

**VARYANT UnaG PROTEİNLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİNE YÖNELİK PROTEİN
MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI**

Numan ECZACIOĞLU

Doktora Tezi

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Doktora Programı

Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU

Nisan, 2020

**T.C.
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VARYANT UnaG PROTEİNLERİNİN GELİŞTİRİLMESİNE YÖNELİK
PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI**

**DOKTORA TEZİ
Numan ECZACIOĞLU**

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU

KARAMAN, 2020

TEZ ONAYI

Numan ECZACIOĞLU tarafından hazırlanan “Varyant UnaG Proteinlerinin Geliştirilmesine Yönelik Protein Mühendisliği Uygulamaları” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU

Jüri Üyeleri:

İmza:

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Prof. Dr. Yusuf TUTAR

Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Aytaç KOCABAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU

Tez Savunma Tarihi:10/04/2020

Yukarıdaki sonucu onaylarım

**Enstitü Müdür V.
Doç. Dr. Sadık Alper YILDIZEL**

TEZ BİLDİRİMİ

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.

Numan ECZACIOĞLU



ÖZET

Doktora Tezi

VARYANT UnaG PROTEİNLERİNİN GELİŞTİRİLMESİNE YÖNELİK PROTEİN MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI

Numan ECZACIOĞLU

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU

Nisan, 2020, 145 sayfa

Floresan proteinler, biyomühendislik, biyoloji ve biyoteknoloji alanında hücredeki olayları ve molekülleri görselleştirme, takip etme ve nicellendirme için işaretleyici ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılan genetik olarak kodlanmış raportörlerdir. UnaG proteini tatlı su yılan balığı larvalarından izole edilmiş bir floresan proteindir. Heterolog ekspresyon sistemlerinde füzyon olarak ifade edilen bu protein, diğer floresan proteinlerden farklı olarak biyolojik bir ligand (konjuge olmayan bilirubin) ile aktif hale gelen bir floresan proteindir. UnaG proteini yalın haliyle (ApoUnaG) floresan emisyonu göstermez, ancak bilirubin ile birleştirildiğinde (HoloUnaG) sarı-yeşil bir floresan üretir. Bilirubin, esas olarak vücuttaki eritrositlerin yok edilmesiyle Heme katabolizmasından üretilen bir tetrapirrol moleküldür. Kan plazmasındaki bilirubin seviyesinin yükselmesi durumuna *hiperbilirubinemi* denir. Bilirubin, beyin dokusuna geçişi ile yeni doğanlarda kalıcı nörolojik hasar ile ilişkili ciddi bir durum olan *kernikterus* hastalığına neden olabilir. Plazma bilirubin analizi ve miktar tayini için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bilirubin tarafından tetiklenen UnaG floresan proteininin kullanımı, plazma bilirubin analiz çalışmalarında yeni bir yaklaşım haline gelmiştir.

Bu çalışmada, UnaG proteininin amino asidi dizisi üzerinde mutasyonlar (F17M, F17Y, L41F, N57D, N57E, N57R, T61A_T37A, T61S_T37S, T61V_T37V, Y99F_Y134W, Y99M_Y134M ve W9F_W103F) sonucu elde edilen proteinlerle ligand etkileşimlerinin biyofiziksel karakterizasyonunun araştırılması amaçlanmıştır. İfade edilen proteinlerin saflık seviyeleri SDS PAGE ile analiz edildikten sonra, proteinlerin ikincil yapıları ve termal açılma sıcaklıkları dairesel dikroizm spektroskopisi ile incelenmiştir. Ayrıca her bir varyant için, floresans spektroskopisi ile uyarma ve emisyon noktaları belirlenmiş, bilirubin ile titrasyon çalışmaları yapılmış ve ayrışma sabitleri hesaplanmıştır. Biyofiziksel karakterizasyon çalışmalarına göre, T61S_T37S varyantı ölçülebilir seviyede bir floresan ışığa gösterdiği, en yüksek termal stabiliteye ve yabanıl tip UnaG'dan daha fazla afiniteye sahip olduğu için olası bir bilirubin biyosensöründe kullanılacak favori bir varyant olarak seçilmiştir.

Anahtar Kelimeler: CD Spektroskopisi, Bilirubin, Floresan protein, SLIC, UnaG

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PROTEIN ENGINEERING APPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF VARYANT UnaG PROTEINS

Numan ECZACIOĞLU

Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering

Supervisor: Asst. Prof. Yakup ULUSU

April, 2020, 145 pages

Fluorescent proteins are genetically coded reporters, which are widely used as marker agents for visualizing, tracking and quantifying cell events and molecules in the field of bioengineering, biology and biotechnology. UnaG protein is a recently discovered fluorescent protein isolated from freshwater eel larvae. This protein, expressed as a fusion in heterologous expression systems, is a fluorescent protein that is being activated with a biological ligand (unconjugated bilirubin), unlike other fluorescent proteins. UnaG protein does not show fluorescent emission in its simple form (ApoUnaG), but when combined with bilirubin (HoloUnaG) it produces a yellow-green fluorescence. Bilirubin is a tetrapyrrole molecule mainly produced from Heme catabolism by the destruction of erythrocytes in the body. The abnormally raised level of bilirubin in blood plasma is called *hyperbilirubinemia*. Bilirubin can cause *kernicterus*, a serious condition associated with permanent neurological damage in neonates with its transition of brain tissue. Different methods have been developed for plasma bilirubin analysis and quantification. The use of UnaG fluorescent protein triggered by bilirubin has become a new approach in plasma bilirubin studies.

In this study, we aimed to investigate the biophysical characterization of ligand interactions with the proteins obtained as a result of mutations (F17M, F17Y, L41F, N57D, N57E, N57R, T61A_T37A, T61S_T37S, T61V_T37V, Y99F_Y134W, Y99M_Y134M ve W9F_W103F) on the amino acid sequence of UnaG protein. After the purity levels of the expressed proteins were analysed by SDS PAGE, secondary structures and thermal melting temperatures of the proteins were examined by circular dichroism spectroscopy. Thereafter, for each variant, the excitation and emission points were determined by fluorescence spectroscopy, titration studies were performed with bilirubin, and the dissociation constants were calculated. Based on the biophysical characterization studies, the T61S_T37S variant was chosen as a favourite variant that could be used in a possible bilirubin biosensor, as this variant demonstrated a measurable fluorescent emission, the highest thermal stability and greater affinity than wild type UnaG.

Keywords: CD Spectroscopy, Bilirubin, Fluorescent protein, SLIC, UnaG

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU'nun danışmanlığında hazırlanarak Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora tezi olarak sunulmuştur.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sorularıma yanıtlar bulan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU'ya teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Ayrıca tüm çalışmam boyunca beni sabırla dinleyen çalışma arkadaşlarım Ramazan BAYAT, Zeynep DEDE ve Kader TÜMER'e hep yanımda oldukları için minnettarım.

Sağladığı laboratuvar imkânı ile Jeremy H LAKEY'e ve bilgileri ile yol gösteren İsa GÖKÇE, Helen WALLER ve Daniel Thomas PETERS'a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni maddi ve manevi anlamda destekleyen ve arkamda güçlerini daima hissettiğim, göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için babam Mustafa ECZACIOĞLU, annem Gülhanım ECZACIOĞLU, kardeşlerim Kürşat ECZACIOĞLU ve Beyza İrem ECZACIOĞLU'na, sevgili eşim Elif ECZACIOĞLU'na ve tüm aileme teşekkürlerimi sunarım, iyi ki varsınız.

Bu tez çalışması Newcastle Üniversitesi ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi ikili iş birliği ile TUBITAK & British Council Newton Kâtip Çelebi Fonu tarafından 215Z700 nolu proje ile desteklenmiştir.

Numan ECZACIOĞLU

Karaman-2020

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
EKLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Floresan ve Floresan Proteinler	4
2.2. UnaG Floresan Proteini	9
2.2.1. UC-BR'nin UnaG florojenik kromoforu olarak belirlenmesi.....	11
2.3. Bilirubin Molekülü	16
2.3.1. Plazma bilirubin analizleri	22
2.4. UnaG Floresan Proteini ile Yapılmış Çalışmalar	26
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1. Yabancıl Tip UnaG Proteininin Ekspresyonu	30
3.1.1. Transformasyon	30
3.1.2. Konakçı hücre optimizasyonu.....	31
3.1.3. Yabancıl tip UnaG proteininin ayırma ve saflaştırma süreçleri	32
3.2. Yabancıl Tip UnaG Proteininin Geri Kazanımı ve Yeniden Kullanılabilirliği	33
3.3. Mutasyon Çalışmaları.....	33
3.3.1. Tekli mutasyonlar için yapılan SLIC prosedürü	34
3.3.2. İkili mutasyon çalışmaları	36
3.3.3. Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesi.....	39
3.3.4. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi.....	41
3.3.5. Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesi	44
3.4. Sekans Analizi	46
3.5. Elde Edilen Varyantların Ekspresyon, Ayırma ve Saflaştırma Süreçleri	46
3.5.1. Transformasyon ve üretim	47

3.5.2. Ayırma ve saflaştırma işlemleri	48
3.6. Üretilen Proteinlerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	49
3.6.1. Yabancı tip UnaG proteini trombin enzimi kesim çalışmaları	49
3.6.2. Elektroforez ile Karakterizasyon	50
3.6.3. Western Blot	51
3.6.4. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi	52
3.6.5. Termal açılma sıcaklıkları.....	53
3.6.6. Floresans spektroskopisi	53
3.6.7. Varyantların bilirubin ile ayrışma sabitlerinin belirlenmesi	54
3.6.8. Sıcaklığa Bağlı Floresan Şiddeti.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Yabancı Tip UnaG Proteininin Üretimi	56
4.1.1. Ayırma ve saflaştırma süreçleri	57
4.2. Yabancı Tip UnaG Proteininin Geri Kazanımı ve Yeniden Kullanılabilirliği.....	59
4.3. Mutasyon İşlemleri	63
4.4. Sekans Analizi	68
4.5. Varyant UnaG Proteinlerinin Üretim, Ayırma ve Saflaştırma Süreçleri.....	68
4.6. Varyant UnaG Proteinlerinin Karakterizasyon Çalışmaları	69
4.6.1. Yabancı tip UnaG proteini thrombin enzim kesimi.....	69
4.6.2. Elektroforez uygulamaları	70
4.6.3. Western Blot ile protein analizi	71
4.6.4. CD spektroskopisi.....	73
4.6.5. Termal açılma sıcaklıkları.....	74
4.6.6. Floresans spektroskopisi	77
4.6.7. Varyantların bilirubin ile ayrışma sabitlerinin belirlenmesi	78
4.6.8. Sıcaklığa bağlı floresan şiddeti	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	80
KAYNAKLAR	86
EKLER	91
5.1. Ek-A: Mutasyonların kimyasal yapı değişimi	91
5.2. Ek-B: Sekans Analizi Kromotogramları.....	93
5.3. Ek-C: Elektroforez Uygulama Çıktıları.....	105
5.4. Ek-D: CD Spektroskopisi Çıktıları.....	109

5.5. Ek-E: Termal Açılma Sıcaklık Çıktıları	112
5.6. Ek-F: Floresan Spektroskopisi Çıktıları	115
5.7. Ek-G: Ayrışma Sabiti Çıktıları	118
ÖZGEÇMİŞ	121



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2-1 UnaG ve EGFP'nin floresan karakteristikleri (Kumagai ve ark., 2013)... 13	
Çizelge 2-2 Yetişkin beslenme laboratuvarı bilirubin referans değerleri (S: Serum) (Tietze, 2011)..... 18	
Çizelge 3-1 Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler 29	
Çizelge 3-2 Tekli mutasyonlar için gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait protokol 35	
Çizelge 3-3 İki nokta mutasyonları için tasarlanan primerler 36	
Çizelge 3-4 İkili nokta mutasyonlar için gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait protokol..... 37	
Çizelge 3-5 SLIC reaksiyonu bileşenleri 38	
Çizelge 3-6 Koloni PCR bileşenleri ve PCR metodu..... 39	
Çizelge 3-7 Polar amino asit grupları için tasarlanan primerler 39	
Çizelge 3-8 Aromatik rezidülerin değiştirilmesi için tasarlanan primerler..... 41	
Çizelge 3-9 Aromatik rezidülerin değiştirilmesi için tasarlanan insörtler 42	
Çizelge 3-10 Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesi için tasarlanan insörtler 44	
Çizelge 3-11 Thrombin enzim kesim reaksiyon bileşimi 49	
Çizelge 3-12 Üretilen varyant UnaG proteinlerinin nicel analizi için gerekli olan molekül ağırlığı ve ekstinksiyon (molar soğurum) katsayıları..... 50	
Çizelge 4-1 Tek nokta mutasyonlar için SLIC reaksiyonu öncesi ve sonrası plazmid konsantrasyonu 66	
Çizelge 4-2 SLIC yöntemi ile İkili nokta mutasyonları yapıldıktan sonra elde edilen plazmitlerin konsantrasyonları 67	
Çizelge 4-3 Varyant UnaG proteinlerine ait saflaştırma basamaklarında kullanılan yıkama solüsyonlarının içerikleri 69	
Çizelge 4-4 Yabanıl tip ve varyant UnaG Apo/Holo proteinlerine ait termal açılma sıcaklıkları 75	
Çizelge 4-5 Varyant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışılma noktaları 77	
Çizelge 4-6 UnaG proteinlerine ait UC-BR için K_d değerleri..... 78	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2-1	Elektron geçiş halleri ve bir fotolüminesans sistemi; absorpsiyon, floresan ve fosforesans için kısmi Jablonski diyagramı (IC: iç dönüşüm, S: singlet, T: triplet, ISC: sistemler arası geçiş, IVR: molekül içi titreşim sönümlenmesi) (Anonim, 2016).....	5
Şekil 2-2	Floresan proteinlerin gelişim süreci (Chukadov ve ark., 2010).....	6
Şekil 2-3	Aequorea GFP veya Discosoma RFP'den izole edilen genlerin bakterilerde eksprese edilip saflaştırılmasıyla üretilen floresan proteinlerin farklı dalga boylarında görüntülenmesi (Bu görsel ile 10 Aralık 2008'de Osamu Shimomura, Martin Chalfie ve Roger Tsien "GFP, Yeşil Floresan Proteininin Keşfi ve Geliştirilmesi" başlığı adı altında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görüldü) (Zimmer, 2009).....	7
Şekil 2-4	Floresan proteinlerin uygulama alanları	8
Şekil 2-5	UnaG ve Human Fatty Acid Binding Protein amino asit sekansı hizalaması; β -sheet ve α heliks oluşturan sekans bölgeleri sırasıyla düz çizgi ve helezonlarla gösterilmiştir (Kumagai ve ark., 2013).	10
Şekil 2-6	Hipoksi ve reoksijenasyon ortamında UnaG, mCherry ve EGFP üreten HeLa hücre hatlarının floresan mikroskop görüntüsü (Kumagai ve ark., 2013).	11
Şekil 2-7	Farklı omurgalı canlılardan elde edilen serumların ApoUnaG proteinine floresan özellik kazandırma kapasiteleri (Kumagai ve ark., 2013).	12
Şekil 2-8	A. ApoUnaG'dan HoloUnaG'ın hızlı bir şekilde oluşması (Floresanın gelişimi). B. HoloUnaG (Yeşil) ve bilirubin (sarı) absorpsiyon spektrumu. C. HoloUnaG'ın normalize edilmiş uyarılma (kesikli çizgi) ve ışımaya (düz çizgi) değerleri (Kumagai ve ark., 2013).....	12
Şekil 2-9	UC-BR'nin (ekzo-endo vinil Dipiron) yapısı (Kumagai ve ark., 2013).....	13
Şekil 2-10	HoloUnaG'ın farklı açılardan görsel yapısı (Kumagai ve ark., 2013).....	14
Şekil 2-11	A. UnaG proteininin bilirubin ile bağlanma bölgesinde bulunan amino asitlerin yan gruplarının etkileşmesi (Sarı kesikli çizgiler hidrojen bağlarını göstermektedir) B. ApoUnaG proteininin (5 nM) UC-BR ile titrasyonu	

	(Kumagai ve ark., 2013), C. Yabancıl tip UnaG proteini ve bilirubinin kromofor bağlanma bölgesi (Cao ve ark., 2019)	15
Şekil 2-12	Konjuge bilirubin ve unkonjuge bilirubinin kimyasal yapısı (Ngashangva ve ark., 2019)	18
Şekil 2-13	Bilirubinin formlarına dönüştürülüp atılma süreci (Anonim, 2015).....	19
Şekil 2-14	Bilirubin metabolizması.....	20
Şekil 2-15	Bilirubin tayini için geleneksel kimyasal yöntem: (a) Diazo metodu ve (b) Vanadat oksidasyon yöntemi (Ngashangva ve ark., 2019).....	22
Şekil 3-1	A. Tek nokta mutasyonlar için tasarlanan primerlerin birbiriyle nükleotid eşleşmesi, B. İki nokta mutasyonlar için tasarlanan primerlerin insörtle nükleotid eşleşmesi	37
Şekil 3-2	Yabancıl tip UnaG proteini üzerinde asparajin57 amino asidinin gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)	40
Şekil 3-3	Yabancıl tip UnaG proteini üzerinde asparajin57 amino asidinin A. aspartik asit (D), B. glutamik asit (E) ve C. arjinin (R)'e değiştirildikten sonra gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)	40
Şekil 3-4	Yabancıl tip UnaG proteini üzerinde fenilalanin17, tirozin99, tirozin134, lösin41, triptofan9 ve tirptofan103 amino asitlerinin gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur).....	43
Şekil 3-5	Yabancıl tip UnaG proteini üzerinde fenilalanin17 amino asidinin A. tirozin (Y), B. metiyonin (M) ve C. lösin41 amino asidinin fenilalanin (F)'e değiştirildikten sonra gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur).....	43
Şekil 3-6	Yabancıl tip UnaG proteini üzerinde A. triptofan9 ve triptofan103 amino asitlerinin fenilalanin (F), B. tirozin99 amino asidinin fenilalanin (F), tirozin134 amino asidinin triptofan (W) ve C. tirozin99 ve tirozin134 amino asitlerinin metiyonin (M)'e değiştirildikten sonra gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur).....	44
Şekil 3-7	Yabancıl tip UnaG proteini üzerinde treonin61 ve treonin37 amino asitlerinin gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)	45
Şekil 3-8	Yabancıl tip UnaG proteini üzerinde treonin61 ve treonin37 amino asitlerinin A. alanin (A), B. serin (S) ve C. valin (V)'e değiştirildikten sonra gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)	46

Şekil 3-9	Üretim sistemi.....	47
Şekil 3-10	A. Parçalama (Sonikatör), B. Saflaştırma sistemi (Ni-NTA/TALON Kolon)	48
Şekil 3-11	A. Primer antibody: 6*His Monoclonal Antibody, B. Seconder antibody: Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase	52
Şekil 3-12	Floresans Spektroskopi cihazının (A) içten görünümü, (B) genel görünümü	54
Şekil 4-1	A. Yabanıl tip UnaG plazmitinin <i>E.coli</i> C41 suşuna transformasyonu, B. Füzyon UnaG proteini üretmek için kullanılan pTolT-UnaG'ın nükleotid sekansına dayanan doğrusal plazmid haritası	56
Şekil 4-2	Suş optimizasyonu için <i>E.coli</i> C41, <i>E.coli</i> BL21 (DE3) A1 ve <i>E.coli</i> BL21 (DE3) plysE suşlarında yapılan UnaG protein üretimi	57
Şekil 4-3	<i>E.coli</i> C41 suşunda yapılan yabanıl tip UnaG protein üretimi	57
Şekil 4-4	<i>E.coli</i> C41 suşundan üretilen UnaG proteinin Ni-NTA kolonunda saflaştırılması	58
Şekil 4-5	Metal iyon kompleksleri ile UnaG'ın %12 SDS PAGE görüntüsü.....	59
Şekil 4-6	A. Metal tuzlarının eklenmesi üzerine UnaG-UC-BR'nin floresans spektrumları ($\lambda_{ex} = 498$ nm), B. Çeşitli metal iyonlarının UnaG-UC-BR'ye eklenmesi ile 527 nm'de emisyon yoğunluğunun değişimini gösteren bar grafığı.....	60
Şekil 4-7	Eklenen metal iyonlarıyla, UnaG-UC-BR'nin floresan renk değişimi (A) gün ışığı altında, (B) UV ışığı altında.....	60
Şekil 4-8	A. UnaG, UC-BR, Cu^{+2} , UnaG-UC-BR, UnaG-UC-BR- Cu^{+2} 'nin normalize UV-Vis absorbans spektrumları, B. Çeşitli metal iyonlarının uygulandığı UnaG-UC-BR'nin 498 nm'de absorbansının değişimini temsil eden bar grafığı, C. UnaG-UC-BR'nin tris tamponunda Cu^{+2} iyonlarının (0-10 eşdeğer) eklenmesi ile elde edilen titrasyon profili	61
Şekil 4-9	UnaG*'ın %12 SDS PAGE jel görüntüsü (geri kazanım deneylerinden sonra), Kontrol: Yabanıl Tip ApoUnaG proteini.....	62
Şekil 4-10	HoloUnaG ve Apo/HoloUnaG* proteinlerinin floresan ışımalarının karşılaştırılması A: Gün ışığında, B: UV ışık altında. 1. UnaG-UC-BR (0,31 mg/mL), 2. UnaG-UC-BR- Cu^{2+} 3. UnaG* (0,255 mg/mL), 4. UnaG*-UC- BR	63

- Şekil 4-11** Cu⁺² iyon konsantrasyonununun 1 ila 20 eşdeğerde arttırılması üzerine (A) UnaG-UC-BR, (B) UnaG*-UC-BR'nin floresans spektrumları..... 63
- Şekil 4-12** SLIC reaksiyonunda tek nokta mutasyonlar için tasarlanan mutajenik primer eşleşmesi 64
- Şekil 4-13** Gradient PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüsü..... 65
- Şekil 4-14** Her bir tek nokta mutasyon için yapılan PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi; 1. N57D, 2. N57E, 3. N57R, 4. L41F, 5.F17M, 6.F17Y 65
- Şekil 4-15** Lineerleştirilen Plazmitin jel ekstraksiyondan önceki %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüsü 67
- Şekil 4-16** Koloni PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüsü; 1. T61A_T37A, 2. T61S_T37S, 3. T61V_T37V, 4. Y99F_Y134W, 5. Y99M_Y134M, 6. W9F_W103F, 7. Pozitif Kontrol (Yabanıl tip) 8. N57R, 9. N57E, 10. N57D, 11. L41F, 12.F17M, 13.F17Y 68
- Şekil 4-17** Thrombin kesim çalışmaları 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+2 ünite thrombin, 3. Kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+5 ünite thrombin,4. Kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+10 ünite thrombin, 5. Kesim sonrası kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+2 ünite thrombin, 6. Kesim sonrası kaynatılmış10 µL 0,5 mg/mL UnaG+5 ünite thrombin, 7. Kesim sonrası kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+10 ünite thrombin, 8. Kontrol 70
- Şekil 4-18** Analizlerde kullanılan proteinlerin SDS PAGE jel görüntüsü 1. Ladder, 2. N57D, 3. N57E, 4. N57R, 5. F17M, 6. F17Y, 7. L41F, 8. Y99F_Y134W, 9. Y99M_Y134M, 10. T61A_T37A, 11. T61S_T37S, 12. T61V_T37V, 13. W9F_W103F..... 71
- Şekil 4-19** Western Blot öncesi SDS PAGE 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. F17M, 4. F17Y, 5. N57E, 6. N57R, 7. N57D, 8. L41F, 9. Y99F_Y134W, 10. Y99M_Y134M 71
- Şekil 4-20** Western Blot öncesi SDS PAGE 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. T61S_T37S, 4. T61V_T37V, 5. T61A_T37A, 6. W9F_W103F..... 72

Şekil 4-21	Western Blot 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. F17M, 4. F17Y, 5. N57E, 6. N57R, 7. N57D, 8. L41F, 9. Y99F_Y134W, 10. Y99M_Y134M.....	72
Şekil 4-22	Western Blot 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. T61S_T37S, 4. T61V_T37V, 5. T61A_T37A, 6. W9F_W103F .	72
Şekil 4-23	Western Blot sonrası SDS PAGE 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. F17M, 4. F17Y, 5. N57E, 6. N57R, 7. N57D, 8. L41F, 9. Y99F_Y134W, 10. Y99M_Y134M	73
Şekil 4-24	Western Blot öncesi SDS PAGE 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. T61S_T37S, 4. T61V_T37V, 5. T61A_T37A, 6. W9F_W103F.....	73
Şekil 4-25	Yabanıl tip ve tüm varyant ApoUnaG proteinlerine ait termal açılma grafiği	76
Şekil 4-26	Yabanıl tip ve tüm varyant HoloUnaG proteinlerine ait termal açılma grafiği	76
Şekil 4-27	Sıcaklığa bağlı floresan yoğunluğunda gözlenen değişimler; A. Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesini içeren mutasyonlar, B. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesini içeren mutasyonlar, C. Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesini içeren mutasyonlar.....	79

EKLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Ek-C 1. N57D üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama 5, 12. Elüsyon..... 105	
Ek-C 2. N57E üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Kolondan geçmiş süpernatant, 6. Yıkama1, 7. Yıkama2, 8. Yıkama3, 9. Yıkama4, 10. Elüsyon..... 105	
Ek-C 3. N57R üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Yıkama6, 13. Elüsyon 105	
Ek-C 4. F17Y üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Elüsyon 106	
Ek-C 5. F17M üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Yıkama1, 7. Yıkama2, 8. Yıkama3, 9. Yıkama4, 10. Yıkama5, 11. Yıkama6, 12. Yıkama7, 13. Yıkama8, 14. Elüsyon..... 106	
Ek-C 6. L41F üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Kolondan geçmiş süpernatant, 6. Yıkama1, 7. Yıkama2, 8. Yıkama3, 9. Yıkama4, 10. Elüsyon..... 106	
Ek-C 7. Y99F_Y134W üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12.Elüsyon..... 107	

- Ek-C 8.** Y99M_Y134M üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Elüsyon..... 107
- Ek-C 9.** W9F_W103F üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Yıkama6, 13. Yıkama7, 14. Elüsyon..... 107
- Ek-C 10.** T61A_T37A üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Elüsyon 108
- Ek-C 11.** T61S_T37S üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Yıkama6, 13. Elüsyon 108
- Ek-C 12.** T61V_T37V üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Elüsyon..... 108
- Ek-D 1.** Yabanıl tip Apo/HoloUnaG proteinine ait Far UV CD spektrumu 109
- Ek-D 2.** Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesi ile elde edilen mutant UnaG proteinlerine ait Far UV CD spektrumları (**A.** N57D, **B.** N57E, **C.** N57R) 109
- Ek-D 3.** Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi ile elde edilen mutant UnaG proteinlerine ait Far UV CD spektrumları (**A.** F17M, **B.** F17Y, **C.** L41F)..... 110
- Ek-D 4.** Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi ile elde edilen mutant UnaG proteinlerine ait Far UV CD spektrumları (**A.** Y99F_Y134W, **B.** Y99M_Y134M, **C.** W9F_W103F) 110

