faktörüne ait aminoasit dizisi aşağıdaki gibidir:

İnsan TPO'a ait aminoasit sekansı:

MELTELLLVMMLPTARLTLSSPAPPACDLRVLSKLLRDSHVLHSLKLSQCPEVHPLPTPVLLPAV
DFSLGEWKTQMEETKAQDILGAVTLLEGVMAARGQLGPTCLSSLLGQLSEQVRLLLGALQSSL
GTQLPPQGRRTAHKDPNAIFLSFQHLLRGKVRFLMLVGGSTLCVRRAPPTTAVPSRTSLVLTNE
LPNRTSGLLETNFTASARTTGSGLLKWQQGFRAKIPGLLNQTSRSLDQIPGYLNRIHELLNGTRGL
FPGPSRRTLGAAPDISSETSDTGLPPLNQPSPSPHPPTGQYTLFPLPPTLPTPVVQLHPLLPDPS
APTPTPTSPLLNTSYTHCQNLSEQEG

İnsan TPO'a ait sekansın Pichia pastoris maya sistemine göre optimize edilmiş hali:

10 20 30 40 50 60
ATGGAAGCTGA CAGAAGCTGT ACTGGTGGTA ATGCTGCTTC CGACGGCTCG TTTAACCCCTT
70 80 90 100 110 120
TCAAGTCCGG CGCCCCCTGC ATGTGACCTT CGCGTCCTGA GTAAGCTTTT GCGTGATAGC
130 140 150 160 170 180
CATGTCCTTC ATTCCAAGCT TTCGCAATGC CCAGAGGTGC ATCCCCCTCC GACCCCGGTG
190 200 210 220 230 240
TTACTTCCTG CGGTAGACTT CTCACTGGGT GAATGGAAAA CCCAGATGGA GGAGACCAAA
250 260 270 280 290 300
GCCCAGGACA TTTTAGGAGC CGTCACTCTG TTGTTGGAGG GGGTCATGGC GGCTCGCGGT
310 320 330 340 350 360
CAATTGGGCC CGACGTGCTT AAGCAGCCTT TTAGGTCAAT TGTCCGAGCA AGTGCGTTTA
370 380 390 400 410 420
CTGCTGGGAG CGTTGCAGAG TTTATTAGGG ACACAATTAC CCCACAAGG TCGTACCACC
430 440 450 460 470 480
GCGCATAAGG ACCCAAACGC TATCTTTCTT AGTTTCCAGC ATTTATTACG TGGCAAAGTA

İnsan TPO ' a ait sekansın Pichia pastoris maya sistemine göre optimize edilmiş hali(devamı)

490 500 510 520 530 540
CGTTTTTGA TGCTTGTCGG CGGCAGCACC TTGTGCGTGC GTCGCGCACC ACCCACGACG

550 560 570 580 590 600
GCAGTCCCGT CACGCACCTC TCTGGTCTTA ACACTGAACG AATTACCCAA TCGCACAAGC

610 620 630 640 650 660
GGTCTTCTTG AGACGAATTT CACGGCTAGT GCTCGTACTA CCGGCAGCGG GCTGCTTAAG

670 680 690 700 710 720
TGGCAACAAG GGTTTCGCGC AAAGATTCTT GGGCTGCTTA ACCAGACATC TCGCAGCTTG

730 740 750 760 770 780
GACCAGATTC CCGGTTATTT AAACCGCATT CACGAATTGC TGAACGGAAC CCGCGGGCTG

790 800 810 820 830 840
TTTCCAGGGC CAAGTCGTCG TACGCTGGGC GCCCAGATA TTTCGTCAGA AACTTCAGAT

850 860 870 880 890 900
ACAGGCTCTC TGCTCCAAA CTTGCAACCA GGATACTCAC CGAGTCCCAC TCACCCTCTT

910 920 930 940 950 960
ACCGGCCAGT ACACATTATT TCCGCTGCC CCGACTTTGC CCACCCCGT AGTACAGCTG

970 980 990 1000 1010 1020
CATCCTTTGT TGCCAGACCC TTCCGCACCT ACACCCACGC CCACATCTCC CCTTTTAAAC

1030 1040 1050 1060
AACCTCGTACA CCCATTGCCA GAACCTTCTT CAAGAGGGAT AA

İnsan TPO'a ait sekans ve *Pichia pastoris* maya sistemine göre optimize edilmiş DNA sekansı karşılaştırıldığında beklenildiği üzere iki sekansa ait aminoasit dizisinin aynı olduğu görülmektedir.