Ek-D 5.	Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesi ile elde edilen mutant UnaG proteinlerine ait Far UV CD spektrumları (A. T61A_T37A, B. T61S_T37S, C. T61V_T37V).....	111
Ek-E 1.	Yabanıl tip Apo/HoloUnaG proteinine ait termal açılma grafiği	112
Ek-E 2.	Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesiyle elde edilen Apo/Holo mutant UnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri (A. N57D, B. N57E, C. N57R)	112
Ek-E 3.	Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi elde edilen Apo/Holo mutant UnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri (A. F17M, B. F17Y, C. L41F)	113
Ek-E 4.	Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi elde edilen Apo/Holo mutant UnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri (A. Y99F_Y134W, B. Y99M_Y134M, C. W9F_W103F)	113
Ek-E 5.	Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesiyle elde edilen Apo/Holo mutant UnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri (A. T61A_T37A, B. T61S_T37S, C. T61V_T37V)	114
Ek-F 1.	Yabanıl tip HoloUnaG proteinine ait uyarılma ve ışım grafiği.....	115
Ek-F 2.	Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesiyle elde edilen mutant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışım grafikleri (A. N57D, B. N57E, C. N57R)	115
Ek-F 3.	Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesiyle elde edilen mutant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışım grafikleri (A. F17M, B. F17Y, C. L41F)	116
Ek-F 4.	Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesiyle elde edilen mutant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışım grafikleri (A. Y99F_Y134W, B. Y99M_Y134M, C. W9F_W103F)	116
Ek-F 5.	Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesiyle elde edilen mutant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışım grafikleri (A. T61A_T37A, B. T61S_T37S, C. T61V_T37V)	117
Ek-G 1.	Yabanıl tip UnaG proteinine ait bilirubin lineer doğunluk eğrisi	118
Ek-G 2.	Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesiyle elde edilen mutasyonlara ait bilirubin lineer doğunluk eğrileri (A. N57D, B. N57E, C. N57R)	118

- Ek-G 3.** Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesiyle elde edilen mutasyonlara ait bilirubin lineer doygunluk eğrileri (**A.** F17M, **B.** F17Y, **C.** L41F)..... 119
- Ek-G 4.** Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesiyle elde edilen mutasyonlara ait bilirubin lineer doygunluk eğrileri (**A.** Y99F_Y134W, **B.** Y99M_Y134M, **C.** W9F_W103F) 119
- Ek-G 5.** Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesiyle elde edilen bilirubin lineer doygunluk eğrileri (**A.** T61A_T37A, **B.** T61S_T37S, **C.** T61V_T37V) ... 120



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

s	Saniye
μL	Mikro Litre
nM	Nano Molar
μM	Mikro Molar
mM	Mili Molar
M	Molar
mA	Mili Amper
nm	Nano Metre
ng	Nano Gram
rpm	Rotatory Per Minute
T_m	Erime Sıcaklığı
K_d	Ayrışma Sabiti
Da	Dalton
kDa	Kilo Dalton
Å	Angström
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
Al^{+3}	Alüminyum
Ba^{+2}	Baryum
Ca^{+2}	Kalsiyum
Co^{+2}	Kobalt
Cs^{+}	Sezyum
Cu^{+2}	Bakır
Fe^{+2}	Demir
Hg^{+2}	Cıva
Li^{+}	Lityum
Mg^{+2}	Magnezyum
Na^{+}	Sodyum
Ni^{+2}	Nikel
A (Ala)	Alanin
D (Asp)	Aspartik Asit
E (Glu)	Glutamik asit
F (Phe)	Fenil Alanin
L (Leu)	Lösin
M (Met)	Metiyonin
N (ASN)	Asparajin
R (Arg)	Arjinin
S (Ser)	Serin
T (Thr)	Threonin
V (Val)	Valin
W (Trp)	Triptofan
Y (Tyr)	Tirozin
Ex	Excitation
Em	Emission

Kısaltmalar

Açıklama

GFP	Green Fluorescent Protein (Yeşil Floresan Protein)
Amp	Ampisilin
Chl	Kloramfenikol
APS	Amonyumpersülfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
IPTG	İzopropil β -D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N, N, N, N-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
CD	Circular Dichroism
UV	Ultraviyole
BR	Bilirubin
UC-BR	Unkonjuge Bilirubin
FABP	Fatty Acid Binding Protein
UDP	Uridin difosfat
TBS	Tris Buffered Saline
MWCO	Molecular Weight Cut Off
SLIC	Sequence Ligation Independent Cloning
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression

1. GİRİŞ

Tatlı su yılan balığı olan Unagi'nin iskelet kası fizyolojisi, yaşam döngüsünün larva döneminde geçirdiği adaptasyon sonucu floresan özellikler kazanır (Tsukamoto, 2006; Hayashi ve Toda, 2009). UnaG proteini 2013 yılında Kumagai ve ark. tarafından keşfedilen, konjuge olmayan bilirubin (UC-BR) tarafından indüklenebilen, sarı-yeşil emisyon yapabilen bir floresan protein olarak tanımlanmış ve ilgili gen ve amino asit dizisi bildirilmiştir (Kumagai ve ark., 2013).

Bilirubin ($C_{33}H_{36}N_4O_6$), vücuttaki eritrositlerin yıkılması sonucu oluşan (yetişkin bir insanda 250-400 mg/gün), Heme'den katabolik olarak üretilen ve konjuge (BR) ve unkonjuge bilirubin (UC-BR) formları şeklinde bulunan, antioksidan özelliğe sahip olan bir tetrapireol moleküldür. (Huang ve ark., 2003; Ha ve Bhagavan, 2011; Ngashangva ve ark., 2019). Konjuge olmayan formunda kuvvetle lipofilik ve dokularda birikmesi halinde sitotoksik etkiye sahip sarı-turuncu renkli bir pigmenttir. Kan plazmasında bilirubin seviyesinin, bilirubin üretim oranları ve karaciğerde alım veya konjugasyon arasındaki dengesizlikten kaynaklı yükselmeye devam etmesi durumuna *hiperbilirubinemi* denir ve bilirubinin beyin dokusuna geçişi gözlenebilir. Bu durum, yeni doğanlarda kalıcı nörolojik hasarla ilişkili ciddi bir durum olan *kernikterus* hastalığına neden olabilir (Ha ve Bhagavan, 2011). *Kernikterus* hastalığı, yeni doğan bebeklerin kanındaki bilirubin miktarının artmasına bağlı olarak şiddetli sarılık geçirdiği zaman, bilirubinin kan-beyin bariyerini geçmesi halinde beyin hücreleri çekirdeklerine nörolojik olarak ciddi hasar vermesi durumudur. Çocukta zekâ geriliği ve spastisite görülebileceğinin yanı sıra beyne verdiği hasarlar geri dönüşümsüzdür ve hatta bazı durumlarda ölümle bile sonuçlanabilmektedir (Babin ve Sova 2014).

Şimdiye kadar plazma bilirubin analizinde farklı yöntemler ileri sürülmüştür ve miktar tayini için ileri yöntemler geliştirilmiştir. İlk olarak diazo reaktifi kullanılarak geliştirilen metotlar plazma bilirubin tayininde kullanılırken, daha spesifik ve doğru ölçüm için kolorimetrik, spektroskopik, elektroforetik, kromatografik, enzimatik olan ve olmayan elektrokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Bilirubin ile floresan özelliği tetiklenen UnaG floresan proteinin keşfi ile hem bilirubin çalışmalarında hem de diğer floresan proteinlerin uygulama alanları için yeni araçların geliştirilmesi adına bir yol açılmıştır.

Floresan proteinleri eksprese eden genlerin hücrelere aktarılması ile ışık mikroskobu gibi geleneksel optik görüntüleme araçlarıyla görüntülenemeyen birçok hücresel olay, floresan görselleştirme ile aydınlatılmıştır. Bu nedenle, floresan proteinler araştırmalarda önemli araçlar haline gelmiştir ve biyomedikal alanlarda kullanımları, hücrelerin dağılımı ve hareketlerinin değerlendirilmesi, in vivo protein aktivitesi ve protein-protein, protein-hücre etkileşimlerinin incelenmesi, kanser araştırması, kök hücre araştırmaları, transkripsiyonun dinamik görselleştirilmesi, membran potansiyeli, hücre ölümleri, protein inaktivasyonu ve biyosensörler gibi sayısız uygulama alanına ışık tutmuştur (Chukadov ve ark., 2010; Deliolanis ve ark., 2008; Day ve ark., 2014).

Bir tatlı su yılan balığı olan Unagi, yaşam döngüsünün larva döneminde iskelet-kas fizyolojisinin adaptasyonu sonucu floresan özellik kazanmaktadır (Tsukamoto, 2006; Hayashi ve Toda, 2009). Bu çalışmayı baz alarak Kumagai ve ark. (2013) ise UC-BR ile karıştırıldığında floresan özellik kazanan UnaG proteininin amino asit dizisini ve ilgili gen sekansını rapor etmişlerdir (Kumagai ve ark., 2013). Ayrıca, yapılan bu çalışma ile omurgalı bir canlıda ilk defa bir floresan protein tanımlanmış ve heterolog ekspresyon sistemlerinde rekombinant olarak üretilmesi başarılmıştır. Araştırmacılar, yüksek yapılı bir organizma olan *Anguilla japonica* kaynaklı UnaG proteinini hem üretim esnasında konak hücreye muhtemel toksik etkilerinden kaçınabilmek hem de inklüzyon cisimciklerinin oluşmasının engellenmek amacıyla füzyon olarak üretmeyi tercih etmişlerdir.

ApoUnaG proteininin atomik yapısı, 10 antiparalel β -tabaka tarafından oluşturulan β -fiçı yapı ve bu fiçı yapının iki ucunda birer küçük α -heliks şapka taşımaktadır. Bilirubin bağlanma bölgesi bu fiçı yapısının orta boşluğunda yer almaktadır. UC-BR ve UnaG proteini su molekülleri vasıtasıyla birçok hidrojen bağı oluşturarak sarı-yeşil floresan ışıma yapan kromofor bölgenin oluşumunu sağlamaktadır. UC-BR, ApoUnaG'ın barrel yapısının merkezi iç kısmındaki boşluğa yerleşerek bağlanır. Bilirubin eksovinil dipirrinone parçası β -fiçı yapısındaki proteinin orta boşluğuna yerleşirken endovinil dipirrinone parçası ise β -fiçı yapının giriş kısmına konuşlanır ve tüm bilirubin birçok hidrojen bağıyla proteine merkezi iç boşluktan eklenerek HoloUnaG'ı oluşturmuş olur. UC-BR'ye bağlanma afinitesini ve özgüllüğünü incelemek için ApoUnaG kullanılmış ve 98 pM'lik bir K_d değeri belirlenmiştir. Bu çalışmalar, ApoUnaG'ın, UC-BR ile

oluşturduğu kompakt ligand-protein kompleksi ile tutarlı olarak yüksek afinite ve özgülükte bağlandığını göstermektedir (Kumagai ve ark., 2013).

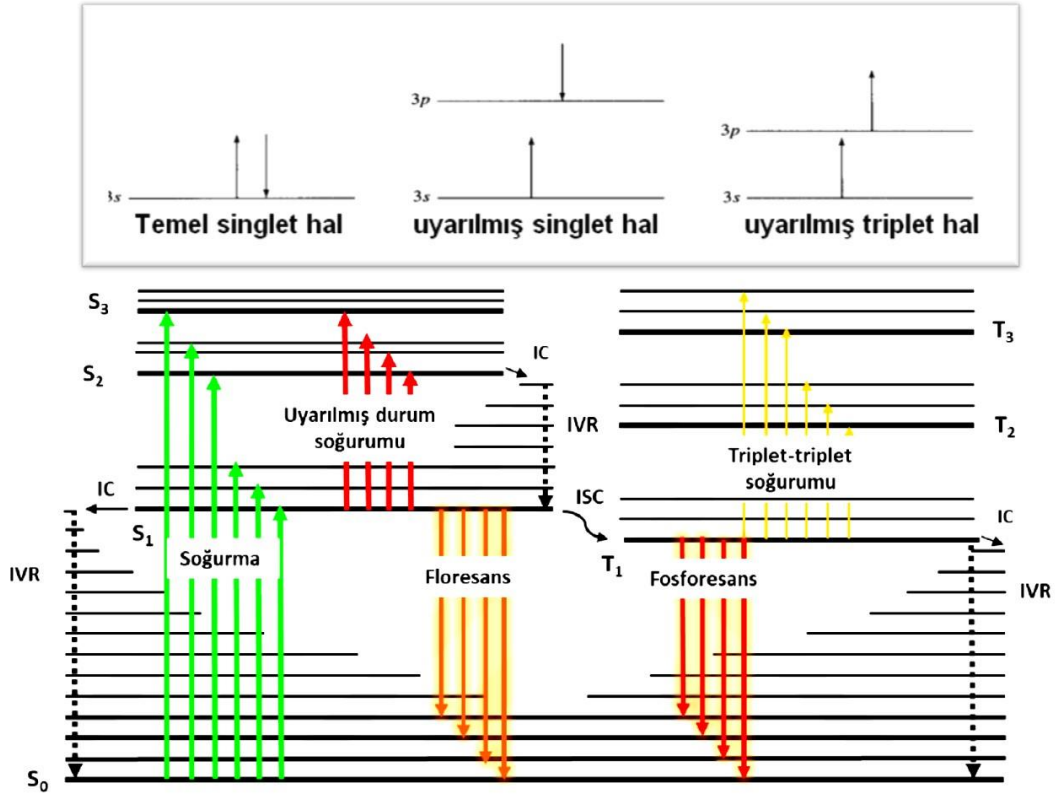
Bu çalışmanın amacı UC-BR ile daha yüksek afinite de bağlanacak daha stabil mutant proteinleri elde etmektir. Bunun için, hızlı ve pratik bir yöntem olan SLIC metodu kullanılarak UnaG proteini amino asit sekansı üzerinde belirlenen bölgelerde nokta mutasyonlar ve bu mutasyonlar sonucu elde edilen plazmitlerden protein ekspresyonları yapılmıştır. Mutant proteinlerin saflık seviyeleri SDS PAGE ile analiz edildikten sonra CD spektroskopisi ile termal ayrılma sıcaklıkları belirlenmiş olup ikincil yapıları incelenmiştir. Her bir varyant için floresans spektroskopisinde eksitasyon ve emisyon noktaları belirlendikten sonra UC-BR ile bağlanma afiniteleri incelenmiş olup ayrılma sabitleri hesaplanmıştır. Biyofiziksel karakterizasyon çalışmalarına göre, en yüksek termal stabiliteye sahip olan T61S_T37S varyantı, aynı zamanda yabancı tipe göre iki kat daha yüksek afiniteye sahip olması nedeniyle muhtemel bir bilirubin biyosensöründe kullanılabilircek favori varyant olarak seçilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Floresan ve Floresan Proteinler

Floresan olayı, atom, iyon veya molekülün belli dalga boyundaki fotonu absorblamasıyla temel enerji seviyesinden uyarılmış hale geçmesi ve molekülün eski haline dönmesi için kısa süre ($\sim 10^{-5}$ s) sonra daha uzun bir dalga boyunda başka bir foton saçılımıyla gerçekleşen ultraviyole, görünür veya infrared ışımadır. Floresan emisyonu dayanmaktadır. Emisyon, uyarılmış molekül, iyon veya atomların üst enerji seviyesinden daha düşük enerji seviyelerine geçmesi sonucu belli dalga boylarında ışınlamalar yapması durumudur. (Anonim, 2016; Anonim, 1998).

Araştırmacılar için bir floresan molekülün florofor bölgesinin parlaklığı en önemli hususlardan biridir. Parlaklık, bir molekülün ışığı ne kadar iyi soğurduğuna ve ne kadar iyi yansıttığına (kuantum verimi) bağlıdır. Işıma yapan moleküllerin tüm uyarılan moleküllere olan oranının ölçümü, bir diğer deyişle sistemden yayılan foton sayısının molekül tarafından absorblanan foton sayısına oranı floresanın kuantum verimini ifade eder. Kuantum veriminin ölçülmesinin tipik uygulaması, bilinmeyen molekülün bilinen bir standartla karşılaştırılmasıyla yapılır. Kuantum verimi, kromoforun yerel çevresiyle olan etkileşiminden ve sıcaklık, pH gibi çevre şartlarından oldukça etkilenir (Wall ve ark., 2015). Floresan ile fosforesans benzer özellikler gösterirken ikisi birlikte fotoluminesans olarak ifade edilebilir. Ancak floresan ışıma uyarılmış singlet halden temel hale geçişi, fosforesans ışıma ise uyarılmış triplet halden temel haldeki singlet hale geçişi tanımlar ve fosforesans ışıma nispeten daha fazla süre ($\sim 10^{-4}$ s- 10s) devam eder. Floresan aktivitesi, ilk kez 1935 yılında Profesör Alexander Jablonski tarafından ışığın emilimini ve yayılmasını açıklamak için önerilen klasik Jablonski diyagramıyla şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 2-1) (Lakowicz, 1999).



Şekil 2-1 Elektron geçiş halleri ve bir fotoluminesans sistemi; absorpsiyon, floresan ve fosforesans için kısmi Jablonski diyagramı (IC: iç dönüşüm, S: singlet, T: triplet, ISC: sistemler arası geçiş, IVR: molekül içi titreşim sönümlenmesi) (Anonim, 2016)

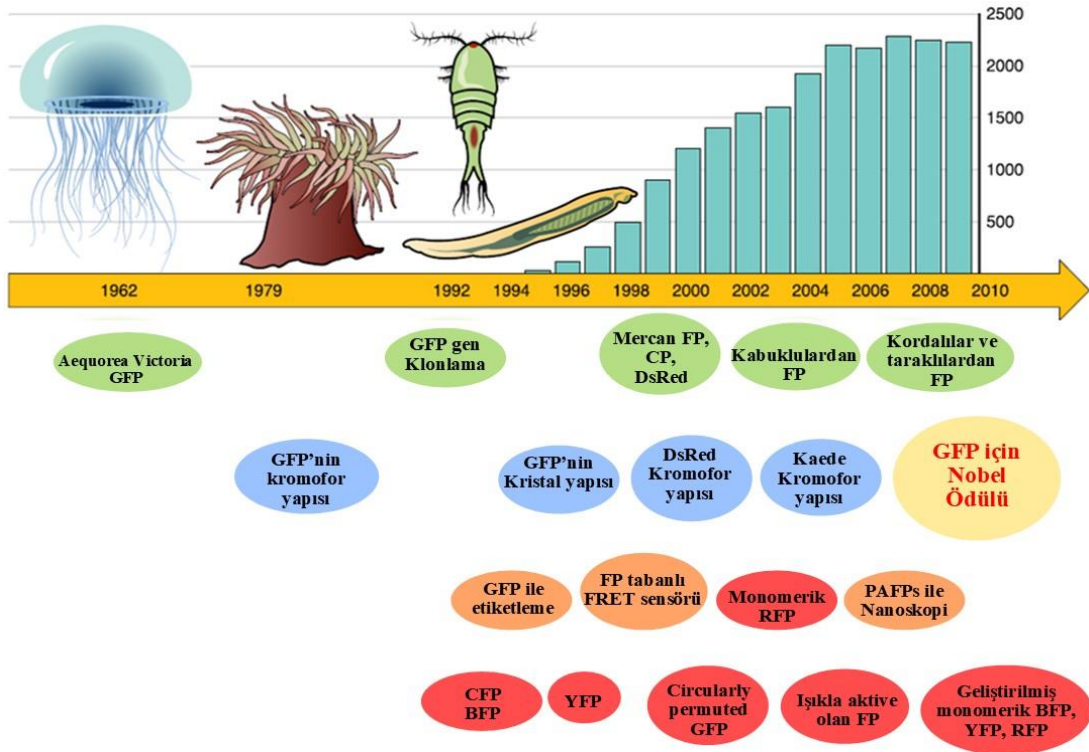
Jablonski diyagramına göre en altta S_0 ile simgelenen koyu yatay çizgi, singlet haldeki molekülün temel hal enerjisini göstermektedir. Şeklin en üstünde temel singlet hal, uyarılmış singlet hal ve uyarılmış triplet hal elektronların orbitallere yerleşme yönelimleri gösterilmiştir. Diyagramın sağında görünen T_1 yatay çizgi, birinci elektronik triplet halinin enerjisini göstermektedir. Üç uyarılmış elektronik halin enerji seviyeleri en üstteki koyu çizgiler ile gösterilmiştir. S_1 (birinci) ve S_2 (ikinci) elektronik singlet hallerini gösterir. Floresan özelliği etkileyen faktörler yapısal rijitlik, rezonans sınır formülü, pH, sıcaklık, çözücü etkisi, elektron geçiş tipi, halkalaşma, kuantum verimi ve moleküler polaritenin etkisi olarak sıralanabilir (Lakowicz, 1999; Beşergil, 2015; Anonim, 2016).

Floresan olayının literatüre geçmesinin ardından 1962 yılında Osamu Shimomura'nında aralarında bulunduğu bir grup araştırmacı, medikal ve biyoteknolojik uygulamaların temeline mükemmel bir alan sağlayan yeşil floresan proteini (GFP) keşfetmişlerdir. Ekip olarak yakaladıkları milyon civarı deniz anası (*Aequorea victoria* ve *Aequorea aequorea*) ile yaptıkları fotokimyasal çalışmalarla ışığın emisyonundan sorumlu

kimyasal yapıyı daha iyi anlamayı hedeflemişlerdir. Bu bilgiler ışığında, kas fiber yapısında kalsiyum salınımı ve tekrar emilimini görüntülemek için aequorin lüminesansından faydalanılmış ve böylece bu tarz aequorin uygulamalarının önü açılarak Osamu Shimomura'nın GFP çalışmaları hız kazanmıştır.

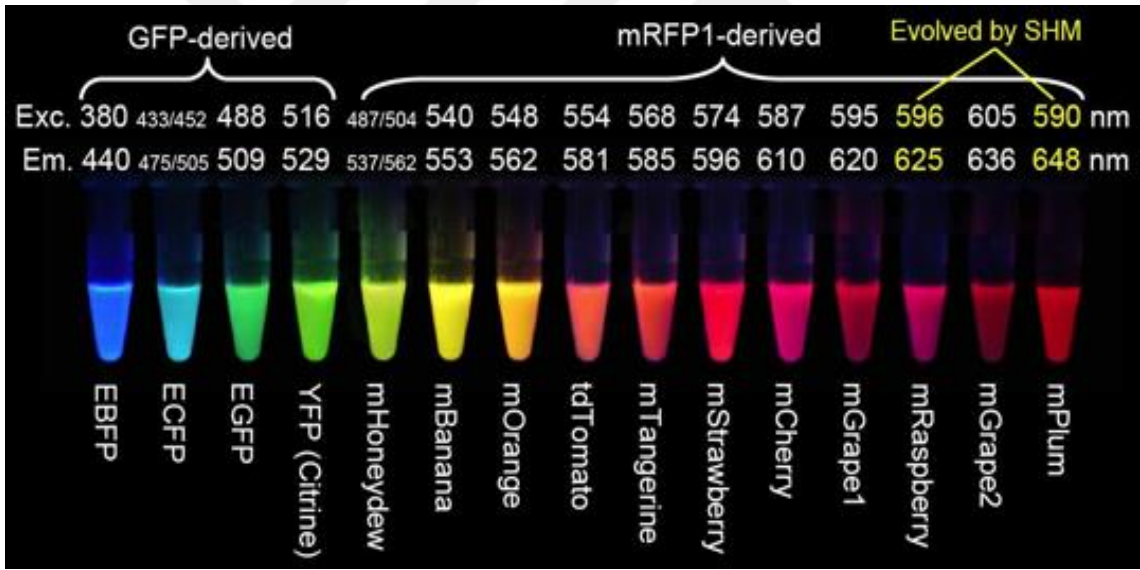
Yeşil floresan proteinlerin keşfi ve geliştirilmesi adına yaptığı çalışmalar, Osamu Shimomura'ya 2008 yılında Nobel Kimya Ödülünü kazandırmıştır. Biyolüminesans organizmaların %80'ninden fazlası okyanuslarda bulunmaktadır. Bu organizmaların çoğu, suda en derine gidebilen dalga boyu, mavi ışığı soğurmaktadır ($\lambda_{ex}=475nm$). Biyolüminesans olayı organizmalar tarafından, ateş böceklerindeki gibi bir eş bulma amacıyla, dinoflagellatlarda olduğu gibi avcılarına karşı bir savunma mekanizması olarak veya fener balığının cazibesini kullandığı gibi yiyecekleri çekmek ya da bulmak için kullanılır (Tsien, 1998; Zimmer, 2002; Day ve ark., 2014)

Klonlama ve ekspresyon başarısının ardından kromofor bölgesinde gerçekleştirilen mutasyonlarla farklı renkte floresan proteinler ortaya çıkmıştır. Aynı süreçte GFP'nin kristal yapısı da aydınlatılmıştır ve floresan proteinler alanındaki çalışmalar da böylece ivme kazanmıştır (Şekil 2-2) (Prasher, 1992; Chalfie, 1994; Day ve ark., 2014).