4.2. Vektör Optimizasyonu

Optimize edilmiş insan EPO'a ait sekansın pET30a vektör sistemine klonlanması:

E.coli 'e göre optimizasyonu yapılan dizinin pET30a vektör sistemine klonlanması için uygun restriksiyon enzim kesim bölgeleri (NdeI-BamHI) dizinin her iki ucuna teorik olarak eklenmiştir. Yapay olarak sentezlenecek olan bu dizi sonraki bilimsel çalışmalarda kullanılacak olan diğer vektör sistemlerine klonlama işleminin gerçekleşebilmesi için

farklı restriksiyon kesim bölgeleride eklenmiştir. Dizinin amino ucuna eklenen 6 adet Histidin aminoasitine ait dizi, ekspresyon sonrasında proteinin afinite kromotografi ile saflaştırılması amacıyla eklenmiştir. Sonuç olarak yapay olarak sentezlenecek aşağıdaki dizi ile hem bakteri hem de maya sistemlerinde klonlamanın gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Optimize edilmiş insan TPO'a ait sekansın pPIC3.5K vektör sistemine klonlanması:

Pichia pastoris'e göre optimizasyonu yapılan dizinin pPIC3.5K vektör sistemine klonlanması için uygun restriksiyon enzim kesim bölgeleri (BamHI-NotI) dizinin her iki ucuna teorik olarak eklenmiştir. Yapay olarak sentezlenecek olan bu dizi sonraki bilimsel çalışmalarda kullanılacak olan diğer vektör sistemlerine klonlama işleminin gerçekleştirilmesi için farklı restriksiyon kesim bölgeleride eklenmiştir. Dizinin amino ucuna eklenen 6 adet Histidin aminoasitine ait dizi, ekspresyon sonrasında proteinin afinite kromotografi ile saflaştırılması amacıyla eklenmiştir. Sonuç olarak yapay olarak sentezlenecek aşağıdaki dizi ile hem bakteri hem de maya sistemlerinde klonlamanın gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

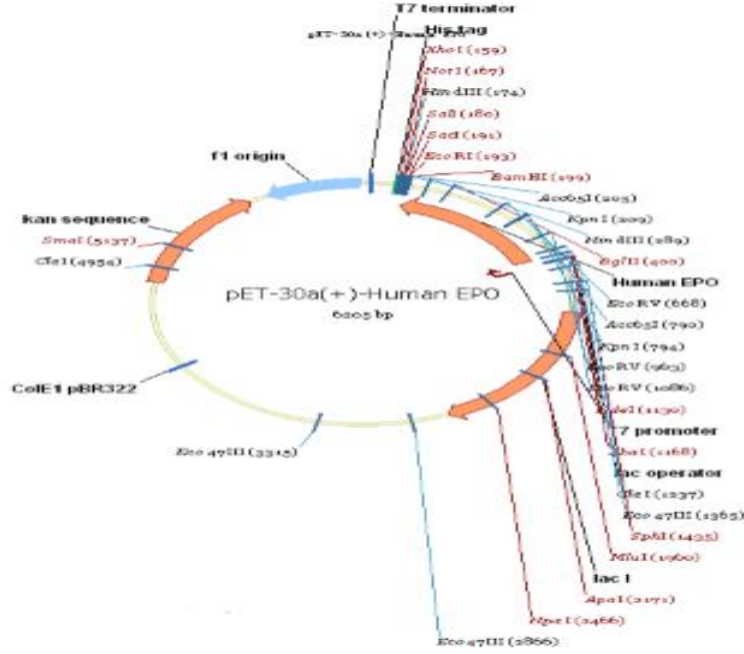
4.3. Yapay Gen Sentezi

Yapay olarak sentezlenmiş EPO'nun DNA dizisi:

EPO: NdeI-6HIS-TOL-Tev Kesim Bölgesi- KpnI-GEN-STOP-KpnI-BamHI

CATATGCACCACCACCACCACCACAACAATGGCGCATCAGGGGCCGATATCAATAACTATGCCGGGCAGATTAAATCTGCTATCGAAAGTAAGTTCTATGACGCATCGTCCTATGCAGGCAAAACCTCTACGCTGCGCATAAACTGGCACCAGATGGTATGTTACTGGATATCAAACCTGAAGGTGGCGATCCCGCACTTTCTCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTAAACTTGCAGAGATCCCGAAACCACCAAGCCAGGCAGTATATGAAGTGTTCAAAAACGCGCCATTGGACTTCAAACCGGTGGGGGATCTGAAAATTTATATTTCCAAGGTTCTGGTACC GGAGTTCACGAATGTCCCGCCTGGTTATGGCTGCTTTTGAGTTTGTGAGTCTACCCTTGGGTCTACCTGTTCTAGGCGTCCACCTAGATTAATATGCGACTCTAGGGTACTTGAGAGATATCTACTAGAAGCTAAGGAAGCCGAAAACATTACGACAGGTTGTGCAGAGCATTGTTCTCTGAACGAAAACATAACGGTGCCAGACACCAAGGC AACTTCTACGCTTGGAAGAGGATGGAGGTGGGCCAACAGCCGTTGAAGTGTGGCAGGGATTAGCCCTTT TAAGTGAGGCTGTCTTGAGAGGCCAGGCTCTTCTTGTAATTTCTTACAACCTTGGGAGCCCTTACGTT GCATGTGGATAAAGCTGTGAGTGGTCTAAGATCTCTTACCACGCTGCTACGTGCACTAGGTGCCAGAAAG GAGGCCATATACCCCTGACGCAGCAAGTGCCGCACCTCTTTCGTACAATCACTGCCGACACATTCAGGA AGCTTTTCAGGGTTTATTCCAATTTCTTAGAGGCAAGTTAAAGCTATATACTGGAGAAGCCTGTAGGAC TGGAGACAGTGAAGGTACCGATCC