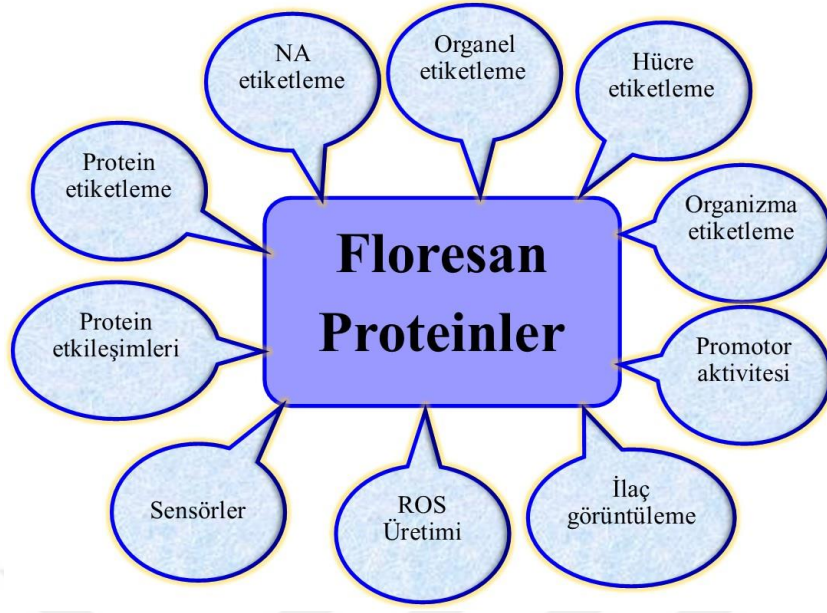
Şekil 2-2 Floresan proteinlerin gelişim süreci (Chukadov ve ark., 2010)

GFP'yi genetik bir markör olarak kullanma fikrini ilk defa Douglas Prasher geliştirmiştir. 238 amino asitten oluşan GFP genini sekanslama ve klonlama çalışmalarını gerçekleştirdikten sonra *E.coli*'de eksprese etmeyi hedeflemiş, ancak elde ettiği proteinde herhangi bir floresan olay gözlemleyememiştir. Kromofor bölgesinin posttranslasyonel modifikasyona uğraması gerektiği, ancak bu sürecinde enzimatik bir sistemle gerçekleşeceği sonucuna varmıştır. Martin Chalfie bu sonuca ikna olmamış olacak ki, Prasher'dan temin ettiği GFP klonuyla çalışmalar yapmış ve kısa süre sonra *E.coli*'den yeşil floresan proteini üretmeyi başarmıştır. Diğer biyoluminesans moleküllerin aksine, GFP herhangi bir liganda bağlı olmaksızın otomatik olarak floresan özelliği gösterdiği için herhangi bir organizmada genetik markör olarak kullanma fikri gelişmiştir. Belki de Prasher GFP'yi üretmeyi başardı ancak o zamanın şartları düşünüldüğünde floresan görüntüleme çalışmasında başarıya ulaşamadı, ancak bu olaylar floresan proteinlerin evrim sürecini tam anlamıyla başlatmıştır.



Şekil 2-3 Aequorea GFP veya Discosoma RFP'den izole edilen genlerin bakterilerde eksprese edilip saflaştırılmasıyla üretilen floresan proteinlerin farklı dalga boylarında görüntülenmesi (Bu görsel ile 10 Aralık 2008'de Osamu Shimomura, Martin Chalfie ve Roger Tsien "GFP, Yeşil Floresan Proteininin Keşfi ve Geliştirilmesi" başlığı adı altında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görüldü) (Zimmer, 2009)

Floresan proteinlerin gelişim sürecine bakıldığında, GFP ve türevlerinin farklı uyarılma ve soğrulma değerlerine sahip olmasına bağlı olarak elde edilen farklı renklerdeki bu proteinler canlı sistemlerin organizasyonunu ve fonksiyonlarını açığa çıkarmak için kullanılan temel araçlardan biri olmuştur (Şekil 2-3).



Şekil 2-4 Floresan proteinlerin uygulama alanları

GFP veya türevlerini eksprese eden genlerin hücelere aktarılması ile ışık mikroskobu gibi geleneksel optik görüntüleme araçlarıyla görüntülenemeyen birçok hücresel olay, floresan görselleştirme ile aydınlatılmıştır. Bu nedenle, floresan proteinler araştırmalarda önemli araçlar haline gelmiştir ve biyomedikal alanlarda kullanımları, hücrelerin dağılımı ve hareketlerinin değerlendirilmesi, *in vivo* protein aktivitesi ve protein-protein, protein-hücre etkileşimlerinin incelenmesi, kanser araştırması, kök hücre araştırmaları, transkripsiyonun dinamik görselleştirilmesi, membran potansiyeli, hücre ölümleri, protein inaktivasyonu ve biyosensörler gibi sayısız uygulama alanına ışık tutmuştur (Şekil 2-4) (Chukadov ve ark., 2010; Deliolanis ve ark., 2008; Day ve ark., 2014).

Floresan proteinlerin keşfi, özellikle biyomedikal araştırmaların ilerlemesinde önemli bir enstrüman olarak karşımıza çıkmaktadır. *Aequorea victoria*'dan izole edilen GFP (Tsien, 1998), GFP benzeri floresan proteinler (Chudakov ve ark., 2010; Miyawaki ve ark., 2012) ve near-infrared (NIR) floresan proteinler birçok deneysel çalışmada kullanılmışlardır (Piatkevich ve ark., 2013). 2013 yılına kadar omurgalı canlılardan izole edilen herhangi bir floresan protein bulunmamaktayken, 2013 yılında Kumagai ve arkadaşları (2013) tarafından ilk omurgalı kaynaklı floresan protein olan UnaG proteini tanımlanmış olup, bu protein bilim insanları tarafından in-vivo ve in-vitro çalışmalarda diğer floresan proteinler gibi kullanılmaya başlanmıştır. Floresan proteinler, kendilerine

birçok avantaj sağlayan önemli fiziksel özelliklere sahiptirler (Chirgwandi ve ark., 2008);

- a. Güneş spektrumuna uygun bölgelerde (yakın-UV, IR, yakın-IR veya uzak-IR) son derece yüksek soğurma (absorblama) ve uyarılma (excitation) katsayısına sahip olması,
- b. Yüksek akım taşıma yeteneği ve çok iyi taşıyıcı mobilite özelliği,
- c. Yapısında kolay yük akışına izin vermesi yani hem yarıiletken ile hem de elektrolit ile uyumlu elektron transferi özelliğe sahip olması,
- d. Yüksek ışımaya yetenekleri ve renk çeşitliliği,
- e. Stokes kaymasının yüksek olması,
- f. Floresan oluşumu için amino asit yapısından farklı herhangi başka bir gruba ihtiyaç duyulmamasıdır.

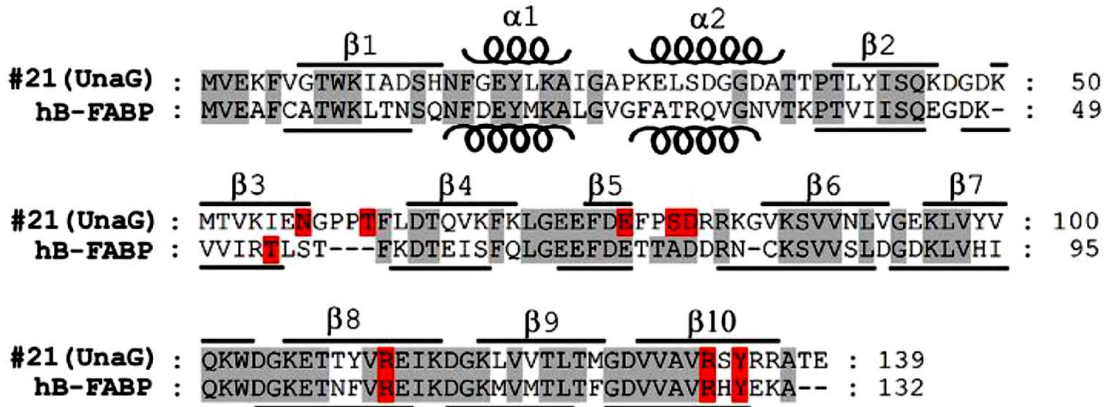
2.2. UnaG Floresan Proteini

Unagi sushi, bir tatlı su yılan balığı olan *Anguilla japonica* ile yapılan geleneksel Japon mutfağının önemli lezzetlerinden birisidir. Bu canlılar yaşam döngüleri boyunca yumurtlamak için açık okyanuslarda binlerce kilometre yol kat ederler. Açık okyanusa bırakılan larvalar ise birkaç ay boyunca asıl habitatlarına dönmek için yolculuk yaparlar (Tsukamoto, 2006). Bu uzun göç döngüsü iskelet-kas fizyolojilerinde dikkate değer adaptasyonların gelişmesini gerektirir. Durmaksızın gerçekleştirilen bu göç süreci, kasların anaerobik oksidasyon metabolizmasında ve hemostazisinin sağlanmasında meydana gelen adaptasyonlardır. Meydana gelen bu adaptasyonlar için şimdiye kadar yapılan çalışmalar, bu yolculuğu aydınlatmada yetersiz kalmıştır.

Hayashi ve Toda (2009), UnaG'ın kas fibrillerinin floresan özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir. Buradan yola çıkarak, floresan özelliği oluşturan yapıyı ortaya çıkartmak adına 2013 yılında ise Kumagai ve ark. (2013) ilk defa bilirubin (BR) ile indüklenebilen güçlü floresan özelliğe sahip UnaG proteinini tanımlayarak amino asit dizisini ve ilgili gen sekansını rapor etmişlerdir. Ayrıca, yapılan bu çalışma ile omurgalı bir canlıda ilk defa bir floresan protein tanımlanmış ve heterolog ekspresyon sistemlerinde rekombinant olarak üretilmesi başarılmıştır. Su yılan balığında floresan özellik gösteren UnaG proteini, heterolog olarak üretildiği bakteriyel sistemlerde herhangi bir floresan ışımaya göstermemiştir. Bunun üzerine aynı protein memeli

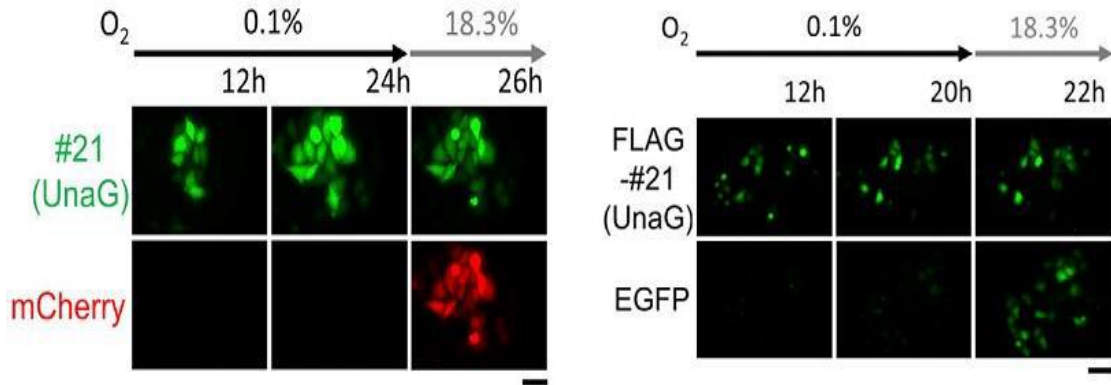
ökaryotik ekspresyon sisteminde üretilmiş ve normal şartlar altında yine herhangi bir floresan özelliğe rastlanmamıştır.

Japon araştırma gurubu, su yılan balığı ile ekspresyon sistemlerdeki farklılıklara bakarak su yılan balıklarında, hücrelerin hipoksi durumuna maruz kalmaları sonucu floresan ışımaya yaptıklarını fark etmişlerdir. Hipoksi durumunda hücre metabolizmasında meydana gelebilecek değişiklikler üzerine gitmişler ve sonunda floresan ışımının bir Heme metaboliti olan un-konjuge bilirubin tarafından tetiklendiği sonucuna ulaşmışlardır (Kumagai ve ark., 2013). UnaG proteini Japon tatlı su yılan balığı olan *Anguilla japonica*'nın kas fibrillerinde sentezlenen 139 amino asitten oluşan bir protein olmakla beraber amino asit dizisi bakımından insan yağ asidi bağlayıcı proteinlerle (Fatty Acid Binding Protein, FABP) büyük benzerlik gösterdiği için (%56) bu grup içine dahil edilmiştir (Şekil 2-5) (Zimmerman ve Veerkamp, 2002).



Şekil 2-5 UnaG ve Human Fatty Acid Binding Protein amino asit sekansı hizalaması; β -sheet ve α heliks oluşturan sekans bölgeleri sırasıyla düz çizgi ve helezonlarla gösterilmiştir (Kumagai ve ark., 2013).

Heterolog olarak HeLa hücrelerinde eksprese edilen UnaG proteini hipoksi durumunda çok güçlü yeşil floresan özellik göstermiştir. Hipoksi durumunun ortadan kaldırılmasıyla ortamdaki oksijen miktarı tekrar normal seviyeye çıkarılmış ve floresan şiddetinde herhangi bir azalma gözlenmemiştir (Şekil 2-6).

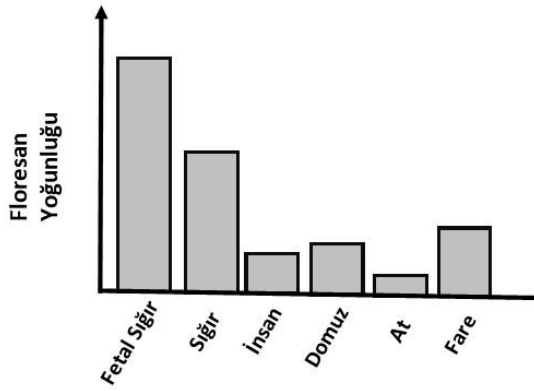


Şekil 2-6 Hipoksi ve reoksijenasyon ortamında UnaG, mCherry ve EGFP üreten HeLa hücre hatlarının floresan mikroskop görüntüsü (Kumagai ve ark., 2013).

2.2.1. UC-BR'nin UnaG florojenik kromoforu olarak belirlenmesi

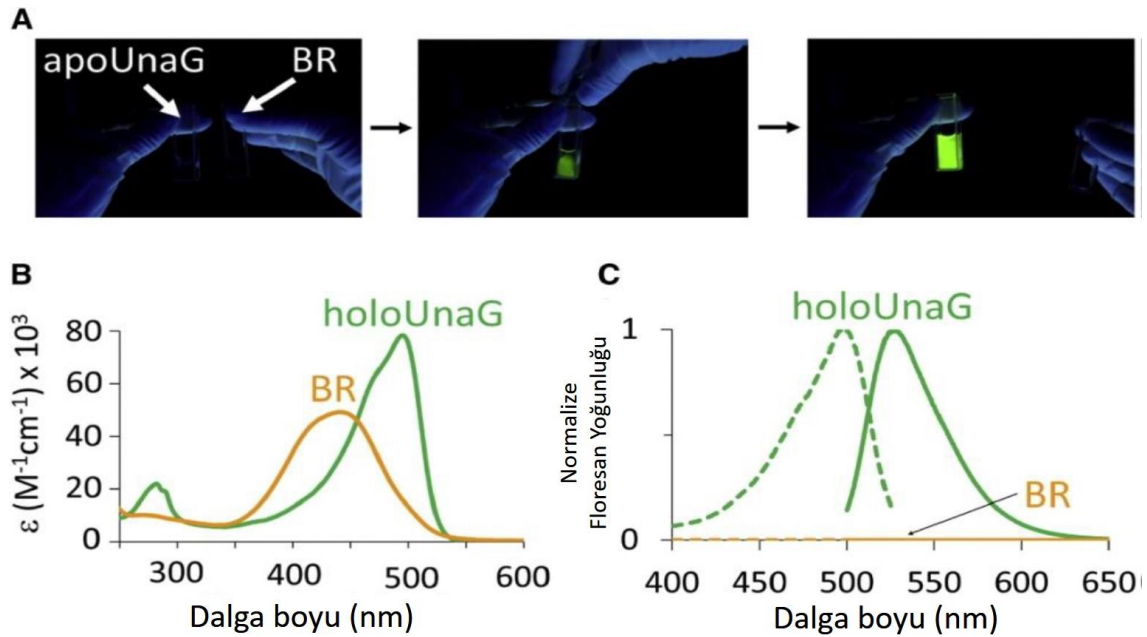
Bakteride rekombinant olarak üretilen UnaG proteininin herhangi bir floresan göstermemesinin ardından Kumagai ve ark. (2013), proteinin floresan özellik kazanması için memeli kofaktörü(leri) ile tetiklendiği hipotezini ileri sürmüşlerdir. Proteinin amino asit dizisi bakımından FABP grubu ile benzerliğini göz önüne alarak bu kofaktörün bir yağ asidi olabileceği ihtimalini düşünmüşlerdir. Araştırmacılar UnaG proteinini Glutasyon-S-Transferaz ile füzyon olarak üretmişler ardından bu bölgeyi bir proteaz aracılığıyla uzaklaştırdıktan sonra kalan kısmı (Apoprotein, ApoUnaG) kullanmışlardır. ApoUnaG'ın floresan özelliğini ortaya çıkartmak için yalın UnaG birçok farklı biyolojik materyal ile karıştırılmış ve farklı hayvanlardan elde edilen serumlarla birleştirilen UnaG farklı miktarlarda floresan ışımaya göstermiştir (Şekil 2-7).

Aşağıdaki bar grafiğine bakıldığında, UnaG proteini fetal sığır serumu ile diğerlerine göre çok daha yüksek floresan yoğunluğu kazanmıştır. Fetal sığır serumunun içeriğinde diğerlerinden farklı olarak yüksek miktarda bilirubin olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında araştırmacılar bu ligandın bilirubin olabileceğini ileri sürmüşlerdir.



Şekil 2-7 Farklı omurgalı canlılardan elde edilen serumların ApoUnaG proteinine floresan özellik kazandırma kapasiteleri (Kumagai ve ark., 2013).

Bunun üzerine UV ışık altında direkt olarak ApoUnaG proteinine bilirubin eklemişler ve çok hızlı ve kuvvetli bir yeşil floresan ışımının meydana geldiğini gözlemlemişlerdir (Şekil 2-8A). Araştırmacılar, yüksek yapılı bir organizma olan *Anguilla japonica* kaynaklı UnaG proteinini hem üretim esnasında konak hücreye muhtemel toksik etkilerinden kaçınabilmek hem de inklüzyon cisimciklerinin oluşmasını engellenmek amacıyla füzyon olarak üretmeyi tercih etmişlerdir. Fakat Glutasyon-S-Transferaz'ın de bilirubine afinitesinin olması nedeniyle (Arias ve ark., 1980) Glutasyon-S-Transferaz füzyonunu, thrombin enzim kesim bölgesinden keserek uzaklaştırmışlardır.



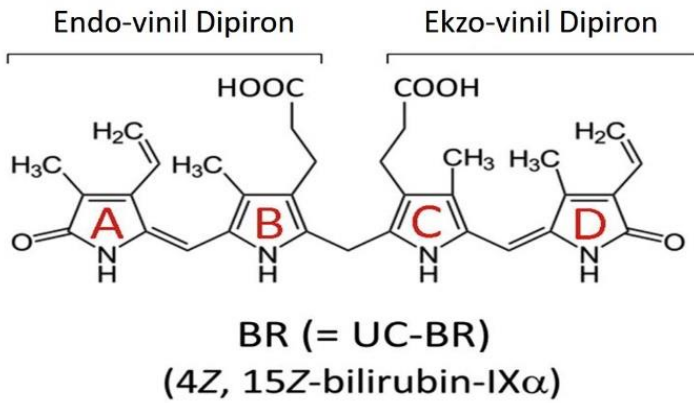
Şekil 2-8 A. ApoUnaG'dan HoloUnaG'ın hızlı bir şekilde oluşması (Floresanın gelişimi). B. HoloUnaG (Yeşil) ve bilirubinin (sarı) absorpsiyon spektrumu. C. HoloUnaG'ın normalize edilmiş uyarılma (kesikli çizgi) ve ışıma (düz çizgi) değerleri (Kumagai ve ark., 2013)

HoloUnaG maksimum ışık absorbansını 498 nm’de göstermiştir. Bilirubinün bağlanması ile proteinin absorpsiyon spektrumu 48 nm daha kırmızı bölgeye doğru kaymıştır (Şekil 2-8B). Yapılan çalışmalarda HoloUnaG proteininin quantum verimi 0.51, pH stabilitesi 4-11 olarak bulunmuştur. HoloUnaG intrinsic floresanının EGFP’ye göre daha yüksek olması, UnaG üzerinde yapılabilecek mutasyonlarla yeşil floresan bölgelerde daha farklı soğurma ve ışımaya değerlerinin elde edilebileceğini göstermektedir (Çizelge 2-1) (Kumagai ve ark., 2013).

Çizelge 2-1 UnaG ve EGFP’nin floresan karakteristikleri (Kumagai ve ark., 2013).

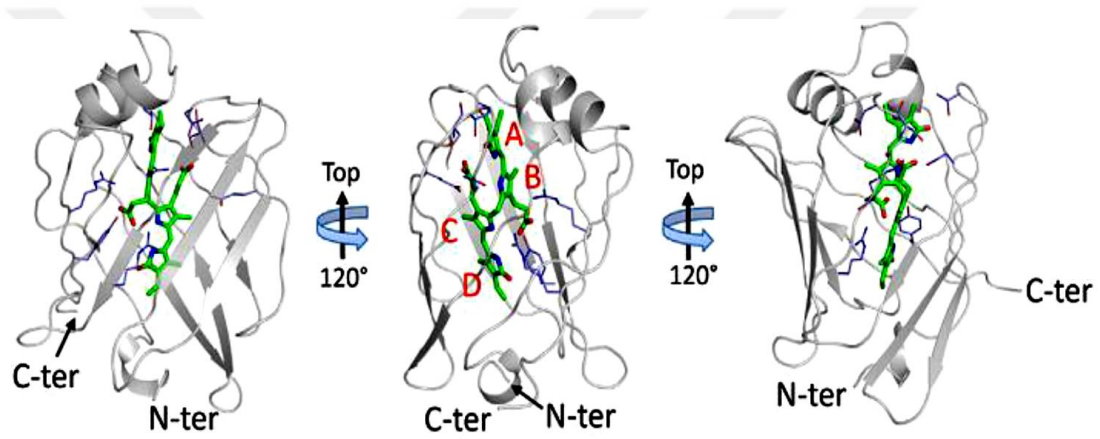
	ex/em Maksimum (nm)	Molar Ekstinksiyon Katsayısı	Floresan kuantum verimi	pKa	O ₂ gereksinimi	Amino Asit Sayısı
UnaG	498/527	77,300 (498 nm)	0,51	<4.0	Yok	139
EGFP	490/509	49,550 (490 nm)	0,60	5.8	Var	238

Bilirubin ve UnaG proteini su molekülleri vasıtasıyla birçok hidrojen bağı oluşturarak yeşil floresan ışımaya yapan kromofor bölgenin oluşumunu sağlamaktadır. Bu etkileşimler diğer FABP-ligand komplekslerine benzer şekilde gerçekleşmektedir. Örneğin docosahexaenoic (DHA) insanlarda bulunan bir yağ asididir ve FABP ile karboksilat gurupları üzerinden Arg127 ve Tyr129 amino asitleri ile hidrojen bağı oluşturarak etkileşime girmektedir. Bu şekilde hidrojen bağıyla oluşturulan etkileşimler pek çok FABP-ligand etkileşiminde korunmuş olup ligand protein bağlanmasında kritik bir rolü olduğu düşünülmektedir (Storch ve Thumser, 2000; Schaap ve ark., 2002; Zimmerman ve Veerkamp, 2002).



Şekil 2-9 UC-BR’nin (ekzo-endo vinil Dipiron) yapısı (Kumagai ve ark., 2013).

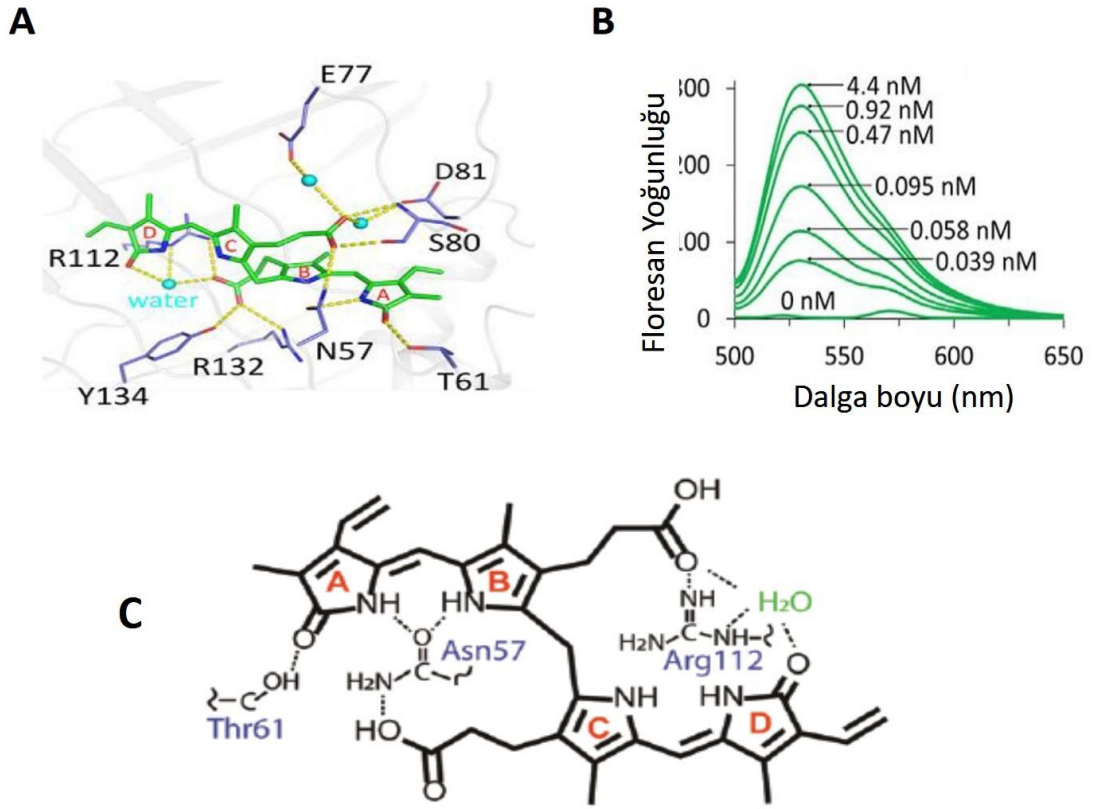
Benzer bir hidrojen bağı β -halka propiyonat karboksilat ve Arg132/Tyr134 içeren HoloUnaG'da de görülmektedir. Bilirubin, ApoUnaG'ın barel yapısının merkezi iç kısmındaki boşluğa yerleşerek bağlanır. Bilirubinin eksovinil di-pirrinone parçası (Şekil 2-9) β -fiçı yapısındaki proteinin orta boşluğuna yerleşirken endovinil di-pirrinone parçası (Şekil 2-9) ise β -fiçı yapının giriş kısmına konuşlanır ve tüm bilirubin birçok hidrojen bağıyla proteine merkezi iç boşluktan eklenerek HoloUnaG'ı oluşturmuş olur. HoloUnaG proteininin atomik yapısı, tıpkı diğer FABP'lar gibi HoloUnaG'da 10 antiparalel β -tabaka tarafından oluşturulan β -fiçı yapı ve bu fiçı yapının iki ucunda birer küçük α -heliks şapka taşımaktadır. Bilirubin bağlanma bölgesi bu fiçı yapısının orta boşluğunda yer almaktadır (Şekil 2-10).



Şekil 2-10 HoloUnaG'ın farklı açılardan görsel yapısı (Kumagai ve ark., 2013)

Şekil 2-10'da HoloUnaG'ın genel yapısı üç farklı açıdan görselleştirilirken, proteinin ikincil yapısı gri renkte gösterilmiştir. Proteinin yan zincirleri çubuklarla (gri renkli karbon atomlarıyla) gösterilmiştir (N-ter, amino terminus; C-ter, karboksil terminali). Yeşil renkli yapı ise unkonjuge bilirubini temsil etmektedir.

Bilirubinin ApoUnaG ile olan etkileşimi diğer FABP holo-kompleksleriyle karşılaştırıldığında eşsizdir. Ayrıca bu bağlanma stratejisi diğer düşük afiniteli FABP ile karşılaştırıldığında UnaG proteininin bilirubin ile nasıl bu kadar spesifik ve yüksek afinitede bağlandığını açıklamaktadır (Şekil 2-11B) (Kumagai ve ark., 2013).



Şekil 2-11 A. UnaG proteinin bilirubin ile bağlanma bölgesinde bulunan amino asitlerin yan gruplarının etkileşmesi (Sarı kesikli çizgiler hidrojen bağlarını göstermektedir) B. ApoUnaG proteininin (5 nM) UC-BR ile titrasyonu (Kumagai ve ark., 2013), C. Yabanıl tip UnaG proteini ve bilirubinin kromofor bağlanma bölgesi (Cao ve ark., 2019)

UC-BR'ye bağlanma afinitesini ve özgüllüğünü incelemek için ApoUnaG kullanılmış ve 98 pM'lik bir K_d değeri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar, bilirubinin türevleri olan ditaurobilirubin (alternatif C-BR), biliverdin (BV) veya ürobilin gibi başka hiçbir molekülün ApoUnaG ile floresan ışımaya oluşturmadığını göstermiştir. Bu çalışmalar, ApoUnaG'ın, UC-BR ile oluşturduğu kompakt ligand-protein kompleksi ile tutarlı olarak yüksek afinite ve özgüllükte bağlandığını göstermektedir (Kumagai ve ark., 2013).

Yabanıl tip UnaG'ın yapısı, N57 ve T61 yan zincirleri tarafından sağlanan, bilirubinin endo-vinil dipirrinon grubu ile üç doğrudan hidrojen bağı yapar. T61'e ait yan zincir, ortalama 2,6Å mesafede olan bilirubin halkasının A karboniline bir hidrojen bağı sağlar ve N57, ortalama 2,9 Å ve 3,0 Å mesafelerde olan pirol halkasının A ve B azotuyla etkileşime girer. N57'nin, bilirubinin karboksilatlarından ve laktam halkalarından biriyle temas halinde olduğu, uzun bir konformasyonda bağlı olduğu bulunmuştur. Floresan

proteindeki serbest bilirubin molekül içi hidrojen bağları, su molekülleri ya da yan zincir kalıntıları hidrojen bağları ile değiştirilmiştir (Şekil 2-11C). N57'de yapılacak nokta mutasyonlar, A ve B'nin pirol halkarındaki azotla doğrudan iki hidrojen bağıını uzaklaştırır ve ayrıca T61 ve A halkasındaki karbonil ile arasında hidrojen bağıının kaybına neden olan yakındaki kalıntıların yeniden düzenlenmesine yol açar. Bu doğrudan hidrojen bağları, su aracılı hidrojen bağları ile değiştirilir. Bu modifikasyonlar, bilirubin genel esnekliğini arttırarak dipirrinon A-B halkalarının çok daha büyük bir bükülme açısına sahip olmasını sağlar.

2.3. Bilirubin Molekülü

Bilirubin ($C_{33}H_{36}N_4O_6$), çok büyük bir kısmı vücuttaki eritrositlerin yıkılması sonucu oluşan (yetişkin bir insanda 250-400 mg/gün), Heme'den katabolik olarak üretilen ve konjuge ve unkonjuge bilirubin formları şeklinde bulunan, antioksidan özelliğe sahip olan sarı renkli bir tetrapirel moleküldür. Heme molekülünün doku bölgelerinde oluşumunu takiben, Heme molekülü serum albümini, taşıyıcı protein olarak kullanıp kovalent olmayan bir şekilde bağlanarak konjuge olmayan bir formda karaciğere taşınır. Bir albümin molekülü, bir yüksek afinite bölgesinde ve bir ila üç ikincil bölgede iki bilirubin molekülünü bağlar. Su içerisinde çözünürlüğü düşük olan bilirubin molekülü ve albümin arasındaki etkileşimin ayrılma sabiti $10^8-10^7 M^{-1}$ aralığındadır. Karaciğerde, glukuronik asit ile enzimatik esterleşme reaksiyonu sonucu konjuge edilir ve çözünebilir formuna dönüştürülerek vücuttan özellikle safra ve idrar ile atılır (Huang ve ark., 2003; Ha ve Bhagavan, 2011; Ngashangva ve ark., 2019).

Bilirubin, pirol halkası benzeri dört halkanın (tetra-pirel) açık bir zincirinden oluşmuştur. Heme gurubunda ise bu dört halka porfirin halkası olarak adlandırılan daha büyük bir halkaya bağlanmış şekilde bulunmaktadır. Bilirubin bu yapısıyla alglerde bulunan ve özellikle fotosentez için ışık yakalama aracı olarak kullanılan bir pigment olan fikobilin ile çok yakın benzerlik göstermektedir. Tıpkı bu pigmentlerde olduğu gibi ışığa maruz kalan bilirubin molekülleri içerisindeki bazı çiftli hidrojen bağları izomerize olurlar. Bu özellik de yeni doğan sarılığında fototerapi kullanımının önünü açmaktadır. Bilirubinun ışığa maruz kalmış E,Z izomeri, ışık terapi uygulanmamış Z,Z izomerine göre daha fazla çözünebilir özelliğine sahiptir. Bu değişikliğin bazı iç hidrojen bağlarının ışık etkisiyle ortadan kaldırılmasıyla meydana geldiği düşünülmektedir

(McDonagh ve ark., 1980). Bilirubin, biliverdin redüktazın bir tetrapirolik safra pigmenti olan ve aynı zamanda Heme katabolizmasının ürünü olan biliverdin ile reaksiyonu sonucunda oluşur. Bilirubin okside olduğunda tekrar biliverdine dönüşebilir.

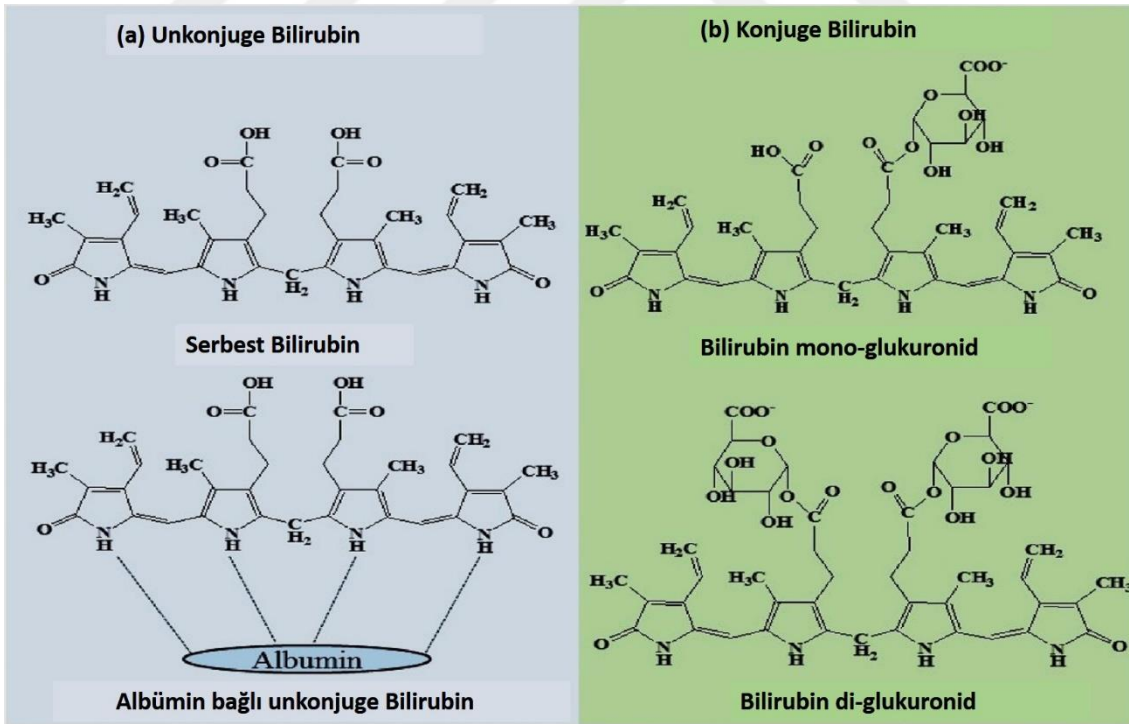
Bilirubin, konjuge olmayan formunda kuvvetle lipofilik ve dokularda birikmesi halinde sitotoksik etkiye sahip sarı-turuncu bir pigmenttir. Bilirubin-albümin kompleksinin oluşmasıyla plazma hacmi başına taşınan bilirubin miktarı artar ve bilirubinin karaciğer haricindeki dokulara difüzyonunu en aza indirgenerek bilirubin sitotoksitesisi önlenir. Bilirubin-albümin kompleksinin oluşumu, bilirubinin normal olarak idrarda görünmemesine neden olur. Bilirubinin karboksilik grupları, iki laktam karbonil oksijenleri ve dört pirolenon halka nitrojeni arasında altı iç hidrojen bağı olduğunda bu grupların suyla hidrojen bağı yapması önlenir. Ancak bilirubinin propiyonil yan zincirlerinin glukuronik asit ile esterlenmesi sonucu iç hidrojen bağları kopar ve bilirubinin çözünürlüğü artar. Albüminin bilirubini bağlama kapasitesi, konjuge olmayan bilirubinin artan miktarlarıyla veya albümin konsantrasyonunun azalması gibi nedenlerle aşılsa, bilirubin karaciğer haricindeki dokulara nüfuz etmesi kolaylaşacaktır. Bu durum, yeni doğanlarda kalıcı nörolojik hasarla ilişkili ciddi bir durum olan *kernikterus* hastalığına neden olabilir (Ha ve Bhagavan, 2011).

Total bilirubin, karaciğer haricindeki kaynaklardan ve konjuge hepatik bilirubinden elde edilen unkonjuge bilirubinin toplamıdır. Serum bilirubin konsantrasyonu, hepatositlerin bilirubini alma, konjuge etme ve salgılama yeteneğini yansıtır. Normal bir insan kan plazmasında çoğunluğu unkonjuge bilirubinden oluşan desilitre başına 0,1-1 mg bilirubin (2-17 $\mu\text{mol/L}$) vardır (Çizelge 2-2). Toplam bilirubin miktarının yükselmesi, önemli karaciğer hasarı ve hastalıklarının meydana geleceği anlamına gelir (Gwaltney, 2016). Kan plazması bilirubin ile doygun hale geldiğinde (2- 2,5 mg/dL) sarılık ortaya çıkar ve fazla bilirubin cilt, sklera ve diğer dokulara yayılır. Sklera özellikle etkilenir, çünkü bilirubin için yüksek afiniteye sahip olan elastin bakımından zengindir. *Hiperbilirubinemi*, konjuge veya unkonjuge bilirubin seviyelerinin yükselmesinden kaynaklanabilir (Ha ve Bhagavan, 2011).

Çizelge 2-2 Yetişkin beslenme laboratuvarı bilirubin referans değerleri (S: Serum) (Tietze, 2011)

Bilirubin		
Total	S	0,3-1.0 mg/dL
Direkt	S	0,1-0,3 mg/dL
İndirekt	S	0,2-0,7 mg/dL
Delta		

Konjuge bilirubin (direkt veya doğrudan bilirubin) suda çözünen bilirubin çeşididir ve safra yoluyla atıldığı için kanda çok az miktarda bulunur. Unkonjuge bilirubin lipofilik yapıda olduğu için suda çözünmez ve vücuttan atılabilmesi için önce çözünür bir konjugata dönüştürülmelidir. Bu yüzden, üridin difosfat (UDP) -glukuronil transferaz enzimi ile karaciğerde, konjuge bilirubine dönüştürülür. Karaciğerden ATP bağımlı bir taşıyıcı tarafından ince bağırsağa taşınır. Çok küçük bir miktar böbreklere geçer ve idrarla atılır. Konjuge bilirubin ayrıca idrarın kendine özgü sarı rengini verir.

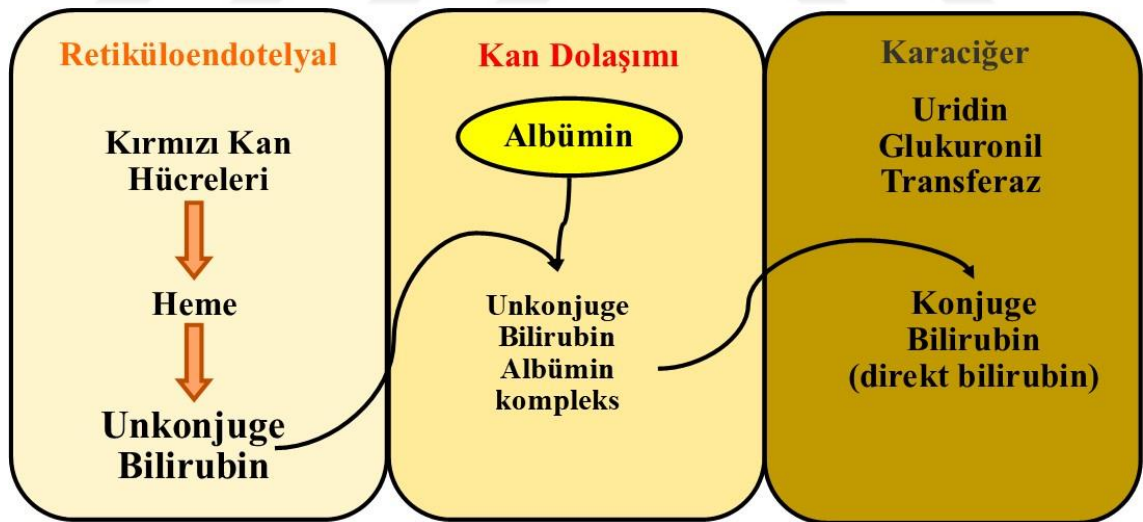


Şekil 2-12 Konjuge bilirubin ve unkonjuge bilirubin kimyasal yapısı (Ngashangva ve ark., 2019)

Unkonjuge (dolaylı veya indirekt) bilirubin, konjuge bilirubin albümine bağlı formudur ve kandaki total bilirubinin baskın şeklidir. Makrofajlarda Heme gruplarının

(özellikle Heme porfirin halkasının) parçalanmasından üretilir. En büyük Heme kaynağı kırmızı kan hücrelerinin içindeki hemoglobindir, ancak miyoglobin ve sitokrom P450 izoenzimleri içeren başka kaynaklar da vardır. Kırmızı kan hücrelerinin içindeki hemoglobin haricindeki kaynaklar unkonjuge bilirubin yaklaşık %20'sini oluşturur. Bilirubin bu formu hidrofilik grupları arasında oluşan iç hidrojen bağları nedeniyle suda çözünmez ve daha sonra plazmada albümine bağlanarak karaciğere gönderilir (Anonim, 2013).

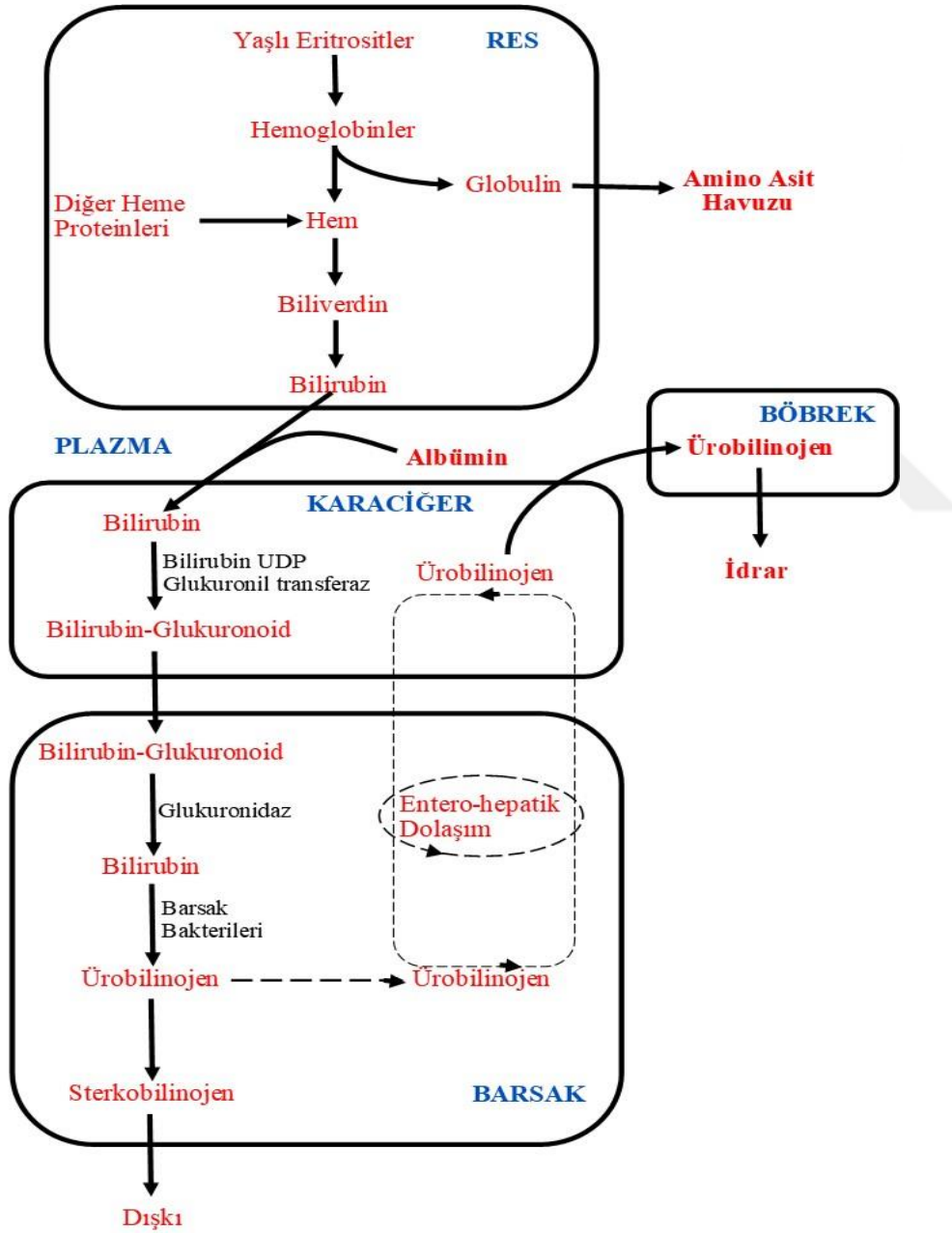
Proteinlere bağlı konjuge bilirubin olan delta bilirubin (veya biliprotein) adı verilen üçüncü bir bilirubin formunun olduğu bazı kaynaklarda belirtilmiştir. Delta bilirubin seviyesi toplam bilirubinden konjuge ve unkonjuge bilirubin miktarlarının çıkarılmasıyla hesaplanan bir değerdir. Delta bilirubin metabolik olarak aktif değildir ve vücuttan yavaşça atılır. Uzun bir yarı ömre sahiptir ve idrarla (protein bağlı olduğu için) atılmadığından genel protein katabolizması yoluyla uzaklaştırılması gerekir. Safra kanalı tıkanmasında ve bazı karaciğer hastalıklarında seviyesi yükselir. Konjuge edilmiş bilirubine benzer şekilde diazo boyaları ile reaksiyona girer, ancak genellikle rutin kimya sonuçlarında verilmez. (Anonim, 2013)



Şekil 2-13 Bilirubin formlarına dönüştürülüp atılma süreci (Anonim, 2015)

Bilirubin üretiminden atılıma kadar olan adımlara bakıldığında (Şekil 2-13), ilk olarak retikuloendotelial sistemde eritrositlerde hemoglobin metabolizması sonucu unkonjuge bilirubin oluşur. Daha sonra albümin, kan dolaşımına geçen unkonjuge bilirubini bağlar ve bu kompleks karaciğere taşınır. Karaciğerde hepatositler unkonjuge bilirubini alır ve

hepatik mikrozomlar UDP glukuronil transferaz enzimi aracılığıyla ve glukuronik asit ile konjuge bilirubin haline getirir. Gastrointestinal sistem terminal ileum ve kolonda, konjuge bilirubini bakteriyel enzimler ile dekonjuge edip ürobilinojene metabolize eder. Ürobilinojenin %18'i enterohepatik dolaşım yoluyla emilir ve karaciğere geri gönderilir. %80 ürobilinojen, stercobiline dönüştürülür ve dışkı yoluyla atılır. Stercobilin dışkının karakteristik rengini verir. %2 ürobilinojen ürobiline dönüştürülür ve idrarla atılır (Şekil 2-14) (Anonim, 2015).



Şekil 2-14 Bilirubin metabolizması

Kan plazmasında bilirubin seviyesinin, bilirubin üretim oranları ve karaciğerde alım veya konjugasyon arasındaki dengesizlikten kaynaklı yükselmeye devam etmesi durumuna *hiperbilirubinemi* denir ve bilirubinin beyin dokusuna geçişi gerçekleşir. Bu durum *kernikterus* adı verilen bir hastalık ile sonuçlanabilir. *Kernikterus* hastalığı, yeni doğan bebeklerin kanındaki bilirubin miktarının artmasına bağlı olarak şiddetli sarılık geçirdiği zaman, bilirubinin kan-beyin bariyerini aşması sonucu ciddi nörolojik beyin hasarlarının oluşmasıdır. Bu hastalıkta bilirubinin beyne verdiği hasarlar geri dönüşümsüz oldu için spasite veya zeka geriliği gibi durumlar gözlenebilir ve hatta bazı durumlarda ölümle bile sonuçlanabilmektedir (Babin ve Sova 2014). *Kernikterus* hastalığı özellikle pre-mature yeni doğanlarda daha yaygın olsa da tüm bebeklerde görülebilme potansiyeline sahiptir. *Hiperbilirubinemi* yeni doğanların yaklaşık %60'ında görülürken bu oran pre-mature bebeklerde yaklaşık %80'e kadar çıkabilmektedir (Altuner Torun ve ark, 2017).

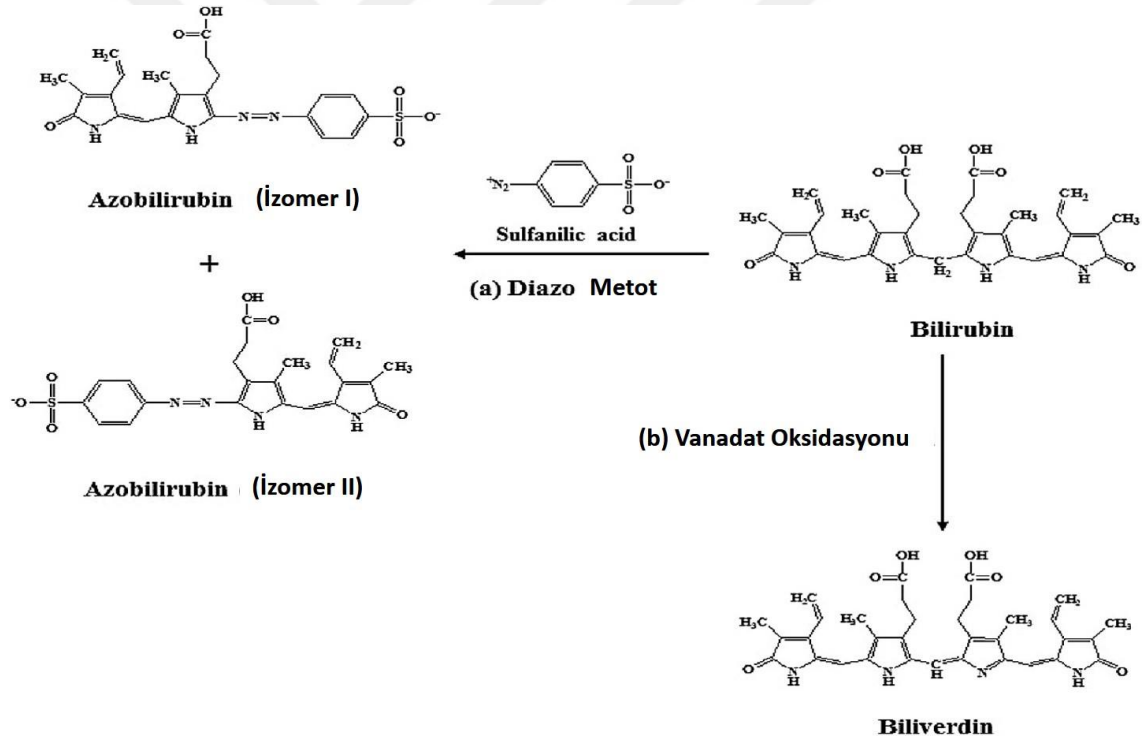
Yapılan aile çalışmaları, Gilbert sendromunun otozomal dominant bir hastalık olduğunu göstermektedir. Gilbert sendromu, karaciğerin bilirubini uygun şekilde işleyemediği hafif bir karaciğer hastalığıdır ve hemolitik olmayan, unkonjuge *hiperbilirubinemi*'nin en yaygın sebebi olabilir. Serum bilirubin konsantrasyonu genellikle 1,3-3 mg/dL arasında dalgalanırken nadiren 5 mg/dL'yi aşar. Diğer karaciğer fonksiyon testleri normaldir. Sendrom genellikle asemptomatiktir ve rutin laboratuvar testleri veya diğer hastalıklar için muayene sırasında tespit edilir. Gilbert sendromunda unkonjuge *hiperbilirubinemi*, enzimin promotör bölgesinde bulunan bir mutasyondan kaynaklanan düşük UDP-glukuroniltransferaz aktivitesinden kaynaklanmaktadır (Ha ve Bhagavan, 2011).

Crigler Najjar tip1 sendromu, doğumda başlayan ağır unkonjuge *hiperbilirubinemi* ile karakterize resesif geçişli bir hastalıktır. Sendrom, bilirubinin konjugasyonu ve atılımı için gerekli olan hepatik idrar difosfoglukuronat (UDP) glukuronosil transferaz aktivitesinin yokluğundan kaynaklanmaktadır. Unkonjuge bilirubinin plazmada birikmesi nedeniyle hastalar *kernikterus* hastalığı açısından risk altındadır. Fototerapi serum bilirubin düzeylerini başarılı bir şekilde azaltsa da fototerapi daha az etkili hale geldiğinde hastalar yine ergenlik döneminde *kernikterus* riski altındadır (Fox ve ark., 1998).