Yapay olarak sentezlenmesi istenilen DNA sekansı NdeI ve BamHI enzimleri ile pET30a vektör sistemine klonlanmış halde ticari olarak satın alınmıştır (Şekil 4.1).



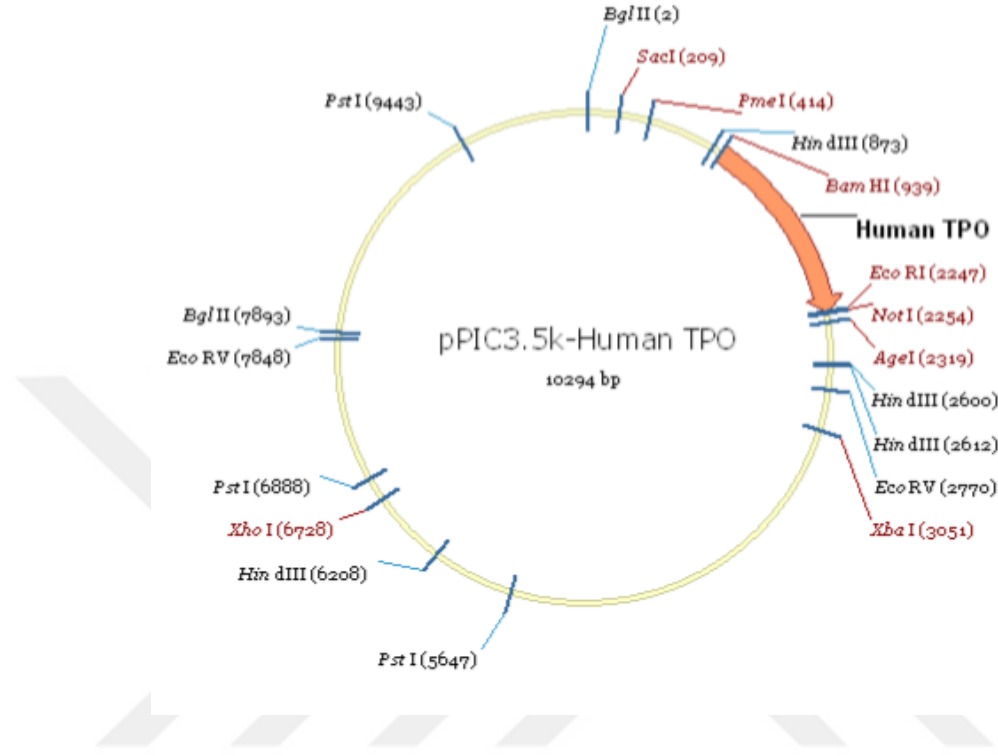
Şekil 4.1. pET30a-EPO konstrüktü

Yapay olarak sentezlenmiş TPO'nun DNA dizisi:

TPO: BAMHI-ApaI-PIR-SacII-6HIS-TEV-MluI-GEN-STOP-MluI-EcoRI-NOTI

GGATCCGGGCCCATGTACAGGAACCTTAATAATTGCTACTGCCCTTACTTGCGGTGCATACAGTGCCTACG
TGCCTTCCGAACCATGGAGCACACTGACACCTGATGCTAGCCTTGAAAGTGCCCTCAAAGATTACTCACA
AACTTTTGAATAGCTATTAAGTCCTTAGATGCCGACAAGATTAAGAGA CCGCGGCACCATCACCATCAC
CATGAAAATTTATATTTCCAAGGTTCT ACGCGT GAGCTTACGGAGTTACTTTTGGTGGTTATGCTACTA
CTAACAGCACGTTTAAACGCTGTCCAGTCCCGCCCCTCCCGCTTGTGATTTGAGGGTATTGTCTAAACTTC
TGCGTGACTCTCATGTCTTGCCTCCAGACTTTCCCAATGCCCCGAGGTCCACCCTTTACCCACGCCAGT
TTTGTGGCCCGCGTCGATTTTCAGTTTAGGTGAATGGAAGACGAAATGGAGGAAACCAAGGCTCAGGAT
ATATTGGGTGCCGTGACCTTACTACTGGAAGGCGTAATGGCAGCCAGAGGTCAGCTGGGTCCCACATGTT
TGTCATCTCTACTTGGACAGTTGAGTGGACAGGTAAGATTACTGTTGGGAGCATTACAATCACTGCTAGG
TACTCAACTACCACCTCAGGGCCGTACCACTGCACACAAGGACCCCAACGCTATTTTCTTTTCAATTC
CACCTTCTTAGAGGTAAAGTCCGTTTTCTGATGCTAGTCGGAGGATCAACTCTGTGTGTGAGAAGAGCAC
CTCCACTACGGCTGTGCCCTCCCGTACTAGTTTGGTGTGACCCTTAATGAAGTGCCTAACCGTACGTC
AGGCCCTTCTTGAGACGAATTTACCCGCATCAGCACGTAAGTACGGGTAGTGGCTTATTAAATGGCAACAG
GGATTCAGAGCTAAGATCCCGGCCCTATTGAATCAGACATCTAGGTCAGTACTAGATCAGATTCCAGGTTATC
TTAACAGGATACACGAGCTTCTAAACGGAACGAGAGGCCTATTTCCAGGCCCCAGTAGGCGTACACTAGG
AGCACCCGACATTTCCAGTGGTACATCTGACACAGGTTCCCTTCCACCCAATTTGCAGCCTGGCTATAGT
CCTTACCAACACATCCACCTACAGGCCAATACACTCTGTTTCCACTGCCACCAACTTTGCCAACTCCTG
TAGTCCAGTTGCATCCATTGCTTCCCGACCCATCTGCACCAACTCCACCCACCAGTCCACTATTAA
CACATCTACCCATTACAGAATCTTTCTCAAGAAGGC TGAACGCGTGAATTC GCGGCCGC

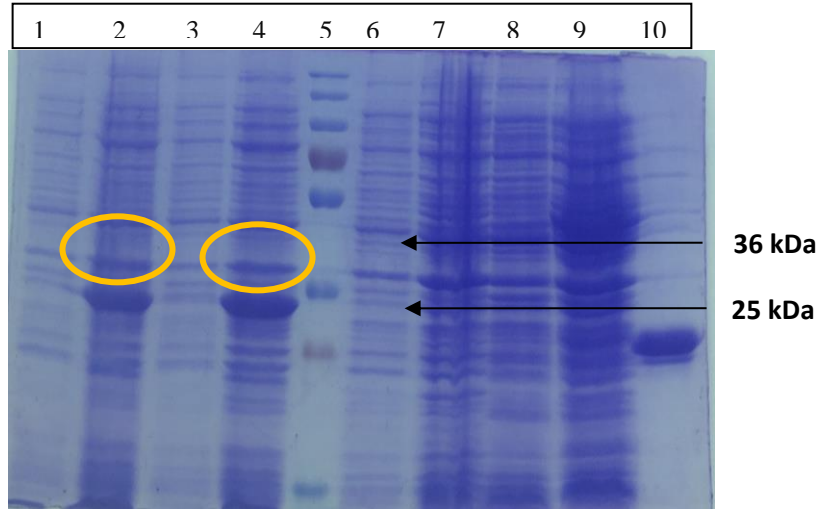
Yapay olarak sentezlenmesi istenilen DNA sekansı BamHI ve NotI enzimleri ile pPIC3.5K vektör sistemine klonlanmış halde ticari olarak satın alınmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. pPIC3.5K-TPO konstrüktü