2.3.1. Plazma bilirubin analizleri

Şimdiye kadar plazma bilirubin analizinde farklı yöntemler ileri sürülmüştür. 1938'de Jendrassik ve Grof yayınladığı çalışmada, aşırı alkalinin eklenmesi üzerine pembe azo pigmentlerinin mavi tuzlara dönüşmesinden faydalanarak kalorimetrik ölçümleri gerçekleştirmişlerdir (Şekil 2-15a).

Vanadat oksidaz yöntemi, okside edici ajan olarak vanadik asit kullanarak bilirubinun biliverdin'e oksidasyon işlemine dayanmaktadır (Şekil 2-15b). Vanadat oksidaz yöntemi, diazo yöntemi ile mükemmel bir korelasyona sahiptir. Diazo yönteminden daha basit ve daha hızlı bir işlem olduğundan dolayı, vanadat yöntemi engelleyici maddeleri içeren numuneler için alternatif bir yöntem olarak kullanılmıştır (Ameri ve ark., 2011).



Şekil 2-15 Bilirubin tayini için geleneksel kimyasal yöntem: (a) Diazo metodu ve (b) Vanadat oksidasyon yöntemi (Ngashangva ve ark., 2019)

1944 yılında Powell tarafından yapılmış çalışmada, geleneksel diazo reaktifinin plazmaya eklenmesinin ardından fazla miktarda sodyum benzoat-üre çözeltisi eklendikten sonra kalorimetrik olarak ölçümü yapılmıştır.

1950’de King ve Coxon, plazma içerisinde diazo reaktifine amonyum sülfat ekledikten sonra etanol ilave edip birkaç kristal sodyum azid kristali ile karıştırmışlardır. Elde ettikleri karışımın absorbans okumalarını yaparak azo pigment sönümü, basit bir formül vasıtasıyla düzeltilmiş ve plazma bilirubin seviyesi hesaplanmıştır.

Rice 1958 yılında plazma bilirubin miktarı tahmin denemesi için Stoner ve Weisberg (1957) yönteminin “ideal bir analitik prosedürün kriterlerini oldukça iyi yerine getirebileceğini” ileri sürmüştür. Teknikte, deproteinizasyon içerirken aynı zamanda asit mavi azo pigmentlerinin ölçümünü bir son nokta cihazı olarak kullanılmıştır. Maalesef yayınlanan çalışmanın kullanımı, uygun ölçülerde kuvvet elde edilemediği için mümkün olmamıştır.

1958’de Lathe ve Ruthven’in diazo reaktifini kullanarak geliştirdikleri metotta, alkol eklendikten sonra azo pigment rengi genellikle yaklaşık 5 dakikada maksimum yoğunluğuna ulaşırken diğer bazı pigmentlerinki 9 dakika kadar sürmüştür. Test rutin olarak onuncu dakikada kalorimetrik olarak yapılmıştır. Bu yöntem, birleştirme promotörü olarak bir alkol kullanan, çökelmeyen metotlar sınıfının temsilcisi olarak seçilmiştir.

1958 yılında White ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise plazma seyreltildikten sonra fosfat tamponu içerisine alınmış ve doğrudan spektroskopik yöntem kullanılmıştır (White ve ark., 1958; Watson ve Roger, 1961).

Diazo metodu ile bilirubin tayini özellikle düşük seviyelerde çalışıldığı zaman çok güvenli sonuçlar vermemektedir. Genellikle bu metotta düşük bilirubin seviyelerinde sonuç gerçekte olan miktardan daha az çıkarken, yüksek bilirubin konsantrasyonlarında daha düşük değerlere işaret edebilmektedir. Bu yüzden özellikle un-konjuge bilirubin miktarındaki çok küçük yükselişlerde bile, tıpkı Gilbert sendromunda olduğu gibi tayin yapılamaz. Diazo metodu için uygun ölçüm limitleri yaklaşık 20 mg/dL’dir. Diazo metoduyla yapılan bilirubin tayin yönteminde, renk karşılaştırma için kullanılan standart çözeltilerden kaynaklı hatalar ve bilirubin dışındaki diğer bazı renkli pigmentlerden kaynaklı hatalar olarak iki hata ile karşılaşılmıştır (Puppalwar ve ark., 2012).

Bilirubin miktarlarının tayini için ileri yöntemler de geliştirilmiştir. Bunlardan ilki yeni doğanlarda hem konjuge hem de unkonjuge bilirubini belirlemek için elektroforetik metotların uygulandığı kapiller elektroforezidir ve etkili bir ayırma tekniği olduğundan sadece küçük bir numune hacmiyle hızlıca analiz gerçekleştirilir (Zhang ve ark., 1999).

İleri yöntemlerden bir diğeri, kromatografik yöntemlerden HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) olup, Zelenka ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Yöntem, basit ve hızlı bir şekilde numune hazırlama adımlarını takiben hem doku hem de vücut sıvılarında unkonjuge ve toplam bilirubini belirlemede kullanılmaktadır (Zelenka ve ark., 2008). Bu çalışma ile serbest bilirubini belirlemek için ultrasonik termal lens spektrometrik (TLS) (HPLC-TLS) metodu birleştirilmiş ve kan serum örneği herhangi bir ön muamele yapılmaksızın kullanılmıştır.

Elektrokimyasal yöntemlerde bilirubin tayini için kullanılmıştır. Özellikle amperometri, bilirubin algılamasında yaygın olarak kullanılmıştır. Bilirubinin belirlenmesinde elektrot yüzeyinde bilirubinin doğrudan oksidasyonunu ve bilirubin tayini için moleküler baskılayıcı polimer kullanımını içeren enzimatik olmayan yöntemler ve bilirubin oksidaz enzimini kullanan enzimatik bir algılama yöntemi kullanılmıştır (Ngashangva ve ark., 2019).

Bilirubin oksidaz (BOX), bilirubinin elektrokimyasal tayininde yaygın şekilde kullanılmıştır. Enzim temelli metotların çoğunda, BOX ile katalize edilen H_2O_2 , amperometrik sinyal üretmek adına bilirubinin oksidasyonunun doğrudan redoks göstergesi olarak kullanılmıştır (Ngashangva ve ark., 2019). Bilirubin analizi için yapılmış enzim temelli metotlara bir örnek olarak, bir grafit epoksi matrisi içine bilirubin oksidaz ve yaban turpu peroksidazın dahil edilmesine dayanan amperometrik enzim elektrotu rapor edilmiştir. Elde edilen elektrotlar yenilenebilir ve düşük bilirubin seviyelerinde bile tespit imkânı sunar. İmalat şeması basittir ve cevap süreleri kısadır (Wang ve Ozsoz, 1990).

Bilirubinin elektro-aktif yapısından dolayı, nanopartikül ve nanokluster arayüzünde ve moleküler baskı platformlar gibi enzimatik olmayan elektrokimyasal yöntemler bilirubin tayini için kullanılan metotlar arasındadır. Yapılan çalışmada İTO elektrotunun yüzeyi ince bir nikel nanopartikül tabakası ile kaplanmıştır ve 180 günlük bir süre zarfında ~100 kez tekrarlanan ölçümden sonra başlangıç aktivitesinin %80'nini

koruduğu gözlemlenmiştir. Sarılık hastalarından ve sağlıklı kişilerden alınan gerçek numunelerin sonuçları standart kolorimetrik yöntemlerle karşılaştırılmıştır (Rawal ve ark., 2017).

Spektroskopik yöntemlerden biri olan floresans spektroskopisiyle yapılan ölçümlerde, sulu çözelti içindeki bilirubinin floresan yoğunluğunun çok düşük olduğu görülmüştür. Ancak sulu çözeltilerdeki bilirubinin kuantum etkinliği doğal taşıyıcısı olan albümine bağlandığı zaman arttığı için, bilirubin analizlerinde floresan ölçümlerinin yararlı olacağı düşünölmüştür. Bilirubin-albümin kompleksi 520 nm'de emisyon yapar. Albümine bağlı bilirubinin bu florometrik ölçümüne dayanarak, bağlanma kapasitesini belirleme tekniği geliştirilmiştir. Özel olarak tasarlanmış hemato-florometre, bilirubinin hızlı bir şekilde mikro-tahlili için tam kanın floresan ölçümlerinden faydalanacak şekilde tasarlanmıştır. Konjuge olmayan serum bilirubin konsantrasyonlarının, dansile edilmiş BSA'nın statik floresanla söndürölmesine dayanan yeni ve hassas bir yöntem kullanılarak ölçölmesi de geliştirilmiştir (Nagaoka ve Cowger, 1979; Plavskii ve ark., 2008). Bu gelişmelerin üzerine bilirubin tayini için enzim bazlı fiber optik floresan biyosensörler, minyatür fiber optik biyosensörler, floresan sönmlemeyi temel alan sistemler ve probalar geliştirilmiştir.

Van den Bergh reaksiyonunu baz alarak geliştirilen spektrofotometrik yöntemlerle de bilirubinin miktarının ölçölmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Laterza ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemde, iki dalga boyunda (454 ve 540 nm) absorbansın ölçölümü sağlanmışır. Burada, bilirubin 454 nm'de, hemoglobin hem 454 hem de 528 nm'de eşit olarak soğurma göstermiştir. Bu nedenle, 528 nm'de absorbansın 454 nm'den çıkarılmasıyla elde edilen değerle bilirubin hesaplaması yapılmıştır (Laterza ve ark., 2002). Spektrofotometrik bilirubin tayin metotlarıyla bilirubin tayininde karşılaşılan bazı hata kaynakları vardır. Bu hata kaynaklarından birisi, bilirubinden farklı sarı renkli diğer bazı pigmentlerin de iterik indeksi etkilemesidir (Malloy ve Evelyn, 1937). 1958 yılında Fog renge dayalı ve diazo reaktifi yoluyla ölçölün bilirubin konsantrasyonları arasında ciddi bir fark olduğunu ortaya koymuştur. Spektrofotometrik yolla bilirubin tayini için diğer bir şüphe ise; terapötik seviyede kullanılan pek çok ilacın da bilirubinin absorpsiyon oranını etkileyerek hatalı sonuçların oluşmasına neden olmasıdır (Odell, 1959).

Lüminesans spektroskopisi, evanescent dalgaları veya fiber optik, moleküler baskı (MIP) teknikleri, piezoelektrik malzeme teknikleri (kuvars kristali mikrobals) ve bakım noktası test cihazı gibi teknikler ve geliştirilen cihazlarla bilirubinün daha hassas analizi için araştırmalar devam etmektedir.

2.4. UnaG Floresan Proteini ile Yapılmış Çalışmalar

Frederico M. Pimenta ve arkadaşları, singlet oksijen için faydalı bir probun yolunu açmak adına yaptıkları çalışmalarında, bilirubin bağlayan protein olarak UnaG'ın içerdiği $O_2(a^1\Delta g)$ ve bilirubin arasındaki etkileşimlerin ölçüm ve karakterizasyonunu inceleyerek göz önünde bulundurulması gereken parametreleri ortaya koymuşlardır (Pimenta ve ark., 2015).

Bilirubinün ölçülmesinin zorluklarından bahseden Taka-aki Takeda ve arkadaşları yaptıkları çalışmada UnaG proteinini kullanarak çeşitli insan hücre hatlarında bilirubin üretimini analiz etmişlerdir. Çalışmada, stres kaynaklı hücre hasarına karşın bilirubin üretiminin ve Heme de novo sentezinin vazgeçilmez sitoprotektif roller oynadığına değinilmiştir (Takeda ve ark., 2015).

Tsz-Leung To ve arkadaşlarının protein-protein etkileşimlerinin geri dönüşümlü bir florojenik muhabirinin yapı güdümlü tasarımı başlıklı çalışmasında, UnaG'ın kristal yapısına dayanarak, geri dönüşümlü bir yeşil florojenik protein fragmanı tamamlama deneyini geliştirmişlerdir (To ve ark., 2015).

Raghu Erapanedi ve arkadaşları hücresele düzeyde tümör hipoksisini ortaya koymak için yaptıkları çalışmada, oksijenden bağımsız olarak floresan özellik gösteren UnaG proteiniyle etiketlenmiş HIF transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tespit eden yeni genetik olarak kodlanmış bir sensör geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri sensörün hipoksik ve re-oksijenli hücrelerin ayrılmasını sağlayan kombinasyonları içerdiğini ve farklı hafıza davranışına sahip olduğunu yapılan çalışmada belirtmişlerdir (Erapanedi ve ark., 2015).

Alexander S. Timin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sol-jel yöntemiyle geliştirdikleri polimer-silika kompozitlerin üzerini UnaG proteini ile fonksiyonelleştirip bilirubin çözeltisiyle etkileştirildiğinde parlak bir floresan gösterdiğini belirtmişlerdir. Çalışma,

hibrit malzeme senteziyle bilirubinun tespiti ve ayrılması için kullanılacak çok işlevli nano boyutlu malzemelerin geliştirilmesinde atılan bir adım olarak gösterilmiştir (Timin ve ark., 2016)

Sota Iwatani ve diğerlerinin yaptığı çalışmada un-konjuge bilirubinun direk yöntemlerle ölçülemeyeceğini belirtip, UnaG ve konvansiyonel bilirubin oksidaz yöntemleriyle ölçülen konjuge olmayan bilirubin seviyelerini karşılaştırmak için doğrusal regresyon analizi yaparak UnaG yönteminin klinik uygulanabilirliğini göstermişlerdir (Iwatani ve ark., 2016).

Aki Funahashi ve arkadaşları, bilirubinle etkileştiğinde floresan özellik gösteren insan embriyonik böbrek hücrelerinde eksprese ettirdikleri proteinin oksidatif strese karşı dirençle ilişkisini, bilirubin ile birleştiğinde bağlanmayan serbest bilirubine kıyasla hücrelere antioksidan aktivite sağladığını belirterek açıklamışlardır (Funahashi ve ark., 2016).

Johannes T.-H. Yeh ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, organik bileşiklerin taşıyıcı ile bağlı içe veya dışa akışını tespit etmek için genetik olarak kodlanmış bir bilirubin (BR) ile bağlanabilir floresan sensörü (eUnaG) geliştirmişlerdir (Yeh ve ark., 2017).

Yoh Shitashima ve arkadaşları, floresan yoğunluğu dağılım analizi yaparak holoUnaG'ın holoUnaG1 ve holoUnaG2 olarak iki farklı floresan durumunun olduğunu yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Başlangıçta holoUnaG bilirubinle bağlandıktan sonra holoUnaG1'in oluştuğu ve daha sonra holoUnaG1'in ters çevrilebilir moleküler reaksiyon ile daha parlak holoUnaG2'ye dönüştüğü, böylece iki durum arasında bir dengeye ulaşıldığı yapılan çalışmada spektroskopik analizlerle göstermişlerdir (Shitashima ve ark., 2017).

Euihyun Lee ve arkadaşlarının çalışmasında, UnaG proteini üzerinde mutasyon yapmış ve ligand ve protein arasındaki yapısal korelasyonları göz önünde bulundurarak değişen protein stabilitesinin bilirubin ve protein arasında yakalanan su moleküllerinin hareketliliğini etkilediğini MD simülasyon (Molecular Dynamics Simulation) ile göstermişlerdir (Lee ve ark., 2018).

Samuel O. Adeosun ve arkadaşları bilirubinün vücuttaki en güçlü antioksidan moleküllerden biri olduğunu belirterek biliverdin aktivitesinin izlenmesi, hücrelerin ve dokuların antioksidan kapasitesinin çalışılmasının gerekliliğinden bahsetmişlerdir. Biliverdin aktivitesinin belirlenmesi, geleneksel yöntemler olan absorban spektroskopisi kullanılarak biliverdinden dönüştürülen bilirubinün ölçümüne dayandığını ve bu yaklaşımın hassasiyet sınırını, büyük miktarlarda hücre veya doku gerektirdiğini belirterek, çalışmalarında biliverdin tarafından üretilen bilirubinün tespiti için yılan balığı proteinini (UnaG) kullanan yeni bir floresan bazlı yöntem geliştirmişlerdir (Adeosun ve ark., 2018).

Hanyang Hu ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada, diğer GFP benzeri floresan proteinlerin kullanıldığı sensörlerin neredeyse tamamının, biyomedikal araştırmalardaki uygulamalarını sınırlayacak şekilde hipoksi veya anoksik koşullar altında doğru şekilde olgunlaşmadığını ve floresan özellik gösteremediğini belirterek Japon yılan balığından yeni keşfedilen oksijenden bağımsız floresan özellik gösteren UnaG proteinine dayalı bir dizi tiyol redoks duyarlı yeni bir sensör tasarımı sunduklarını belirtmişlerdir (Hu ve ark., 2018).

Yoh Shitashima ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kalmodulinin (CaM) bilirubin bağlandığında floresan özellik gösteren UnaG'a genetik olarak yerleştirilmesiyle kalsiyum iyonlarına duyarlı hale gelen bir sensör geliştirmişlerdir. Elde edilen UnaG/CaM hibrit proteininin, çift ligand modüle edilebilir bir flüoresan protein olduğunu ve florojenik bilirubin ligandının bağlanmasıyla diğer ligand (Ca^{+2}) negatif olarak düzenlendiğini çalışmalarında göstermişlerdir (Shitashima ve ark., 2018).

3. MATERYAL VE METOT

Tez çalışmasının deneysel kısmı, yabancı tip UnaG floresan proteininin ekspresyon, ayırma ve saflaştırma süreçleri, mutasyon çalışmaları, elde edilen varyantların ekspresyon, ayırma ve saflaştırma süreçleri ve üretilen proteinlerin biyofiziksel karakterizasyon çalışmaları olarak alt başlıklara ayrılmıştır. Yapılan tüm çalışmalar aşağıda başlıklar halinde adım adım anlatılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan sarf malzemelerin listesi Çizelge 3-1’de verilmiştir.

Çizelge 3-1 Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Maddenin Adı	Marka-Model	Maddenin Adı	Marka-Model
Luria Bertani (LB)	Sigma Aldrich	Cs ⁺	Alfa Aesair
Ampisilin	Fisher	Cu ⁺²	Acros Organic
Kloramfenikol	VWR	Fe ⁺²	Acros Organic
Agar-Agar	Sigma Aldrich	Hg ⁺²	Merk
L-Arabinoz	Amresco	Li ⁺	Sigma Aldrich
IPTG	GoldBio	Mg ⁺²	Merk
SDS	Sigma Aldrich	Na ⁺	Merk
APS	Sigma Aldrich	Ni ⁺²	Sigma Aldrich
TEMED	Sigma Aldrich	Phusion® DNA Polymerase & PCR kit	BioLabs
Tris	Sigma Aldrich	Agaroz	Sigma Aldrich
Brom fenol mavisi	Sigma Aldrich	Etidyum bromür	Sigma Aldrich
Komasi Mavisi	Sigma Aldrich	DNA markörü	HyperLadder
Akrilamid	Sigma Aldrich	DNA jel ekstraksiyon kiti	Monarch
Glisin	Sigma Aldrich	SLIC kiti	Takara Bio
Asetik asit	Sigma Aldrich	Kompetant Hücreler	Takara Bio
İso-propanol	Sigma Aldrich	SOC Medyum	BioLabs
Benzamidin	Sigma Aldrich	Nucleospin plazmid DNA saflaştırma kiti	Macherey-Nagel
PMSF	Roche	Trombin kesim enzimi	Merck (Novagen)
DNase enzimi	Roche	Nitroselüloz membran	
RNase enzimi	Roche	Metanol	Sigma Aldrich
Ni-NTA Agaroz Rezin	Qiagen	TBS tamponu (KCl, Tris, NaCl)	Sigma Aldrich

TALON Metal Afinite Rezin	Takara Bio	CAPS tamponu	Sigma Aldrich
İmidazol	Alfa Aesair	Geliştirme Tamponu (Tris, NaCl, Na ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich
Protein Ladder	Biorad	Western Blot kağıtları	Sigma Aldrich
Fosfat Tamponu (NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄)	Sigma Aldrich	Ponseau S	Sigma Aldrich
Tris-HCl Tamponu	Sigma Aldrich	PBS tamponu (NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich
Diyaliz Membranı	Spektra Por	Yağsız Süt tozu	BioRad
Bilirubin	Sigma Aldrich	4-chloronathol	Sigma Aldrich
NaOH	Sigma Aldrich	6*His Monoclonal Antibody	Cusabio Technology
Al ⁺³	Merk	Anti-Mouse IgG	Sigma Aldrich
Ba ⁺²	Acros Organic	H ₂ O ₂	Sigma Aldrich
Ca ⁺²	Sigma Aldrich	Etanol	Sigma Aldrich
Co ⁺²	Merk	Quartz cam küvet	Hellma

3.1. Yabanıl Tip UnaG Proteininin Ekspresyonu

3.1.1. Transformasyon

UnaG proteininin *E.coli* pTolT ekspresyon sisteminde TolAIII proteini ile birlikte füzyon olarak yapılması tercih edilmiştir (Ulus, 2019). Yabanıl tip pTolT-UnaG plazmitini çoğaltmak için transformasyon yapılmıştır. Transformasyon için *E.coli* Mach-1 kimyasal kompetant hücreleri kullanılmıştır. 50 µL kompetant hücre ve 4 µL plazmid aynı tüp içerisine eklenmiştir. Tüp buz içerisine 30 dakika süre boyunca bırakılmıştır. Sonrasında 42°C’de 2 dakika ısı şoku uygulanıp, tekrar 5 dakikalığına buza bırakılmıştır. Üzerine steril 500 µL LB (Luria Bertani) besi yeri eklenip 45 dakika 37°C’de 180 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda transforme hücrelerden 200 µL alınıp Amp (Ampisilin 100mg/mL, 1:1000)’li katı besi yerine yayma ekim yapılıp gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün oluşan tek koloniler 4 mL steril Amp’li LB besi yerlerine alınıp gece boyu inkübasyona bırakılıp, ertesi gün plazmid DNA saflaştırma kiti kullanılarak plazmid izolasyonu yapılmıştır.

3.1.2. Konakçı hücre optimizasyonu

Konakçı hücre optimizasyonu için üç farklı hücre hattına transformasyon yapılmıştır. Transformasyon için *E.coli* C41, *E.coli* BL21 (DE3) AI ve *E.coli* BL21 (DE3) plysE kimyasal kompetant hücreleri kullanılmıştır. 50µL kompetant hücrelerden ve 2µL plazmitten aynı tüp içerisine eklenmiştir. Tüpler buz içerisnde 30 dakika bekletilmiştir. Sonrasında 42°C’de 2 dakika ısı şokuna maruz bırakılıp tekrar 5 dakikalığına buza bırakılmıştır. Üzerine steril 500 µL LB besi yeri eklenip 45 dakika 37°C’de 180 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda transforme hücrelerden 200 µL alınıp *E.coli* C41 ve *E.coli* BL21 (DE3) AI için Amp (1:1000), *E.coli* BL21 (DE3) plysE için hem Amp (1:1000) hem de Chl (Kloramfenikol 100mg/mL, 1:1000) antibiyotiklerini içeren katı besi yerlerine yayma ekim yapılp gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün oluşan tek koloniler 4 mL steril ve uygun antibiyotik/leri içeren LB besi yerlerine alınıp gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. 250 mL erlen içerisnde hazırlanan 50 mL LB besi yerleri steril edildikten sonra uygun antibiyotikler eklenip, bir gece önceden inkübasyona bırakılan 4 mL’lik kültür tüplerinden inokülasyon yapılmıştır. Erlenler 180 rpm’de 37°C’de OD (optik dansite) 0,7 olana kadar inkübasyona bırakılmıştır. OD 0,7’ye ulaştığında *E.coli* C41 ve *E.coli* BL21 (DE3) plysE için 1M 50 µL IPTG (izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit) ile indüklemesi yapılırken *E.coli* BL21 (DE3) AI’nın indüklenmesi 1M 100 µL L-Arabinoz ile yapılmıştır. Saatte bir örnek alınarak protein üretimi SDS PAGE ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4-2).

Şekil 4-2’ye göre protein ifade çalışmalarına *E.coli* C41 ile devam edilmiştir. Tekrar *E.coli* C41 kimyasal kompetant hücrelerine transformasyon yapılmıştır. *E.coli* C41’de büyük ölçekte üretim yapmak için 50 µL kompetant hücre ve 2 µL plazmid aynı tüp içerisine eklenmiştir. Tüp buz içerisine 30 dakika süre boyunca bırakılmıştır. Sonrasında 42°C’de 2 dakika ısı şokuna maruz bırakılıp tekrar 5 dakikalığına buza bırakılmıştır.

Üzerine steril 500 µL LB besi yeri eklenip 45 dakika 37°C’de 180 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda transforme hücrelerden 200 µL alınıp Amp (1:1000)’li katı besi yerine yayma ekim yapılp gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün oluşan tek koloniler 50 mL steril Amp’li LB besi yerlerine alınıp gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Bir gece önce inkübasyona bırakılan 50 mL besi yeri içerinde

gelişen hücreler 4200 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıp toplanmıştır. Süpernatant dökülüp pellet üzerine 5 mL steril taze LB besi yeri eklenmiş ve hücreler süspansiyon haline getirilip inokülant olarak kullanılmıştır. 2 L erlen içerisinde hazırlanan 500 mL LB besi yerleri (10 adet) steril edildikten sonra 500 µL Amp ve 800 µL inokülant eklenmiştir. Erlenler 180 rpm'de 37°C'de OD 0,7 olana kadar inkübasyona bırakılmıştır. OD 0,7'ye ulaştığında 500 µL IPTG (1:1000) ile indüklemesi yapılmıştır. Saatte bir örnek alınarak protein üretimi SDS PAGE ile takip edilmiştir (Şekil 4-3). İndüklemenin 3. saatinde 30 dakika, 8000 rpm santrifüj yapıp süpernatant döküldükten sonra hücreler yükleme tamponu ile süspansiyon edilip toplanmıştır. Şekil 4-3'de görüldüğü üzere, protein ekspresyonu için 3 saatlik bir indüksiyon yapılmasının ardından alınan hücre örneklerinde proteinin eksprese edildiği anlaşılmış ve bu sayede saflaştırma işlemlerine geçiş sağlanmıştır.