4.4. Bakteriyel Ekspresyon Sisteminde EPO Proteinin Üretimi

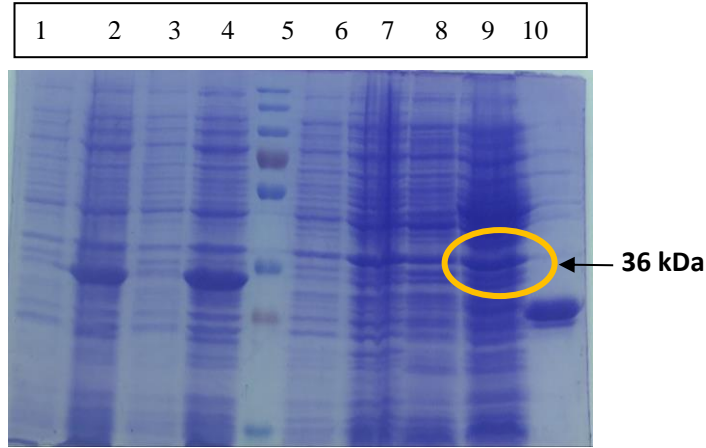
Başlık 3.2.3.1’de belirtildiği gibi transformasyon yapıp ekilen petrilere birer koloni alınarak 4 ml’lik LB ve antibiyotik içeren tüplere inoküle edilerek 37⁰C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Bu kültürler 600 ml’lik LB ve antibiyotik içeren besiyerlerine transfer edilerek 37⁰C’de 240 rpm’de çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. OD:0,5-0,7 arasında yaklaşık bir değere ulaştığında IPTG ile indükleme işlemi yapılmıştır. İndüksiyon sonrasında yaklaşık 4 saat kadar daha inkübe edilen hücrelerden alınan numuneler SDS PAGE’de analiz edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. %12'lik SDS-PAGE jel görüntüsü, 1,3. kuyucuklar indüklenmeden önce pET30a-EPO plazmitini içeren *E.coli* BL21 PlySE hücreleri 2 ve 4. kuyucuklar indüklendikten sonra pET30a-EPO plazmitini içeren *E.coli* BL21 PlySE hücreleri 5. kuyucuk Marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder)

4.4.1. EPO proteininin afinite kromatografisiyle saflaştırılması

İndüklemenin sonrasında -20°C 'de saklanan hücreler çıkarılarak buz üzerinde sonikatörle parçalanmıştır. Sonrasında 30 000 rpm ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat santrifüjlenerak karışımdaki hidrofobik proteinlerle hidrofobik hücre materyalleri çöktürülmüştür. Elde edilen süpernatant ve peletten farklı miktarlarda örnek alınmıştır. Peletten alınan örnekler hem SDS örnek yükleme tamponuyla hem de resüspansiyon buffer ile çözülerek jele yüklenmiştir. Bu aşamada peletin etkin bir şekilde çözülmesi sağlanarak protein varlığının doğru bir şekilde analizinin yapılması amaçlanmıştır. Süpernatant kısım afinite kromatografisiyle saflaştırılma işlemine tabi tutulmuştur. Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Ni-NTA agaroz rezin ve kolondan elüsyon için imidazol içeren elüsyon tamponu kullanılmıştır. Elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. SDS-PAGE görüntüsüne göre EPO proteininin pelette olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak; elde edilmeye çalışılan proteinin inklüzyon cisimcikleri şeklinde çöktüğü anlaşılmıştır (Şekil 4.4).



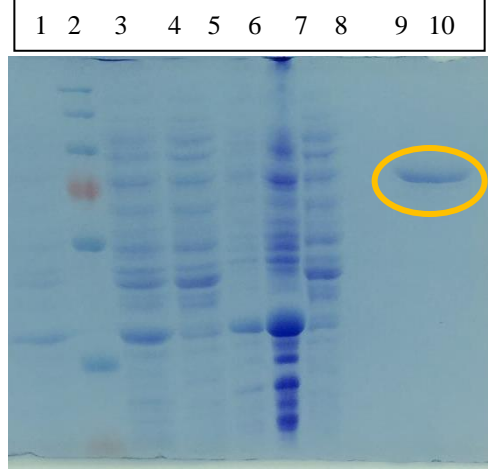
Şekil 4.4. rEPO SDS-PAGE jel görüntüsü, 9 5. kuyucuk Marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), 9. kuyucuk santrifüj sonrası elde edilen pelet örneği

4.4.2. EPO proteini için inklüzyon cisimciği oluşumunun azaltılması

Hücrenin inklüzyon cisimciği oluşturmasını engellemek için Rosetta Gami 2 (DE3) hücreleri kompetent hale getirilmiş ve pET30a-EPO plazmiti *Rosetta Gami 2 (DE3)* hücrelerine ısı şoku ile transfer edilmiştir. Sonrasında iki farklı sıcaklık (37 °C ve 27°C), iki farklı IPTG konsantrasyonu (1 mM ve 0.1 mM), İki farklı besiyeri (M9 minimal besiyeri ve LB besiyeri) ve bu parametrelerin kombinasyonlarında *Rosetta Gami 2 (DE3)* hücreleri yetiştirilmiştir. Sonuçta bazı kombinasyonlarda protein üretimi gerçekleşmemiş (minimal besiyeri ve 27°C), bazı kombinasyonlarda (LB besiyeri ve 37°C, 27°C) proteinin çözünür formu elde edilememiştir.

4.4.3. EPO proteini saflaştırılması

Rosetta Gami 2 (DE3) hücrelerinde 37°C'de ve LB besiyerinde büyütülen hücreler OD:0.6 olduğunda 1 M IPTG ile indüklenmiş ve indüklemeden 6 saat sonra toplanmıştır. Toplanan hücreler sonikatörle parçalanmıştır. Santrifüj sonrası toplanan pelette refolding (yeniden katlama) prosedürü uygulanmış ve afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Elde edilen numuneler SDS-PAGE'de analiz edilmiştir (Şekil 4.5).

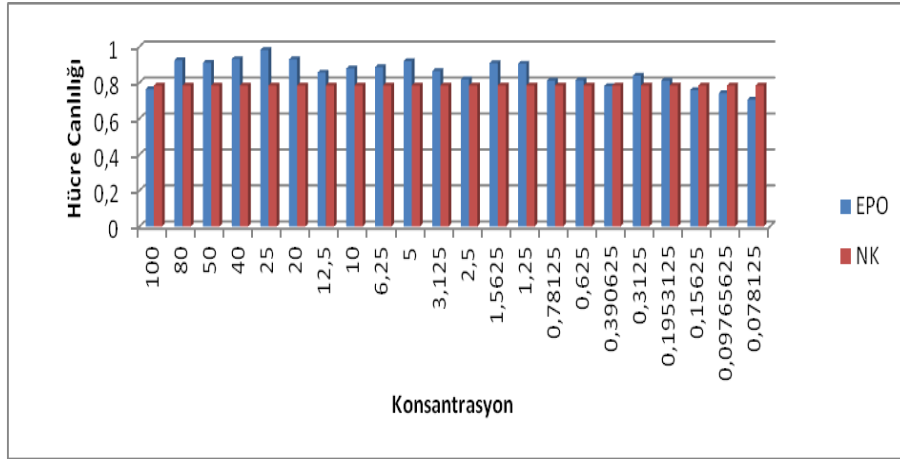


Şekil 4.5. Yeniden katlanma (Refolding) prosesinin SDS-PAGE ile analizi Marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), 3. Sonikatörle parçalanmış *E. coli* hücreleri 4. 12 000 rpm’de santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, 5. Refolding (yeniden katlama) solüsyonu içerisinde çözülmüş pelet, 8. Kolondan imidazolsüz yükleme tamponu geçirilmesiyle aşağı akan süzüntü, 9. Kolondan 300 mM imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle elde edilen süzüntü (Elüsyon 2)

4.4.4. Rekombinant EPO hücre canlılık testi sonucu

Çizelge 4.1. Hücre canlılık testi

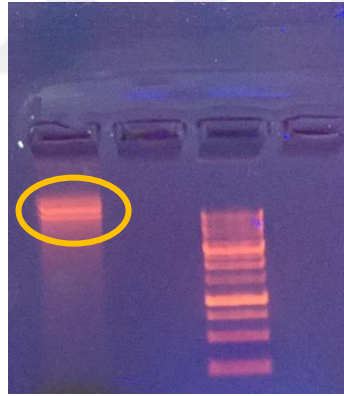
	% CANLILIK
100	97.34973
80	117.7983
50	116.1152
40	118.7067
25	125.1967
20	118.5059
12.5	109.1311
10	111.9617
6.25	112.9563
5	117.1862
3.125	110.1607
2.5	104.3529
1.5625	115.8634
1.25	115.4362
0.78125	103.3424
0.625	103.6803
0.390625	99.53643
0.3125	106.852
0.195313	103.4954
0.15625	96.72177
0.097656	94.449
0.078125	89.8939



Şekil 4.6. rEPO hücre canlılık-konsantrasyon grafiği

4.5. pPIC3.5K-TPO'nun Saflaştırılması

'GENEAID Gel Extraction Kit (Jel Ekstraksiyon Kiti)' ile saflaştırılan plazmit %0.5'lik agaroz jelde analiz edilmiştir.



Şekil 4.7. Saflaştırılan plazmit DNA'nın %0.5'lik agaroz jelde analizi, M: Markör DNA (1000kb DNA Ladder

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Geçmiş yüzyılda, bilim insanları rekombinant DNA teknolojisini; hedef genlerin ekspresyonlarını kontrol ederek canlılarda arzu edilen özelliklerin geliştirilebileceği bir hayal ürünü olarak kabul etmekteydi. Fakat son dönemlerde bu alan insan yaşamında ilerleme sağlamada benzersiz etkiler göstermiştir. Bu teknoloji sayesinde, sağlık sorunları ve beslenme amaçları için gerekli olan önemli proteinler güvenli, uygun ve etkin bir şekilde üretilmektedir. Bu teknoloji çeşitli hastalıklar için tedavi yöntemleri, gıda kaynaklarının iyileştirilmesi ve farklı olumsuz çevresel etkilere karşı direnç gibi birçok alana çözüm getiren önemli bir teknik haline gelmiştir (Khan ve ark., 2016).