3.1.3. Yabancıl tip UnaG proteininin ayırma ve saflaştırma süreçleri

Ayırma saflaştırma işlemleri için süspansiyon hücrelerin üzerine proteaz inhibitörü olarak benzamidin ve PMSF eklenmiştir. DNA ve RNA kontaminasyonunu engellemek için DNase ve RNase enzimleri eklenmiştir. Hücrelerin daha iyi parçalanmasını sağlamak için lizozim enzimi ilave edilip, karıştırılmıştır. Proteinin stabilitesini sağlamak için PMSF ve benzamidin proteaz inhibitörü olarak kullanılmıştır ve bütün işlemler buzda yapılmıştır. Sonikatör cihazı ile hücrelerin parçalanması sağlandıktan sonra 40000 rpm'de 1 saat +4°C'de santrifüj edilmiştir. Saflaştırma işlemi için 4 mL Ni-NTA agaroz rezin içeren kolon hazırlandıktan sonra ultrasantrifüjden elde edilen süpernatant kolona transfer edilip, kolondan geçirilmesi sağlanmıştır. Kolondan geçirilen her fraksiyon etiketlenerek saklanmıştır. Süpernatantın tamamı kolondan geçtikten sonra 20 mL yükleme tamponu kolondan geçirildikten sonra 2 kere 20'şer mL yıkama tamponu ile kolon yıkanmıştır. Son olarak 5 mL elüsyon tamponu ile proteinin toplanması sağlanıp her fraksiyondan örnek alınıp SDS PAGE ile analiz edilmiştir (%12'lik jel, Ladder: Biorad Precision Plus Protein™ Standards) (Şekil 4-4). Saflaştırılan yabancıl tip UnaG proteini, 20mM fosfat tamponu hazırlanıp, 6-8 kDa MWCO membran kullanılarak hafta sonu boyunca +4°C'de diyalize bırakılmıştır (Ulus, 2020).

3.2. Yabancıl Tip UnaG Proteininin Geri Kazanımı ve Yeniden Kullanılabilirliği

Protein ve metal iyonları (Al^{+3} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Cs^{+} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Li^{+} , Mg^{+2} , Na^{+} ve Ni^{+2}) bir tüp içerisinde birleştirildikten sonra, protein metal etkileşimleri SDS PAGE ile gösterilmiştir. Saflaştırılmış UnaG proteinine endojen bir ligand olan unkonjuge bilirubin ilave edilmiştir. Floresan ışığa oluştuktan sonra, farklı tüplere eşit miktarlarda UnaG-UC-BR floresan karışımı ve $2 \times 10^{-7} M$ konsantrasyona sahip metal iyonlarından eklenmiştir. Floresans spektroskopisinde her bir metal için ayrı ayrı oluşan protein-bilirubin-metal (UnaG-UC-BR-Metal) kompleksinin floresan yoğunluğu ölçülmüştür (λ_{ex} : 498, λ_{em} : 528). Floresan ışığa değişimleri UV ışık altında da gösterilip, UV-Vis spektrada absorban ölçümleri yapılarak oluşan etkileşimler gösterilmiştir.

Floresans spektroskopisi ve SDS PAGE jel görüntülerinden elde edilen verilere dayanarak Cu^{+2} metal iyonu geri kazanım çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Cu^{+2} metal iyonları ile UV-Vis titrasyon çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan Ni-NTA agaroz afinite kolonuna UnaG-UC-BR-Cu kompleksi yüklendikten sonra geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanılan UnaG proteini, SDS PAGE ile analiz edilmiştir. Yeniden kullanılabilirlik için, mikro hacimli spektrofotometrede konsantrasyonu ölçüldükten sonra geri kazanılan UnaG proteinine bilirubin ilave edilmiştir. Floresans spektroskopisi ile floresan yoğunluğu ölçülüp Cu^{+2} metal iyonları ile yeniden floresan titrasyon çalışmaları da yapılmıştır.

3.3. Mutasyon Çalışmaları

UnaG proteininin amino asit sekansı aşağıdaki gibidir. Renklendirilmiş olanlar mutasyon yapılması tasarlanan amino asitler olup planlanan mutasyonlara ait kimyasal yapı değişimleri Ek-A'da verilmiştir. Bu noktalardan birinde veya aynı anda ikisinde olmak üzere tasarlanan mutasyonlar etkin bir yöntem olan SLIC yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Met V E K F V G T **W** K I A D S H N **F** G E Y L K A I G A P K E L S D G G D A **I** T P
T **L** Y I S Q K D G D K M T V K I E N **G** P P T **I** F L D T Q V K F K L G E E F D E F P
S D R R K G V K S V V N L V G E K L V **Y** V Q K **W** D G K E T T Y V **R** E I K D G
K L V V T L T M G D V V A V **R** S **Y** R R A T E Stop

Tek bir amino asidin değişikliğini içerecek şekilde tasarlanan mutasyonlar için sadece İleri ve Geri olmak üzere her bir varyant için ayrı ayrı primer tasarımı yapılmış olup, tasarlanan primerler değişmesi planlanan mutasyonu da içerisinde barındırmaktadır (Çizelge 3-7 & 3-8). Yani mutasyon bölgesi primerin içerisinde yer almaktadır. Kalıp DNA olarak pTolT-UnaG plazmiti kullanılmıştır.

İki ayrı amino asidin aynı anda değiştirilmesi yönünde tasarlanan mutasyonlarda ise tek bir İleri ve Geri primerler ve ayrı ayrı mutasyonları içerisinde barındıran insörtler tasarlanmıştır (Çizelge 3-3 & 3-9 & 3-10). Kalıp DNA olarak pTolT plazmiti kullanılarak bu insörtlerin yine SLIC yöntemi ile vektöre klonlaması gerçekleştirilmiştir.

- ❖ Klonlama çalışmaları için ilk olarak liyofilize primerler ve insörtler üretici firma tarafından önerilen miktarlarda DNase-RNase içermeyen su ile çözülmüştür. Eklenen su ile primerlerin konsantrasyonları 100pmol/μL olarak ayarlanmıştır. 10mM konsantrasyonunu elde etmek için 1:10 oranında seyreltilerek klonlama işlemlerinde kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3.1. Tekli mutasyonlar için yapılan SLIC prosedürü

Tekli mutasyonlar için yapılan SLIC prosedürü dört basamakta gerçekleştirilmiştir.

➤ İlk basamak olarak PCR reaksiyonu (Çizelge 3-2) ile plazmitin (pTolT-UnaG) lineerleştirilmesi yapılmıştır. Öncelikle düşük hacimde (20 μL) gradient PCR yapılarak primerler ve polimeraz enzimi için uygun çalışma sıcaklığı (annealing temperature) belirlenmiştir. Kalıp DNA olarak pTolT-UnaG plazmiti kullanılıp 50-70°C aralığında gradient PCR, “PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase” protokolüne göre yapılmıştır. Primerlerin T_m sıcaklıkları arasında çok büyük farklılık olmadığı için tek bir gradient PCR seti kurulup, buradan elde edilen sonuçla diğer PCR setlerinin yapılması planlanmış ve bu nedenle gradient PCR tek bir mutasyon için uygulanmıştır. İleri ve geri primerin nükleotid eşleşmesi Şekil 3-1A’da gösterilmiştir.

Çizelge 3-2 Tekli mutasyonlar için gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait protokol

Bileşen	20 µL Reaksiyon	50 µL Reaksiyon	Son Konsantrasyon
Nükleaz içermeyen su	20 µL'ye kadar	50 µL'ye kadar	
5X Phusion HF veya GC Tamponu	4 µL	10 µL	1 X
10 mM dNTPs	0,4 µL	1 µL	200 µM
10 µM İleri Primer	1 µL	2,5 µL	0,5 µM
10 µM Geri Primer	1 µL	2,5 µL	0,5 µM
Kalıp DNA	Değişken	Değişken	<250 ng
DMSO	0,6 µL	1,5 µL	%3
Phusion DNA Polimeraz	0,2 µL	0,5 µL	1,0 units/50 µL PCR
Adım	Sıcaklık		Süre
Başlangıç Denatürasyon	98°C		30 saniye
25-35 Döngü	98°C		5-10 saniye
	45-72°C		10-30 saniye
	72°C		15-30 saniye
Son Uzama	72°C		5-10 dakika
Bekleme	4-10°C		∞

➤ İkinci aşama olarak agaroz jel ve ekstraksiyonu yapılmıştır. Gradient PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve en parlak bandın 70°C olduğu görülmüştür (Şekil 4-13). Bu sıcaklığa göre aynı protokolle her bir tek nokta mutasyon için (6 adet) yüksek hacimde (50 µL) yeni klasik PCR çalışması yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra (Şekil 4-14) DNA jel ekstraksiyon kiti (Monarch) kullanılarak lineerleştirilen plazmitler jelden alınmış ve mikro hacimli spektrofotometrede konsantrasyonları ölçülmüştür (Çizelge 4-1).

❖ Monarch DNA ekstraksiyon kiti prosedürü;

Elde edilen jel UV görüntüleme cihazı üzerine yerleştirildikten sonra sadece bant görülen kısımlar bisturi ile kesilerek alınıp ve tartılmıştır. Üzerine 4 katı kadar jel çözme tamponu eklenerek 55°C'de yaklaşık 15 dakika çözünmesi beklendikten sonra saflaştırma kolonuna aktarılmış ve 13000rpm de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Üzerine DNA yıkama tamponu eklenmiş ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Son olarak 10 µL DNase-RNase içermeyen ılık su ile elüsyon yapılmıştır.

➤ Üçüncü aşamada SLIC reaksiyonu uygulanmıştır. Her bir tekli mutasyon için jelden saflaştırılan lineer DNA parçalarının konsantrasyonları elüsyon solüsyonu ile 100 ng/μL olacak şekilde seyreltilmiştir. Her bir mutasyonda SLIC reaksiyonu için; 1 μL saflaştırılan DNA, 1 μL 10x NEB buffer, 8 μL steril di-distile su ve 0,5 μL T4 DNA polimeraz enzimi buz içerisindeki reaksiyon tüplerine eklenmiştir. Oda sıcaklığına alınıp iki buçuk dakika bekletilip reaksiyonu durdurmak için tekrar buz ortamına alınmıştır.

➤ Son aşama olarak, halkasal hale gelen plazmitlerin ticari olarak alınan *E.coli* Mach1 kompetant hücrelerine 42°C’de 2 dakika uygulanan ısı şoku yöntemiyle transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon ürünlerinin antibiyotikli (Amp) katı besi yerine yayma ekimi yapıldıktan sonra gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün petrilerde oluşan koloniler alınıp 10 μL steril saf su içerisinde çözülüp kolonilerdeki plazmitlerin doğruluğunu test etmek için Çizelge 3-6’da verilen miktarlar doğrultusunda koloni PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jel görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4-16).

Koloni PCR sonuçları pozitif olan kolonilerin 5ml’lik antibiyotikli LB sıvı besi yerine ekimleri yapıp, 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Nucleospin plazmid DNA saflaştırma kiti (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak plazmitler saflaştırılıp konsantrasyonları mikro hacimli spektrofotometrede ölçülmüştür (Çizelge 4-1).

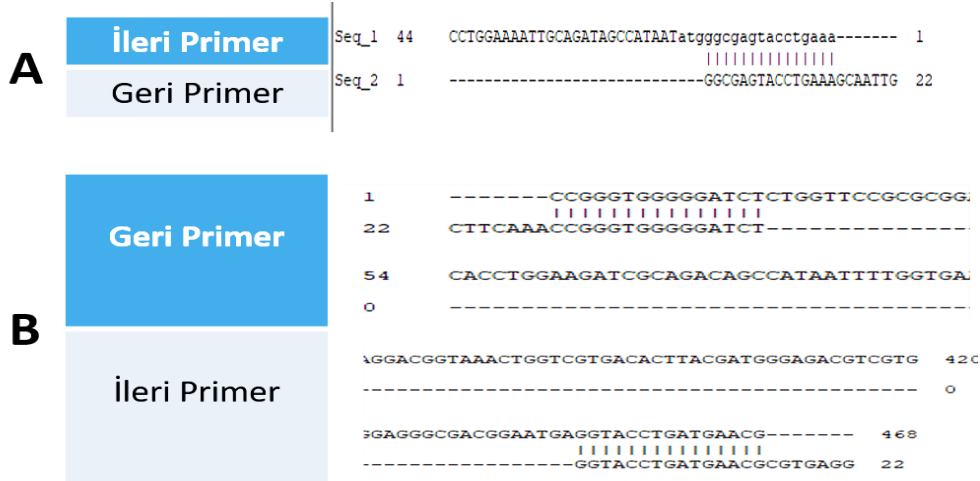
3.3.2. İkili mutasyon çalışmaları

Çizelge 3-3’de ikili nokta mutasyonda kullanılmak üzere dizayn edilen primerler ve erime sıcaklıkları verilmiştir. Tüm ikili mutasyonlarda bu primerler kullanılmış olup primer dizaynı, SLIC yöntemine uygun olarak yapılmıştır.

Çizelge 3-3 İki nokta mutasyonları için tasarlanan primerler

Çiftli mutasyon	
İleri primer	GGTACCTGATGAACGCGTGAGG (T _m =58°C)
Geri primer	AGATCCCCCACC CGTTTGAAG (T _m =58°C)

İnsört ve toplam 22 nükleotidden oluşan primerlerin nükleotid eşleşmesi Şekil 3-1B’de verilmiş olup primerlerin nükleotidlerinden 15’er tanesi primer nükleotid eşleşmesine katılmıştır.



Şekil 3-1 A. Tek nokta mutasyonlar için tasarlanan primerlerin birbiriyle nükleotid eşleşmesi, **B.** İki nokta mutasyonlar için tasarlanan primerlerin insörtle nükleotid eşleşmesi

İkili nokta mutasyonları için SLIC reaksiyonu dört adımda gerçekleştirilmiştir.

- İki noktada mutasyon içeren plazmitleri elde etmek için sipariş edilen insörtlerin SLIC metodu ile klonlanması amacıyla tasarlanan primerler kullanılarak PCR ile pTolT plazmiti lineer hale getirilmiştir. Plazmitin (pTolT) lineerleştirilmesi için tasarlanan ileri ve geri primerler ile (100 µL) PCR yapılmış olup PCR bileşenleri ve süreçleri Çizelge 3-4 de verilmiştir. PCR ürünlerini saflaştırmak amacıyla öncelikle PCR ürünleri agaroz jele yüklenmiştir.

Çizelge 3-4 İkili nokta mutasyonlar için gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarına ait protokol

Bileşen	100 µL Reaksiyon	Son Konsantrasyon
Nükleaz içermeyen su	55 µL	
5X Phusion HF veya GC Tamponu	20 µL	1 X
10 mM dNTPs	10 µL	200 µM
10 µM İleri Primer	5 µL	0,5 µM
10 µM Geri Primer	5 µL	0,5 µM
Kalıp DNA	1 µL	<250 ng
DMSO	3 µL	%3
Phusion DNA Polimeraz	1 µL	1,0 units/50 µL PCR
Adım	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyon	98°C	3 dakika
35 Döngü	98°C	10 saniye
	70°C	30 saniye
	72°C	150 saniye
Son Uzama	72°C	10 dakika
Bekleme	4°C	∞

- İkinci aşama olarak agaroz jel ve ekstraksiyonu yapılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra (Şekil 4-15) DNA jel ekstraksiyon kiti (Monarch) kullanılarak lineerleştirilen plazmitler jelden alınıp, mikro hacimli spektrofotometrede konsantrasyonları ölçülmüştür (32 ng/μL).
- Aşağıdaki çizelgede (Çizelge 3-5) belirtilen miktarlar her bir ikili mutasyon için ayrı ayrı, buz içerisindeki ependorf tüplerinde birleştirildikten sonra her bir tüpe 0,5 μL T4 DNA polimeraz (3U/μL, NEB) enzimi eklenmiştir. 2,5 dakika boyunca oda sıcaklığında reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandıktan sonra süre bitiminde reaksiyonu durdurmak için tüpler tekrar buz içine alınıp on dakika beklenmiştir.

Çizelge 3-5 SLIC reaksiyonu bileşenleri

	Eklene miktar	Son konsantrasyon
Lineer vektör	2,5 μL	8 ng/μL
İnsört	2,5 μL	5 ng/μL
10X NEB Buffer 2.1	1 μL	1X
Steril Ultra saf Su	4 μL	

- Son aşama olarak, on dakikanın ardından halkasal hale gelen plazmitlerin ticari olarak alınan *E.coli* NEB Turbo kompetant hücrelerine 42°C'de 2 dakika uygulanan ısı şoku yöntemiyle transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon ürünlerinin antibiyotikli (Amp) katı besi yerine yayma ekimi yapıldıktan sonra, petriyer gece boyu 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün petriyerde oluşan kolonilerden alınıp 10 μL steril saf su içerisinde çözüldükten sonra kolonilerdeki plazmitlerin doğruluğunu test etmek için Çizelge 3-6'de verilen miktarlar doğrultusunda koloni PCR yapılmıştır.

*** SLIC yöntemi ile yapılan mutasyonların son aşaması olan transformasyonda ısı şoku uygulamasından sonra uygulanan 45 dakikalık inkübasyon işleminde, üretim veya plazmid çoğaltmak için yapılan transformasyondan farklı olarak LB sıvı besi yerine SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) besi yeri kullanılmıştır.

Çizelge 3-6 Koloni PCR bileşenleri ve PCR metodu

Bileşen	20 µL Reaksiyon	Son Konsantrasyon
Nuclease-free water	10,2 µL	
5X GC Buffer	4 µL	1 X
10 mM dNTPs	2 µL	200 µM
10 µM İleri Primer	1 µL	0,5 µM
10 µM Geri Primer	1 µL	0,5 µM
Kalıp DNA	1 µL	
DMSO	0,6 µL	%3
Phusion DNA Polymerase	0,2 µL	1,0 units/50 µL PCR
Adım	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyon	98°C	30 saniye
35 Çevrim	98°C	10 saniye
	50°C	30 saniye
	72°C	30 saniye
Son Uzama	72°C	10 dakika
Bekleme	4°C	∞

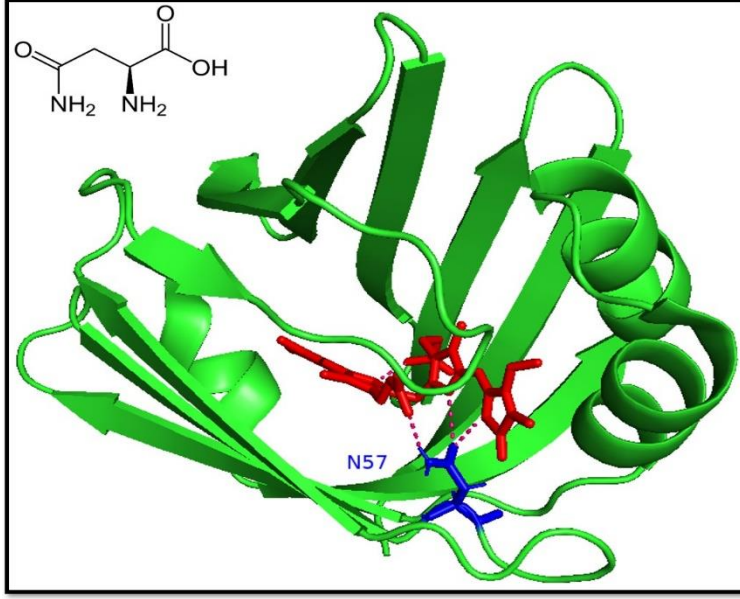
PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülüp jel görüntüsü kaydedilmiştir (Şekil 4-16). Koloni PCR sonuçları pozitif çıkan kolonilerin 5ml'lik antibiyotikli LB sıvı besi yerine ekimleri yapıp, plazmid izolasyonu için koloniler 37°C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Monarch plazmid DNA saflaştırma kiti kullanılarak plazmitler saflaştırılıp konsantrasyonları mikro hacimli spektrofotometrede ölçülmüştür (Çizelge 4-2).

3.3.3. Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesi

Kumagai ve ark. (2013) tarafından keşfedilen N57'de yapılan Q ve A mutasyonlarının bilirubin bağlanması açısından önemli olduğu çalışmada vurgulanmıştır. Tez kapsamında ise Arg, Asp ve/veya Glu gibi diğer bazı polar amino asit grupları bu bölgeye ilave edilmiştir. Çizelge 3-7'de bu bölge için tasarlanan mutasyonlara ait primerler mevcuttur.

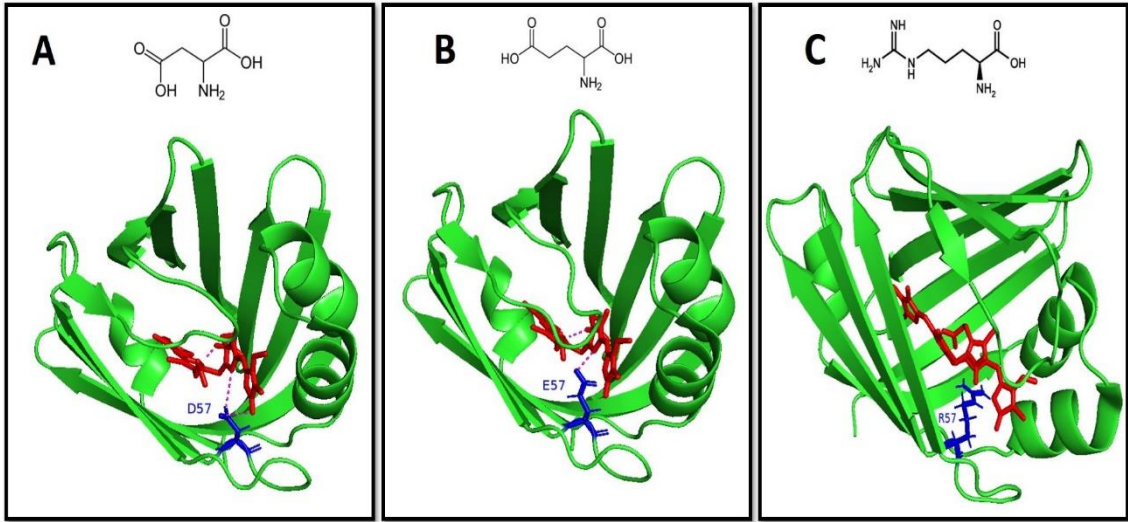
Çizelge 3-7 Polar amino asit grupları için tasarlanan primerler

Mutasyon	İleri Primer	Geri Primer
N57D	GGACCTCCTACGT TCCTTG (T _m =53°C)	GAACGTAGGAGGTCCATCCTCTATT TTCACGTGTCATTTTGTC (T _m =66°C)
N57E	GGACCTCCTACGT TCCTTG (T _m =53°C)	GAACGTAGGAGGTCC TTC CCTCTATT TTCACGTGTCATTTTGTC (T _m =66°C)
N57R	GGACCTCCTACGT TCCTTG (T _m =53°C)	GAACGTAGGAGGTCC TCT CCTCTATT TTCACGTGTCATTTTGTC (T _m =66°C)



Şekil 3-2 Yabani tip UnaG proteini üzerinde asparajin57 amino asidinin gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)

Şekil 3-2’de yabani tip UnaG proteinin üç boyutlu gösteriminde asparajin57 amino asidinin yeri gösterilmiştir. Tasarlanan mutasyonlar tam bu noktada asparajin57’nin aspartik asit (D), glutamik asit (E) veya arjinin (R)’e değiştirilmesini kapsamaktadır. Her üç değişiklik de ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3-3 Yabani tip UnaG proteini üzerinde asparajin57 amino asidinin **A.** aspartik asit (D), **B.** glutamik asit (E) ve **C.** arjinin (R)’e değiştirildikten sonra gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)

Asparajin57’nin aspartik asit (D), glutamik asit (E) ve/veya arjinin (R)’e değiştirildikten sonra varyant UnaG proteinlerinin gösterimi 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak Şekil 3-3’te verilmiştir.

3.3.4. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi

Aromatik rezidülerin ışığı absorbe etmeleri ve p elektronları vasıtasıyla polar kontak sağlamaları (veya bu rezidünün Tyr olması halinde –OH grubundan dolayı) ligand bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesini içeren bazı mutasyonlar yapılmıştır. Bunlar;

- F17'nin Tyr (polaritenin emisyon üzerine olan etkilerini görebilmek için) veya Met (aromatikliğin önemli olup olmadığını görebilmek için) ile değiştirilmesini içeren mutasyonlar,
- Y99 ve Y134'ün Phe/Trp (polarite ve absorpsiyonun emisyonu etkileyip etkilemediğini görebilmek için) veya Met (aromatikliğin önemli olup olmadığını görebilmek için) ile değiştirilmesini içeren mutasyonlar,
- L40'ın Phe ile değiştirilmesini içeren mutasyon (aromatikliğin önemli olup olmadığını görebilmek için),
- W9 ve W103'ün (bu bölge ligand etkileşim bölgesine yakın bir alanda değildir) Phe ile değiştirilmesini içeren mutasyonlar (büyük miktarda absorblama yapan ve floresan olan, emisyonu indirekt olarak etkileme ihtimali bulunan yan zincirin kaldırılması için) gerçekleştirilmiştir.

Bu bölgelerde mutasyonlar yapmak için, Çizelge 3-8'de tasarlanan mutasyonlara ait primerler ve Çizelge 3-9'da tasarlanan mutasyonlara ait insörtler verilmiştir.