Rekombinant DNA teknolojisi, yeni aşular ve farmasötikler geliştirerek sağlık koşullarının iyileştirilmesinde hayati bir rol oynamaktadır. Tedavi stratejileri ayrıca teşhis kitleri, izleme cihazları ve yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilebilmektedir. Genetiği değiştirilmiş bakterilerle sentetik insan insülini ve eritropoietinin sentezi ve araştırma amaçlı yeni tip deney mutant farelerinin üretimi, sağlıkta genetik mühendisliğinin önde gelen örneklerinden biridir (Lomedico, 1982).

Rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkışı, biyolojideki gelişmede devrim yarattı ve bir dizi önemli değişikliğe yol açmıştır. Tıbbi olarak yararlı maddeler üretmek için mikroorganizmaları, hayvanları ve bitkileri değiştirerek tıbbi genetik ve biyotıpta etkili olan çok çeşitli terapötik ürünler üretmek için yeniliklere fırsatlar ortaya koymuştur (Steinberg ve Raso, 1998).

Gerçekleştirilen bu yüksek lisans tez çalışmasında ticari değeri yüksek ve önemli hematopoetik faktörü olan EPO'nun bakteriyel ekspresyon sisteminde üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bu tez kapsamında çeşitli kan hastalıklarında kullanılan (anemi, nötropeni vb.) TPO terapötik proteinin *Pichia pastoris* ekspresyon sisteminde üretimi amaçlanmıştır. pP1C3.5K-TPO vektörünün linerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Fakat *Pichia pastoris* GS115 kompetent hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilememiştir. Elektroporasyon yöntemi ile farklı yöntemler uygulanarak hazırlanan kompetent hücrelere transformasyon işlemi yapılmıştır.

E. coli gibi prokaryotik ekspresyon sistemleri hücrelerin hızlı büyümesi, kolaylıkla çoğaltılabilmeleri, basit saflaştırılma tekniklerinin uygulanabilmesi, nispeten düşük maliyetli olması gibi nedenlerle rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılabilmektedir. Ancak prokaryotik bir organizma olmasından dolayı post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirememektedir. Bu sistemde, post-translasyonel modifikasyonları gerçekleştirememesi, proteinin büyüklüğü, hidrofobikliği gibi etkilerden dolayı proteinlerin çözünmeyen formda inklüzyon cisimciği haline gelerek işlevsel protein elde edilememesi çoğunlukla karşı karşıya gelinen bir durumdur. Inklüzyon cisimciği oluşumu sıcaklığın değiştirilmesi, indükleyici konsantrasyonunun değiştirilmesi, besi yerinin kompozisyonunun değiştirilmesi, proteinin katlanmasına yardımcı ısı şoku proteinleriyle birlikte ekspresyonu, farklı hücre hatlarının kullanılması gibi etkilerle azaltılabilmektedir. Bu tez çalışmasında da, EPO proteininin ekspresyon çalışmalarında inklüzyon cisimciği oluşumu gözlemlenmiştir. Farklı sıcaklık, besiyeri, IPTG konsantrasyonu, hücre hatları ve bunların kombinasyonları denemesine rağmen inklüzyon cisimciği oluşumunda azalma gözlemlenememiştir. Bazı kombinasyonlarda ise protein ekspresyonu hiç gözlemlenememiştir. Sonuç olarak proteinin aktif formunun eldesi için refolding (yeniden katlama) denemeleri yapılmıştır. Bu denemelerle proteinin aktif formu saflaştırılabilmektedir. Bu çalışmada kullanılan yöntemle her ne kadar başarılı bir şekilde proteinin aktif formunun eldesi sağlanmış olsa da hem kullanılan bu yöntemin hem de protein ekspresyon çalışmalarının optimize edilmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Anonima-<https://info.gbiosciences.com/blog/recombinant-protein-expression-systems-pros-cons>,2019.
- Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1966; 44:287.
- Cameron DE, Bashor CJ, Collins JJ. 2014 A brief history of synthetic biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 381– 390. (doi:10.1038/nrmicro3239).
- Demain, A. L. & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27, 297–306.
- Demircan, C., Fiskeci, A., Yücel, İ. Hematopoetik Büyüme Faktörleri. *O.M.Ü Tıp Dergisi* 1994; 11:145-146.
- Doekel, S., Eppelmann, K. & Marahiel, M. A. (2002). Heterologous expression of nonribosomal peptide synthetases in *B. subtilis*: construction of a bi-functional *B. subtilis*/*E. coli* shuttle vector system. *FEMS Microbiol Lett* 216, 185–191.
- Hsiao A, Kuo MD. 2006 High-throughput biology in the postgenomic era. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 17, 1077– 1085. (doi:10.1097/01.rvi.0000228840.12260.ff).
- Hoffman, R.C., Andersen, H., Walker, K., Krakover, J.D., Patel, S., Stamm, M.R., Osborn, S.G. Disulfide, and Glycosylation Mapping of Recombinant Human Thrombopoietin from Ser1 To arg246. *Biochemistry* 1996; 35: 14849.
- Inoue, N., Takeuchi, M., Ohashi, H., Suzuki, T. the Production of Recombinant Human Erythropoietin. *Elsevier Science* 1995; 1: 297.
- Jia, B. and Jeon, CO., 2016. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *The Royal Society*.
- Khan, S., Ullah, MW., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., Hou, H., 2016. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*. (doi: 10.1155/2016/2405954).
- Kuter, D.J., Begley, C.G. Recombinant Human Thrombopoietin: Basic Biology and Evaluation of Clinical Studies. *American Society of Hematology* 2002; 100: 3458.
- Lok, S., Foster, D.C. the Structure, Biology and Potential Therapeutic Applications of Recombinant Thrombopoietin. *Stem Cells* 1994; 12: 586-589.
- Khoo O, Suntrarachun S. 2012 Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 159– 162. (doi:10.1016/S2221-1691(11)60213-X).
- Lesley SA. 2001 High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world. *Protein Expr. Purif.* 22, 159– 164. (doi:10.1006/prev.2001.1465).
- Li, P., Anumanthan, A., Gao, XG., Ilangovan, K., Suzara, VV., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V., 2007. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol.* 142:105–124.
- Lomedico P. T. Use of recombinant DNA technology to program eukaryotic cells to synthesize rat proinsulin: a rapid expression assay for cloned genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1982;79(19):5798–5802. doi: 10.1073/pnas.79.19.5798.
- Metcalf D. Hemopoietic regulators and leukemia development: a personal retrospective. *Adv Cancer Res* 1994; 63:41.