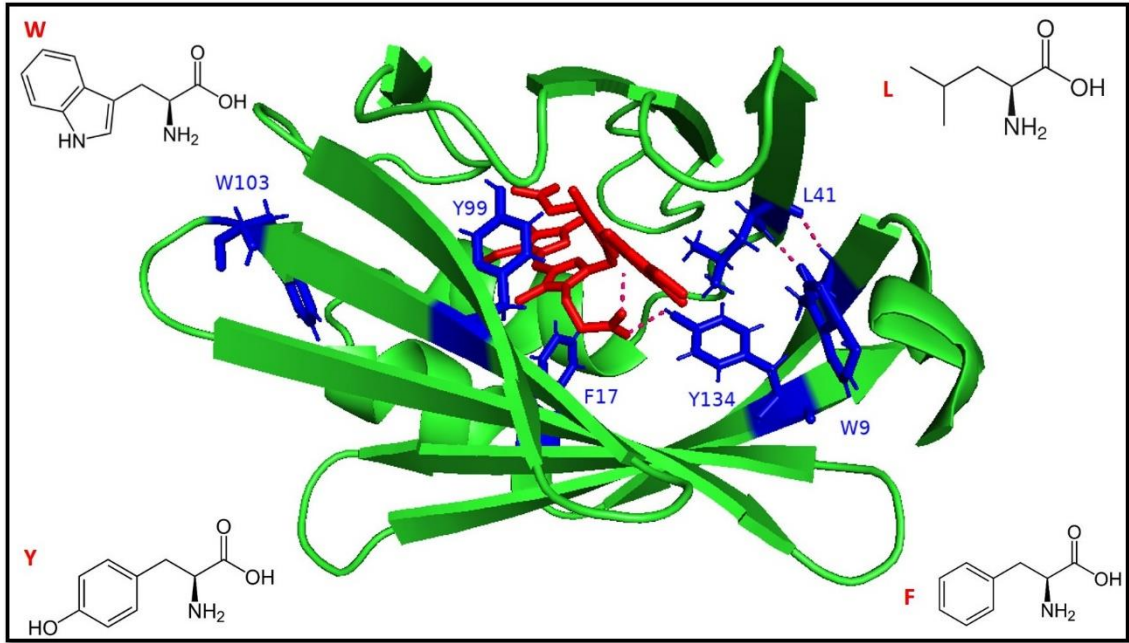
Çizelge 3-8 Aromatik rezidülerin değiştirilmesi için tasarlanan primerler

Mutasyon	Geri Primer	İleri Primer
F17Y	GGTGAATACCTGAA AGCTATCG (T _m =53°C)	TTTCAGGTATTCACCATAATTATG GCTGTCTGCGATCTTC (T _m =64,5°C)
F17M	GGTGAATACCTGAA AGCTATCG (T _m =53°C)	TTTCAGGTATTCACCCATATTATG GCTGTCTGCGATCTTC (T _m =65,5°C)
L41F	ACATCTCCCAGAAG GACGG (T _m =53°C)	CTTCTGGGAGATGTAAAATGTCGG CGTCGTGGCATC (T _m =67°C)

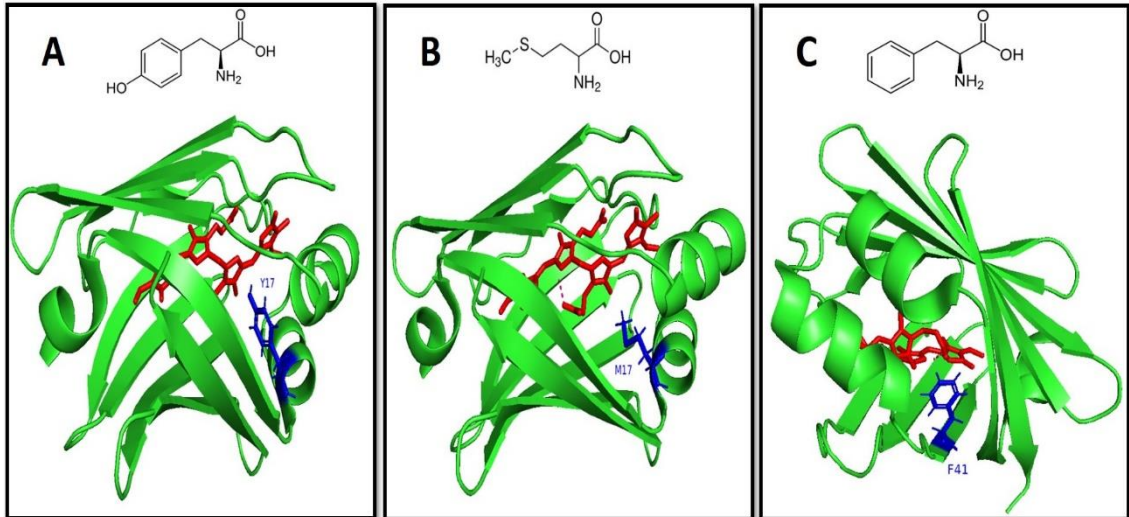
Çizelge 3-9 Aromatik rezidülerin değiştirilmesi için tasarlanan insörtlere

Mutasyon	İnsert
Y99F_Y134W	CCGGGTGGGGGATCTCTGGTTCCGCGCGGATCCATGG TCGAGAAATTTGTTGGCACCTGGAAGATCGCAGACAG CCATAATTTTGGTGAATACCTGAAAGCTATCGGAGCC CCAAAGGAATTAAGCGATGGTGGGGATGCCACGACG CCGACATTGTACATCTCCCAGAAGGACGGAGACAAAA TGACAGTGAAAATAGAGAATGGACCTCCTACGTTCT TGACACTCAAGTAAAGTTCAAATTAGGGGAGGAGTTC GACGAATTTCTTCTGATCGAAGAAAAGGCGTAAAAT CTGTCGTGAACTTGGTGGGAGAGAAGCTGGTGT TTT GT ACAAAAGTGGGACGGCAAGGAGACGACGTATGTCCG AGAGATAAAGGACGGTAAACTGGTCGTGACACTTACG ATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCGCAGC TGG CGGAGG GCGACGGAATGAGGTACCTGATGAACG
Y99M_Y134M	CCGGGTGGGGGATCTCTGGTTCCGCGCGGATCCATGG TCGAGAAATTTGTTGGCACCTGGAAGATCGCAGACAG CCATAATTTTGGTGAATACCTGAAAGCTATCGGAGCC CCAAAGGAATTAAGCGATGGTGGGGATGCCACGACG CCGACATTGTACATCTCCCAGAAGGACGGAGACAAAA TGACAGTGAAAATAGAGAATGGACCTCCTACGTTCT TGACACTCAAGTAAAGTTCAAATTAGGGGAGGAGTTC GACGAATTTCTTCTGATCGAAGAAAAGGCGTAAAAT CTGTCGTGAACTTGGTGGGAGAGAAGCTGGTGT ATGG T ACAAAAGTGGGACGGCAAGGAGACGACGTATGTCCG AGAGATAAAGGACGGTAAACTGGTCGTGACACTTACG ATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCGCAGC ATG CGGAGG GCGACGGAATGAGGTACCTGATGAACG
W9F_W103F	CCGGGTGGGGGATCTCTGGTTCCGCGCGGATCCATGG TCGAGAAATTTGTTGGCACCT TTT AAGATCGCAGACAG CCATAATTTTGGTGAATACCTGAAAGCTATCGGAGCC CCAAAGGAATTAAGCGATGGTGGGGATGCCACGACG CCGACATTGTACATCTCCCAGAAGGACGGAGACAAAA TGACAGTGAAAATAGAGAATGGACCTCCTACGTTCT TGACACTCAAGTAAAGTTCAAATTAGGGGAGGAGTTC GACGAATTTCTTCTGATCGAAGAAAAGGCGTAAAAT CTGTCGTGAACTTGGTGGGAGAGAAGCTGGTGTACGT ACAAAAG TTT GACGGCAAGGAGACGACGTATGTCCG AGAGATAAAGGACGGTAAACTGGTCGTGACACTTACG ATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCGCAGCTACCGGAGGG CGACGGAATGAGGTACCTGATGAACG

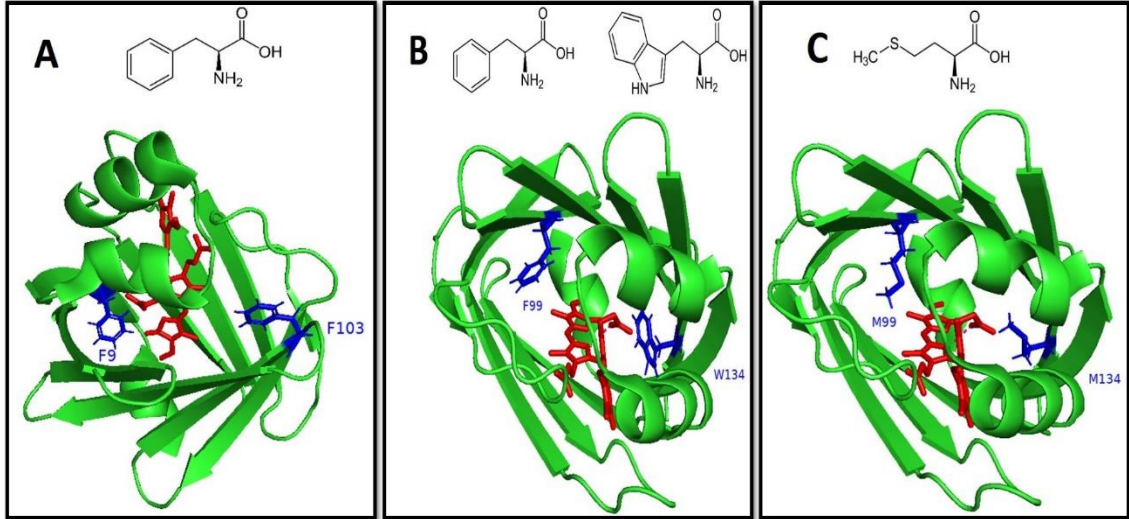
Şekil 3-4'te fenilalanin17, tirozin99, tirozin134, lösin41, triptofan9 ve tirptofan103'nun yabancı tip UnaG proteini üzerinde 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak yerleri belirtilmiştir.



Şekil 3-4 Yabancı tip UnaG proteini üzerinde fenilalanin17, tirozin99, tirozin134, lösin41, triptofan9 ve tirptofan103 amino asitlerinin gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)



Şekil 3-5 Yabancı tip UnaG proteini üzerinde fenilalanin17 amino asidinin A. tirozin (Y), B. metiyonin (M) ve C. lösin41 amino asidinin fenilalanin (F)'e değiştirildikten sonra gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)



Şekil 3-6 Yabani tip UnaG proteini üzerinde **A.** triptofan9 ve triptofan103 amino asitlerinin fenilalanin (F), **B.** tirozin99 amino asidinin fenilalanin (F), tirozin134 amino asidinin triptofan (W) ve **C.** tirozin99 ve tirozin134 amino asitlerinin metiyonin (M)'e değiştirildikten sonra gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)

Şekil 3-5 ve Şekil 3-6'da fenilalanin17, tirozin99, tirozin134, lösin41, triptofan9 ve triptofan103 amino asitlerinin tirozin, metiyonin, fenilalanin ve/veya triptofan amino asitlerine yukarıda tasarlanan şekilde 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak değiştirilmesinin ardından varyant UnaG proteinleri gösterilmiştir.

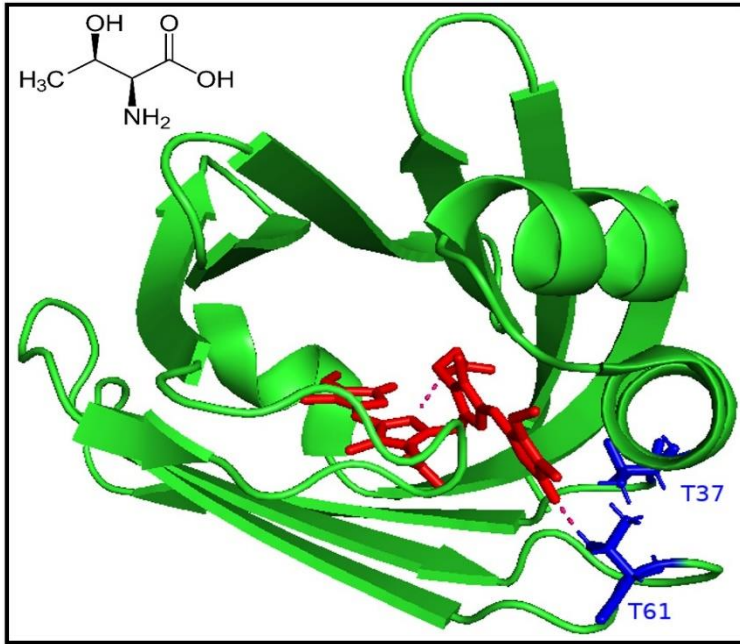
3.3.5. Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesi

T61/37'nin Ala/Ser/Val'e dönüşümünü sağlayan mutasyonlar (polaritenin etkisini gösterebilmek için) gerçekleştirilmiş olup floresan ligandın çevresinin değiştirilmesi için tasarlanan mutasyonlara ait insörtler Çizelge 3-10'da verilmiştir.

Çizelge 3-10 Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesi için tasarlanan insörtler

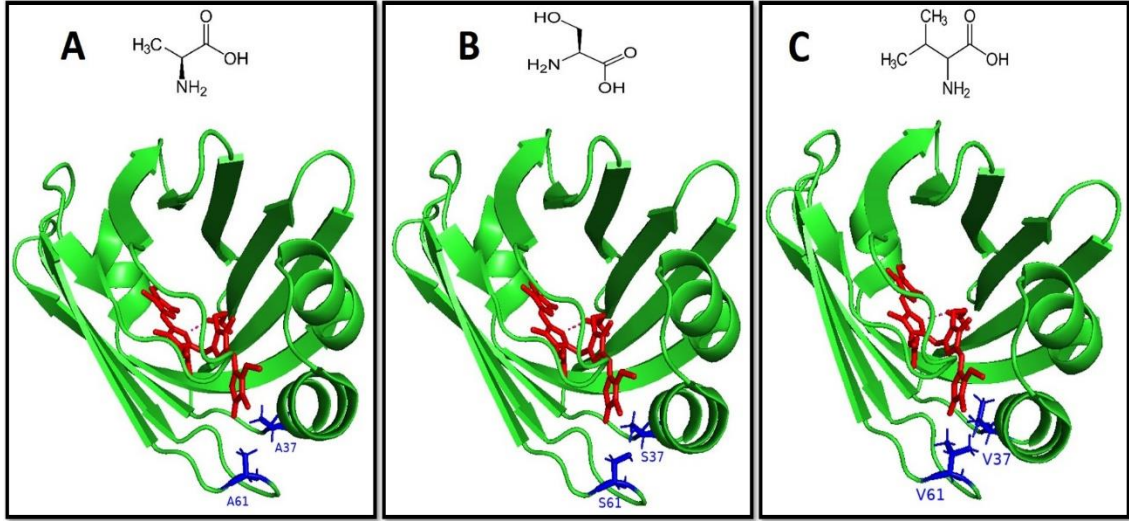
Mutasyon	İnsört
T61A_T37A	CCGGGTGGGGGATCTCTGGTTCCGCGCGGATCCATGGTTCG AGAAATTTGTTGGCACCTGGAAGATCGCAGACAGCCATA ATTTTGGTGAATACCTGAAAGCTATCGGAGCCCCAAAGGA ATTAAGCGATGGTGGGGATGCC GCA ACGCCGACATTGTA CATCTCCCAGAAGGACGGAGACAAAATGACAGTGAAAAT AGAGAATGGACCTCCT GCA ATTCCTTGACACTCAAGTAAAG TTCAAATTAGGGGAGGAGTTCGACGAATTCCTTCTGATC GAAGAAAAGGCGTAAAATCTGTCGTGAACTTGGTGGGAG AGAAGCTGGTGTACGTACAAAAGTGGGACGGCAAGGAGA CGACGTATGTCCGAGAGATAAAGGACGGTAAACTGGTTCG TGACACTTACGATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCGCAGCTA

	CCGGAGGGGCGACGGAATGAGGTACCTGATGAACG
T61S_T37S	CCGGGTGGGGGATCTCTGGTTCCGCGCGGATCCATGGTTCG AGAAATTTGTTGGCACCTGGAAGATCGCAGACAGCCATA ATTTTGGTGAATACCTGAAAGCTATCGGAGCCCCAAAGGA ATTAAGCGATGGTGGGGATGCC AGC ACGCCGACATTGTA CATCTCCCAGAAGGACGGAGACAAAATGACAGTGAAAAT AGAGAATGGACCTCCT AGC TTTCCTTGACACTCAAGTAAAG TTCAAATTAGGGGAGGAGTTCGACGAATTCCTTCTGATC GAAGAAAAGGCGTAAAATCTGTCGTGAACTTGGTGGGAG AGAAGCTGGTGTACGTACAAAAGTGGGACGGCAAGGAGA CGACGTATGTCCGAGAGATAAAGGACGGTAACTGGTTCG TGACACTTACGATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCGCAGCTA CCGGAGGGGCGACGGAATGAGGTACCTGATGAACG
T61V_T37V	CCGGGTGGGGGATCTCTGGTTCCGCGCGGATCCATGGTTCG AGAAATTTGTTGGCACCTGGAAGATCGCAGACAGCCATA ATTTTGGTGAATACCTGAAAGCTATCGGAGCCCCAAAGGA ATTAAGCGATGGTGGGGATGCC GTT ACGCCGACATTGTA CATCTCCCAGAAGGACGGAGACAAAATGACAGTGAAAAT AGAGAATGGACCTCCT GTT TTTCCTTGACACTCAAGTAAAG TTCAAATTAGGGGAGGAGTTCGACGAATTCCTTCTGATC GAAGAAAAGGCGTAAAATCTGTCGTGAACTTGGTGGGAG AGAAGCTGGTGTACGTACAAAAGTGGGACGGCAAGGAGA CGACGTATGTCCGAGAGATAAAGGACGGTAACTGGTTCG TGACACTTACGATGGGAGACGTCGTGGCTGTGCGCAGCTA CCGGAGGGGCGACGGAATGAGGTACCTGATGAACG



Şekil 3-7 Yabancı tip UnaG proteini üzerinde treonin61 ve treonin37 amino asitlerinin gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)

Şekil 3-7’de 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak treonin61 ve treonin37’nin yabancı tip UnaG proteini üzerindeki yerleşimi gösterilmiştir.



Şekil 3-8 Yabancı tip UnaG proteini üzerinde treonin61 ve treonin37 amino asitlerinin A. alanin (A), B. serin (S) ve C. valin (V)’e değiştirildikten sonra gösterimi (Şekil 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak oluşturulmuştur)

Şekil 3-8’de 4i3b kodlu PDB dosyası kullanılarak treonin61, treonin37’nin, alanin, valin ve/veya serin amino asitleriyle değiştirilmesi üzerine elde edilen varyant UnaG proteinleri gösterilmiştir.

3.4. Sekans Analizi

Saflaştırılan plazmitlerle, son konsantrasyonların yaklaşık 100 ng/µL olması için gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra 6 µL T7 Promotor primer (5pmol/ µL) ve 6 µL plazmid (80-100 ng/µL) olacak şekilde her bir mutasyon için ayrı ayrı tüplerde birleştirilip nükleotid sekansının doğruluğunun kontrolü için DNA sekans analizi yaptırılarak gerekli kontroller gerçekleştirilmiştir. Analiz verileri “FinchTV Sequence Analyzer ve ExPASy Translate Tool” kullanılarak sonuçlar kısmında Ek-B’de sunulmuştur.

(T7 Promotor Primer 5’-3’: TAATACGACTCACTATAGGG)

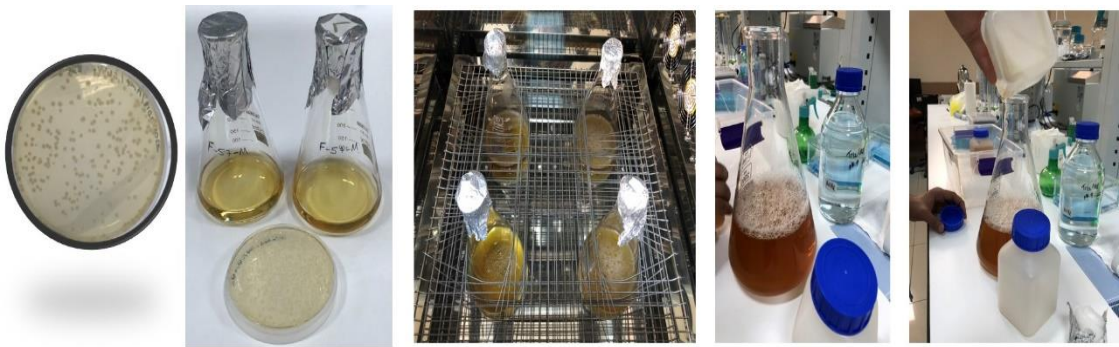
3.5. Elde Edilen Varyantların Ekspresyon, Ayırma ve Saflaştırma Süreçleri

Yapılan mutasyonlar sonucu elde edilen plazmitlerin DNA sekans analizlerinin pozitif çıkması, üretim aşamasına geçilebileceğini göstermiştir. Bu süreçte yapılan mutasyon sonucu elde edilen her bir plazmite, yabancı tipe uygulanan yöntemler doğrultusunda,

önce transformasyon ardından ölçek büyütme ile üretim, ayırma ve saflaştırma işlemleri uygulanmıştır. Süreç içerisinde her bir varyantın sahip olduğu farklı fizyokimyasal özellikleri nedeniyle karşılaşılan bazı problemlerden dolayı yabancı tip üzerinde optimize edilmiş prosedürde bazı değişiklikler yapılmıştır.

3.5.1. Transformasyon ve üretim

Elde edilen varyant pTolT- UnaG plazmitlerinden üretim yapmak için her biriyle ayrı ayrı *E.coli* C41 kimyasal kompetant hücreleri kullanılarak transformasyon yapılmıştır. 50 µL kompetant hücre ve 2 µL plazmid aynı tüp içerisine eklendikten sonra tüp buz içerisine 30 dakika süresince bırakılmıştır. Sonrasında 42°C’de 2 dakika ısı şokuna maruz bırakılıp tekrar 5 dakikalığına buza bırakılmıştır. Üzerine steril 500 µL LB besi yeri eklenip 45 dakika 37°C’de 180 rpm’de inkübasyonu yapılmıştır. Süre sonunda transforme hücrelerden 200 µL alınıp Amp (1:1000)’li katı besi yerine yayma ekim yapıp gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün oluşan tek koloniler 50 mL steril Amp (1:1000)’li LB besi yerlerine alınıp gece boyu inkübasyonu yapılmıştır. Bir gece önce inkübasyona bırakılan 50 mL besi yeri içerisinde gelişen hücreler 4200 rpm’de 10 dakika santrifüj yapıp toplandıktan sonra süpernatant dökülüp, çökelti üzerine 5 mL steril taze LB besi yeri eklenmiş ve hücreler süspanse hale getirilip inokülant olarak kullanılmıştır. 2 L erlen içerisinde hazırlanan 500 mL LB besi yerleri (6 adet) steril edildikten sonra içerisine 500 µL Amp ve 800 µL inokülant eklenmiştir. Erlenler 180 rpm’de 37°C’de OD 0,7 olana kadar inkübe edilmiştir (Şekil 3-9). OD 0,7’ye ulaştığında 500 µL IPTG (1:1000) ile indüklemesi yapıp saatte bir örnek alınarak protein üretimi SDS PAGE ile takip edilmiştir (Ek-C). İndüklemenin 3. saatinde hücreleri toplamak için 8000rpm 30 dakika santrifüj yapıp süpernatant döküldükten sonra hücreler yükleme tamponu ile süspanse edilip toplanmıştır.

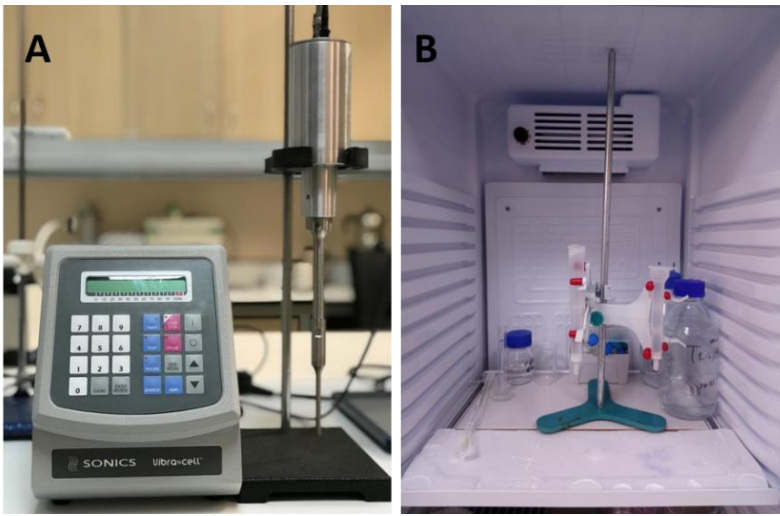


Şekil 3-9 Üretim sistemi

3.5.2. Ayırma ve saflaştırma işlemleri

Ayırma saflaştırma işlemleri için süspansiyon hücrelerin üzerine proteaz inhibitörü olarak benzamidin ve PMSF eklenmiştir. DNA ve RNA kontaminasyonunu engellemek için DNase ve RNase enzimleri eklendikten sonra hücrelerin daha iyi parçalanmasını sağlamak için lizozim enzimi ilave edilip, karıştırılmıştır. Bütün ayırma işlemleri proteinin stabilitesini sağlamak için buz içerisinde yapılmıştır. Sonikatör cihazı (Şekil 3-10A, Sonics Vibra Cell, %40 amplitude) ile hücrelerin mekanik parçalanması sağlandıktan sonra 40000 rpm de 1 saat +4°C’de santrifüj edilip süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde alınmıştır.

Saflaştırma çalışmalarının tamamı +4°C’de yapılmıştır (Şekil 3-10B). Saflaştırma işlemi için 4 mL Ni-NTA agaroz (saflaştırmada sorun yaşanan bazı varyantlara diyaliz uygulandıktan sonra TALON Metal Affinity Resin ile yeniden saflaştırma yapılmıştır) içeren kolon hazırlandıktan sonra süpernatant kolona transfer edilerek kolondan geçirilmesi sağlanmıştır. Kolondan geçirilen her fraksiyon etiketlenerek saklanmıştır. Süpernatantın tamamı kolondan geçtikten sonra 20 mL yükleme tamponu kolondan geçirildikten sonra 2 kere 20’şer mL yıkama tamponu ile kolon yıkanmıştır. Son olarak 5 mL elüsyon tamponu ile proteinin toplanması sağlanmıştır. Her fraksiyondan örnek alınıp SDS PAGE ile analiz edilmiştir (%12’lik jel, Ladder: Precision Plus Protein™ Standards) (Ek-C).



Şekil 3-10 A. Parçalama (Sonikatör), B. Saflaştırma sistemi (Ni-NTA/TALON Kolon)

Saflaştırma süreci sonunda yapılan SDS PAGE analizinden elde edilen jel görüntüleri doğrultusunda saf olan fraksiyonlara karakterizasyon analizinde kullanılmak üzere 6-8 kDa MWCO (Molecular weight cut-off) membran kullanılarak diyaliz işlemi uygulanmıştır. Yeterli saflıkta olmayan varyant proteinler ise diyaliz işleminden sonra tekrar kurulan bir saflaştırma kolonu sistemiyle saflaştırma işlemine tabi tutulup yeniden diyaliz işlemi yapılmıştır. Diyaliz sonrasında yapılan saflaştırma işleminden elde edilen varyant proteinlerin SDS-PAGE jel görüntüsü, analizlerde kullanılan tüm proteinlerin, Şekil 4-18’de verilmiştir.

3.6. Üretilen Proteinlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmalarını yabancı tip UnaG proteininin Thrombin enzimi kesim çalışmaları, dizi analizi, mikro hacimli spektrofotometrede ve elektroforez ile karakterizasyon, Western Blotlama, dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi, proteinlerin termal açılma sıcaklıkları, floresans spektroskopisi ve floresan titrasyon başlıklarına altında incelenmiş ve aşağıda sunulmuştur.

3.6.1. Yabancı tip UnaG proteini trombin enzimi kesim çalışmaları

Kesim çalışmaları Merck (Novagen) 69671| Thrombin, Restriction Grade kiti kullanılarak üreticinin önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. İlk olarak liyofilize haldeki thrombin enzimi, thrombin seyreltme/saklama tamponunda çözülüp kesim çalışmasında kullanılmak üzere aynı tamponla enzim miktarı mikro litrede 2U, 5U ve 10U olacak şekilde seri seyreltmeler yapılmıştır.

Çizelge 3-11 Thrombin enzim kesim reaksiyon bileşimi

Miktar	Reaksiyon Bileşeni
5 µL	10X Trombin Bölünme / Yakalama Tamponu
10 µg	UnaG proteini
1 µL	Seyreltilmiş Trombin (her tüp, 1 µL farklı enzim dilüsyonu alır. Kontrol olarak bir tüp sadece seyreltme/saklama tamponu içerir)
X µL	De-iyonize su
50 µL	Toplam hacim

Çalışma kesim öncesi kaynatılmış UnaG proteini ve kesim sonrası kaynatılmış UnaG proteini olarak iki grup halinde tasarlanmıştır. Çizelge 3-11’de belirtilen tampon miktarları ile kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+2 ünite thrombin,

kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+5 ünite thrombin, kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+10 ünite thrombin, kesim sonrası kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+2 ünite thrombin, kesim sonrası kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+5 ünite thrombin ve kesim sonrası kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+10 ünite thrombin enzimi farklı tüpler içerisinde birleştirildikten sonra oda sıcaklığında reaksiyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak sadece UnaG proteini ve seyreltme/saklama tamponu içeren örnek kullanılmış olup SDS-PAGE analiz yöntemi ile proteinlerin ayrılma dereceleri belirlenmiştir (Şekil 4-17)

3.6.2. Elektroforez ile Karakterizasyon

Üretim sürecinin takibi ve sürecin sonunda uygulanan ayırma saflaştırma işleminden elde edilen fraksiyonların saflık derecelerinin kontrolü için %12'lik SDS PAGE hazırlanmıştır. Hazırlanan jel karışımı plakalar arasına yüklendikten sonra tanka yerleştirilmiş ve tank SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Örnekler kuyucuklara yükleme boyasıyla 1:1 oranında etkileştirildikten sonra 95°C'de 5 dakika kaynatılıp denatüre edilerek SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına 10'ar µL yüklenmiştir. Precision Plus Protein™ Standards markör olarak kullanılmıştır. 180 voltta biorad mini protean SDS PAGE sisteminde yaklaşık olarak 45 dakika süresince (boya ayırma jelinden uzaklaşmaya kadar) yürütülmüştür. Staining ve de-staining işlemleri uygulanmış olup bantları görünür hale getirildikten sonra jel görüntüleri Biorad ChemiDoc™ MP görüntüleme cihazında görüntülenip kaydedilmiştir (Ek-C).

Çizelge 3-12 Üretilen varyant UnaG proteinlerinin nicel analizi için gerekli olan molekül ağırlığı ve ekstinksiyon (molar soğurum) katsayıları

Mutasyonlar	MA (Da)	pI (pH)	Ekstinksiyon Katsayısı (M ⁻¹ cm ⁻¹)
N57D	27301,07	8,33	24535
N57E	27315,10	8,33	24535
N57R	27342,17	8,83	24535
F17Y	27316,08	8,62	26025
F17M	27284,10	8,63	24535
L41F	27334,10	8,63	24535
Y99F_Y134W	27307,12	8,65	27055

Y99M_Y134M	27236,12	8,65	21555
W9F_W103F	27222,01	8,63	13535
T61A_T37A	27240,03	8,63	24535
T61S_T37S	27272,03	8,63	24535
T61V_T31V	27296,14	8,63	24535

Üretilen varyant UnaG proteinlerinin kantitatif analizi mikro hacimli spektrofotometre (DeNovix DS-11 Series Spectrophotometer/Fluorometer) kullanılarak ölçülmüş ve 280 nm deki soğurum değerleri Lambert-Beer kanuna göre (Çizelge 3-12’de verilen molar soğurma katsayıları ve moleküler ağırlıkları kullanılarak) hesaplanmıştır. Çizelgede verilen değerler proteinlerin amino asit dizileri girildikten sonra ExpASY ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) kullanılarak teorik olarak hesaplanmıştır.

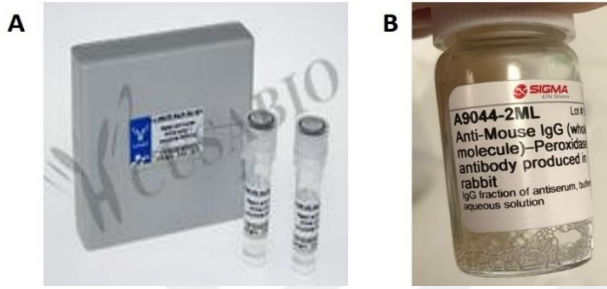
3.6.3. Western Blot

Varyant UnaG proteinleri %12’lik SDS PAGE jelinde, 180 voltta yaklaşık 45 dakika boyunca yürütülmüştür. Kontrol amaçlı her jelden ikişer adet hazırlanmış ve yürütülmüştür. Jellerden bir tanesi blotlama işleminde kullanılırken diğeri protein bantlarının görüntülenmesi için kullanılmıştır. Blotlama işleminde kullanılacak blotlama kağıtları ve nitroselüloz membranlar %20 metanol içeren 1X CAPS tamponunda (ultra saf su ile hazırlanan 100 mM CAPS pH:11, saklama koşulu +4°C) yarım saat bekletilmiştir. Elektroforezden elde edilen SDS PAGE jelleri ise aynı tampon içerisinde 2 dakika bekletilmiştir.

Yarı kuru transfer düzeneği (semi-dry blotter) içerisine en altta kâğıt olacak şekilde sırasıyla kâğıt üzerine nitroselüloz membran, SDS PAGE jeli ve en üstte yine kâğıt olacak şekilde yerleştirilmiştir. Hava baloncuğu kalmamasına özen gösterildikten sonra 20mA’da 30 dakika sürecince yürütülmüştür. Blotlamanın ardından jel, protein kalıntılarını görmek için commasie mavisi ile boyanıp, destaning yapılmıştır. Nitroselüloz membrandaki proteinleri göstermek için Ponceau S boyası ile boyandıktan sonra boyayı membrandan tekrar çıkarmak için PBS ile boya çıkana kadar yıkama yapılmıştır. TBS (1 litre için; 2 gr KCl, 60 gr Tris, 80 gr NaCl, pH:8) ile %5’lik yağsız süt solüsyonu hazırlanıp falkon tüpü içerisine 25 mL yağsız süt solüsyonu ve membran

yerleştirilmiştir. +4°C’de iki saat boyunca roller karıştırıcı üzerinde bekletildikten sonra falkon tüp içerisindeki süt uzaklaştırılmıştır.

Primer anti body olarak fare 6*His Monoclonal Antibody (Cusabio Technology, CSB, MA000011M0m) (Şekil 3-11A) kullanılmış olup falkon tüpü içerisinde 4 µL primer anti body / 2mL süt olacak şekilde +4°C’de 4 saat roller karıştırıcı üzerinde bekletilmiştir. 4. saatin sonunda iki kez 20 mL 1X TBS tamponu ile oda sıcaklığında 5’er dakikalık süreçlerle yıkama yapılmıştır.



Şekil 3-11 A. Primer antibody: 6*His Monoclonal Antibody, **B.** Seconder antibody: Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase

Sekonder anti body olarak tavşan Anti-Mouse IgG (Whole molecule) – Peroxidase (Sigma Aldrich, A9044) (Şekil 3-11B) kullanılarak roller karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında falkon tüpü içerisinde membran ve 10 µL sekonder anti body / 2mL TBS tamponu olacak şekilde 4 saat inkübe edilmiştir. 4. saatin sonunda iki kez 20 mL 1X TBS tamponu ile oda sıcaklığında 15’er dakikalık süreçlerle yıkama yapılmıştır. 10 mL etanol içerisinde 50mg 4-chloronathol çözüldükten sonra üzerine 50 mL iyileştirme tamponu ve 60 µL H₂O₂ eklenerek taze iyileştirme solüsyonu (1 litre için; 3 gr Tris, 8 gr NaCl, 0.1 gr Na₂HPO₄, pH:7.2) hazırlanmıştır. Membran yeni temiz bir plastik taşıma kaba transfer edildikten sonra iyileştirme solüsyonu, membranın yüzeyi kaplanacak şekilde taşıma kabına eklenmiş ve birkaç dakika çalkalama yapılarak inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için sıcak su ile çok kısa süre yıkama yapıp membran kuru hava ile kurutulduktan sonra Biorad ChemiDoc™ MP jel görüntüleme cihazında jel görüntüleri kaydedilmiştir (Şekil 4-19 & 4-20 & 4-21 4-22 & 4-23 & 4-24).

3.6.4. Dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi

Dairesel dikroizm spektroskopisi çalışmaları için Jasco 810 spectropolarimeter cihazı kullanılmıştır. Her bir mutant ve yabancı tip UnaG için 0,1 mg mL⁻¹ konsantrasyonunda

örnekler hazırlanarak bir gece boyunca 50mM pH: 8,5 fosfat tamponuna karşı diyaliz edilerek tuzlardan arındırılmıştır. Tüm Far UV ölçümleri için 0,1 cm quartz glass cuvette (Hellma; 110-1-40 QS) kullanılmıştır. Elde edilen proteinlerin 3 boyutlu konformasyonlarının teşekkül ettiğine dair bir veri elde edilmesi amacıyla gerçekleştirilen Far UV CD ölçümleri 195-250 nm arasında üç tekrarlı olarak alınmıştır. CD spektroskopisi ölçümleri hem ApoUnaG hem de bilirubin ile birlikte HoloUnaG için alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Moleküler CD cinsinden Ek-D’de sunulmuştur.

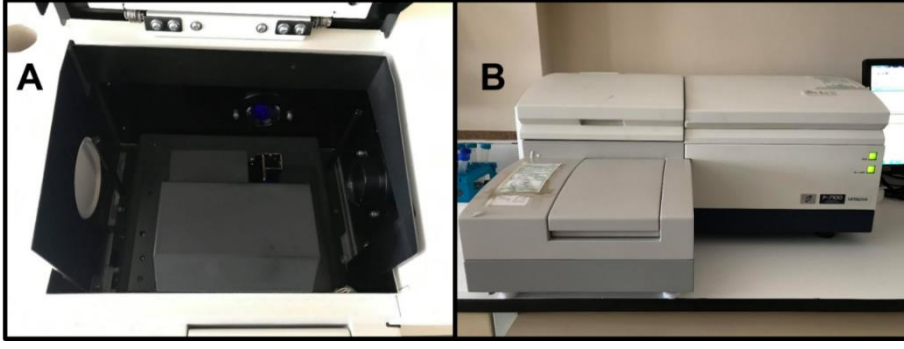
3.6.5. Termal açılma sıcaklıkları

E.coli C41 suşunda ekspres edilerek saflaştırılan tüm mutant ve yabanıl tipli UnaG proteinlerine ait termal açılma sıcaklıklarının belirlenebilmesi amacıyla CD spektroskopisi ile “thermal unfolding” çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her bir mutant ve yabanıl tip UnaG için 0,1 mg mL⁻¹ konsantrasyonunda örnekler hazırlanarak bir gece boyunca 50mM pH: 8,5 fosfat tamponuna karşı diyaliz edilerek tuzlardan arındırılmıştır. Ölçümler sırasında; Data pitch: 2°C, Bandwith: 2 nm, Response: 4 sec., Ranging: 1°C/m, Cuvette: 0,1 cm, Temp: 95°C → 21°C ayarları kullanılmıştır. Yabanıl tip ve tüm varyant Apo/HoloUnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri Şekil 4-25 & 4-26’da sunulmuş olup elde edilen tüm mutantların termal açılma sıcaklıklarına ait veriler ayrı ayrı Ek-E’de sunulmuştur.

3.6.6. Floresans spektroskopisi

Floresans spektroskopisi analizleri HITACHI Fluorescence Spectrophotometer F-7100 cihazı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3-12). Floresan çalışmaları kapsamında ilk olarak her bir varyanta ve yabanıl tipe ait eksitasyon ve emisyon noktaları belirlenmiştir (Çizelge 4-5). Excitation ve emission slit değerleri 10.0 nm olarak ayarlanmış ve PMT voltage değeri 700 V olarak seçilmiştir.

Floresan yoğunluğu için yapılan analizde kullanmak üzere %0,002 bilirubin hazırlamak için önce, 1mg bilirubin 1 mL saf suyla birleştirilmiş ve çözünmesi için üzerine bir damla 2M sodyum hidroksit ilave edildikten sonra 200mM Tris HCl (pH: 8,4) ile son hacim 50 mL’ye tamamlanmıştır.



Şekil 3-12 Floresans Spektroskopisi cihazının (A) içten görünümü, (B) genel görünümü

Elde edilen saf yabancı tip ve varyant UnaG proteinlerinin üzerine %0,002 bilirubinden (v/v, 1:1) eklenerek belirlenen ışımaya noktalarına göre floresans spektroskopisinde floresan yoğunluğu ölçülmüştür. Yapılan analiz sonucu yabancı tip ve varyant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışımaya noktaları Çizelge 4-5'te ve grafikleri Ek-F'de sunulmuştur.

3.6.7. Varyantların bilirubin ile ayrışma sabitlerinin belirlenmesi

Tez çalışmalarında protein mühendisliği teknikleriyle elde edilerek saflaştırılan 12 farklı varyant UnaG proteininin değişen afinitelerde bilirubine bağlanabildiği CD spektroskopisi denemeleriyle gösterilmiştir. Tüm varyant proteinlerin UC-BR'ye karşı nM seviyesinde afinite gösterdiği anlaşılmıştır.

HITACHI F-7100 Fluorescence spectrophotometer (Şekil 3-12), cihazında yapılan floresan titrasyon çalışmasında emission modunda tarama yapılmış olup excitation ve emission slit değerleri 10.0 nm olarak ayarlanmış ve PMT voltage değeri 700 V olarak seçilmiştir.

Titrasyon çalışması için tüm mutantlar ve yabancı tip UnaG için başlangıç protein konsantrasyonu 200 nM olarak kullanılmıştır. Hazırlanan %0,002 bilirubinin son konsantrasyonu 600nM olacak şekilde aynı tris tamponu ile seyreltilerek kullanılmıştır. Hazırlanan proteinlerden floresan küvetine 400 µL eklenip üzerine, 600nM bilirubinden artan belirli miktarlarda eklenmesiyle ApoUnaG'ın UC-BR ile doygunluğa ulaşması sağlanmıştır. Floresans spektroskopisi cihazında bilirubinin her ilavesinin ardından floresan ölçüm alınmış ve kaydedilmiştir. Floresan yoğunluğunun sabitlenip, proteinin

doğunluğa ulaştığı süreçte ekleme işlemi durdurulmuştur. Bu işlem yabancı tip ve her bir varyant UnaG proteini için tekrarlanmıştır.

Gerçekleştirilen titrasyon çalışmasına ait veriler Sigma Plot paket programında analiz edilerek K_d değerleri belirlenmiştir. Varyantların floresans spektroskopisi ile elde edilen floresan yoğunluklarından yola çıkılarak oluşturulan lineer doğunluk eğrileri Ek-G'de sunulmuştur. Yabancı tip ve varyant UnaG proteinlerine ait UC-BR için K_d değerleri Çizelge 4-6'da sunulmuştur.

3.6.8. Sıcaklığa Bağlı Floresan Şiddeti

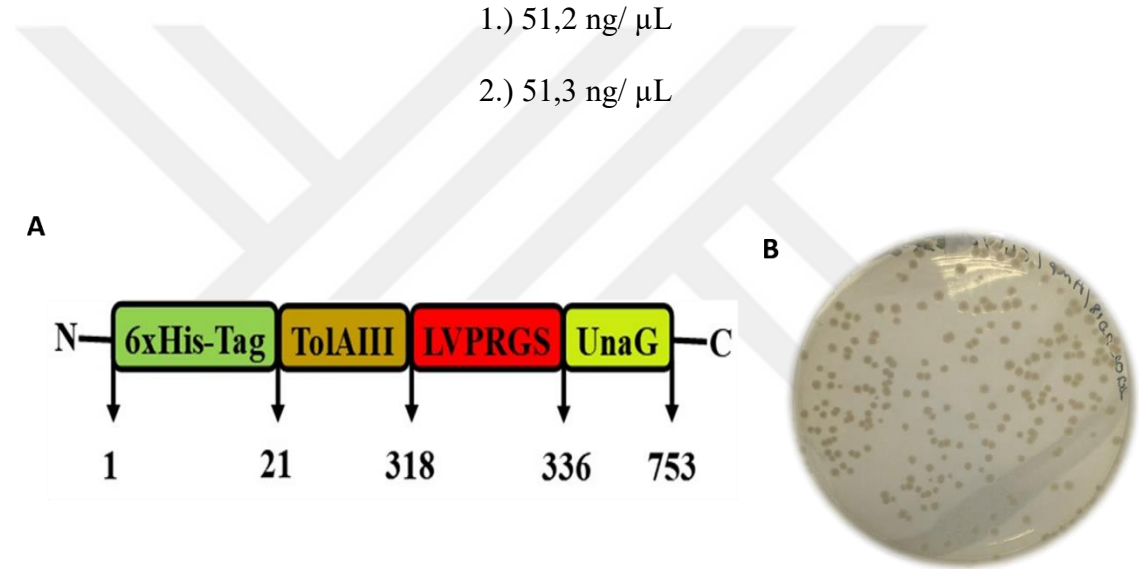
Üzerine UC-BR (%0,002) eklenerek (v/v, 1:1) floresan hale gelmiş tüm varyant proteinlerin (0,1 mg/mL protein) floresan şiddetindeki değişim, sıcaklığın 20°C'den başlayarak 90°C'ye kadar 1'er °C artırılmasıyla QIAGEN Rotor-Gene Q marka gerçek zamanlı PCR cihazında ölçülmüştür. Yabancı tip ve varyant UnaG proteinlerine ait sıcaklığa bağlı floresan şiddetindeki değişimler Şekil 4-27'de sunulmuştur.

4. BULGULAR

Yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

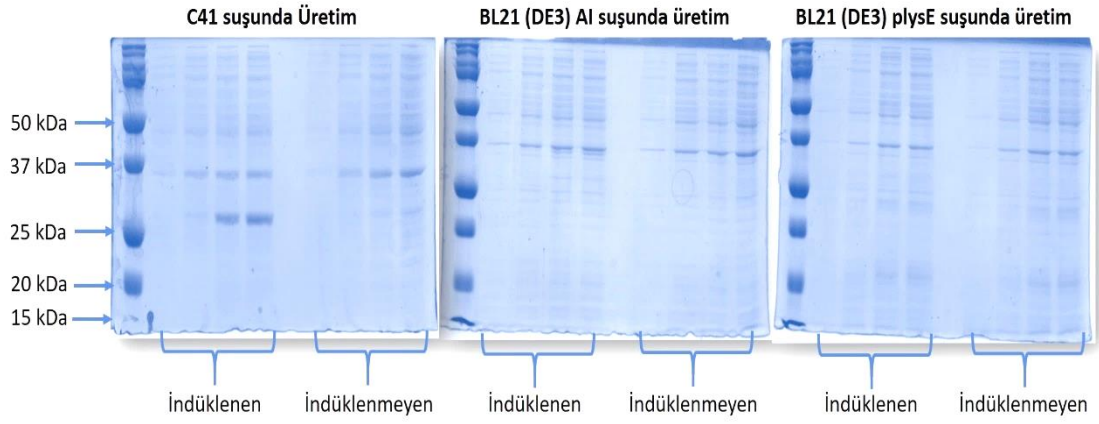
4.1. Yabani Tip UnaG Proteininin Üretimi

Yaban tipi UnaG proteininin üretimi için pTolT-UnaG plazmiti (Şekil 4-1A) çoğaltma ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Mikro hacimli spektrofotometre cihazı kullanılarak plazmitlerin konsantrasyonları ölçülmüştür. Saflaştırma sürecinden elde edilen plazmitlerin konsantrasyonları;



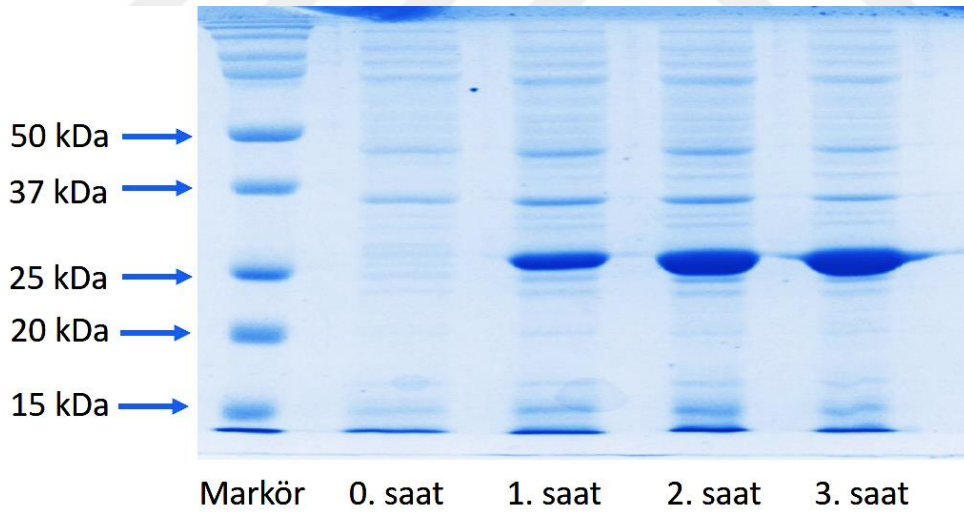
Şekil 4-1 A. Yabani tip UnaG plazmitinin *E.coli* C41 suşuna transformasyonu, **B.** Füzyon UnaG proteinini üretmek için kullanılan pTolT-UnaG'nin nükleotid sekansına dayanan doğrusal plazmid haritası

Elde edilen plazmitlerin üç farklı konakçı *E.coli* suşuna transformasyonu (Şekil 4-1B) sonucu yapılan küçük çaplı üretimlerden elde edilen ekspresyon verileri Şekil 4-2'de sunulmuştur. Jel görüntüsüne göre indüklemenin ardından UnaG proteinini en iyi eksprese eden suşun *E.coli* C41 olduğu işaretli bantlarla gösterilmiştir. *E.coli* C41 suşunun aksine *E.coli* A1 ve *E.coli* plysE suşlarında indüklenen ve indüklenmeyen üretim aşamalarında 27 kDa seviyesinde herhangi bir bant gözlenmemiştir. Bu yüzden konakçı hücre olarak *E.coli* C41 suşu seçilmiştir.



Şekil 4-2 Suş optimizasyonu için *E.coli* C41, *E.coli* BL21 (DE3) AI ve *E.coli* BL21 (DE3) plysE suşlarında yapılan UnaG protein üretimi

Konakçı hücre seçiminin ardından üretim için tekrar *E.coli* C41 suşuna transformasyonu (Şekil 4-1A) yapılan yabancı tip UnaG plazmitinden ölçek büyütme ile protein üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim aşamasında *E.coli* hücrelerinin belirlenen yoğunluğa ulaştıktan sonra indüklenmesinin ardından saatte bir alınan örneklerle üretimin gerçekleştiği Şekil 4-3’de sunulmuştur.

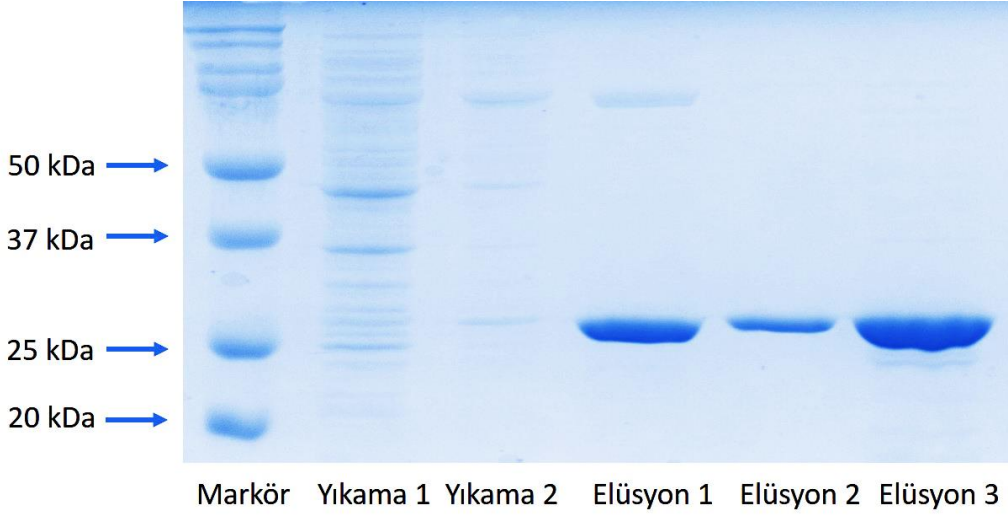


Şekil 4-3 *E.coli* C41 suşunda yapılan yabancı tip UnaG protein üretimi

4.1.1. Ayırma ve saflaştırma süreçleri

Üretilen yabancı tip UnaG proteininin ayırma işlemlerinde enzimatik parçalanma için lizozim enzimi kullanılırken mekanik parçalama işlemi için sonikasyon yönteminden faydalanılmıştır (Şekil 3-10A). Proteinin parçalanmaması için PMSF ve benzamidin

proteaz inhibitörleri kullanılırken, DNA ve RNA için ise parçalayıcı enzimler ortama ilave edilmiştir. Hücre lizatı ve diğer yüksek moleküler ağırlığa sahip moleküllerin uzaklaştırılması için ultrasantrifügasyon işlemi yapıldıktan sonra süpernatant kısmı alınıp saflaştırma işlemi için kullanılmıştır.



Şekil 4-4 *E.coli* C41 suşundan üretilen UnaG proteininin Ni-NTA kolonunda saflaştırılması

Saflaştırma işleminde afinite kromotografisinden yararlanılmıştır (Şekil 3-10B). Şekil 4-4'de, afinite kromotografisi sonucu elde edilen fraksiyonların elektroforez jelinde yürütülmesiyle elde edilen jel görüntüsü verilmiştir. Buna göre 27,3 kDa seviyesinde elüsyon ve yıkama fraksiyonlarında bantlar görülmüş olup bu bantların dışında başka bantların o sütunlarda gözlenmemesi proteinin saf bir şekilde elde edildiğini göstermiştir.