- Nielsen, J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered* 4, 207–211.
- Özçelik, AT., Yılmaz, S., Inan, M., 2019. Recombinant Protein Production in Yeast. SpringerLink; 97-112.
- Palomares, L. A., Estrada-Moncada, S. & Ramírez, O. T. (2004). Production of recombinant proteins. *Methods Mol Biol* 267, 15-52.
- Pepperkok R, Ellenberg J. 2006 High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 690– 696. (doi:10.1038/nrm1979).
- Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014 Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 5, 172. (doi:10.3389/fmicb.2014.00172).
- Sieff, CA., 2019. Introduction to recombinant hematopoietic growth factors.
- Steinberg F. M., Raso J. Biotech pharmaceuticals and biotherapy: an overview. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science.* 1998;1(2):48–59.
- Sung, Y.H., Lim, S.W., Chung, J.Y., Lee, G.M. Yeast Hydrolysate as a Low-Cost Additive to Serum-Free Medium for the Production of Human Thrombopoietin in Suspension Cultures of Chinese Hamster Ovary Cells. *Microbiol Biotechnol* 2004; 63: 527.
- Zahrl, RJ., Peña, DA., Mattanovich, D., Gasser, B., 2017. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research.* (doi.org/10.1093/femsyr/fox068).
- Walsh, G. and Jefferis R., 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotech.*, 24(10), 1241-1252.
- Walsh, G., 2010. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotech.*, 28(9), 917-924.
- Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, AB., Figueroa, CA., Pessoa, A., Farias, JG., 2014. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology.*
- Wyre, C., 2014. Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*: Optimisation of Improved Protocols. Department of Biochemical Engineering School of Chemical Engineering College of Engineering and Physical Sciences, 3-10.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu DÜZGÜN
Doğum Tarihi ve Yeri : 30.07.1993/ADANA
Yabancı Dili : İNGİLİZCE
e-mail : dzgn_duygu@hotmail.com

Eğitim:

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gaziosmanpaşa Üni. Biyomühendislik Bölümü	2015
Lise	Adana Ticaret Odası Anadolu Lisesi	2011

Projeler ve Burslar:

Proje Türü	Proje Adı
TUBİTAK 1001	Farklı Flüoresans Farklı Flüoresans Proteinlerin Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Boya Duyarlı Güneş Pillerindeki Kullanılabilirliğinin Araştırılması
TUBİTAK 2210C Öncelikli Alanlara Yönelik yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı	Hematopoetik Hücrelerin Üretilmesi, Çoğaltılması ve Farklılaştırılmasında Görevli EPO ve TPO'nun Medikal Biyoteknolojik Ürün Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu
TUBİTAK 2241A Sanayi Odaklı Lisans Bitirme Tezi	Endüstriyel Amaçlı Selüloz Enziminin Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu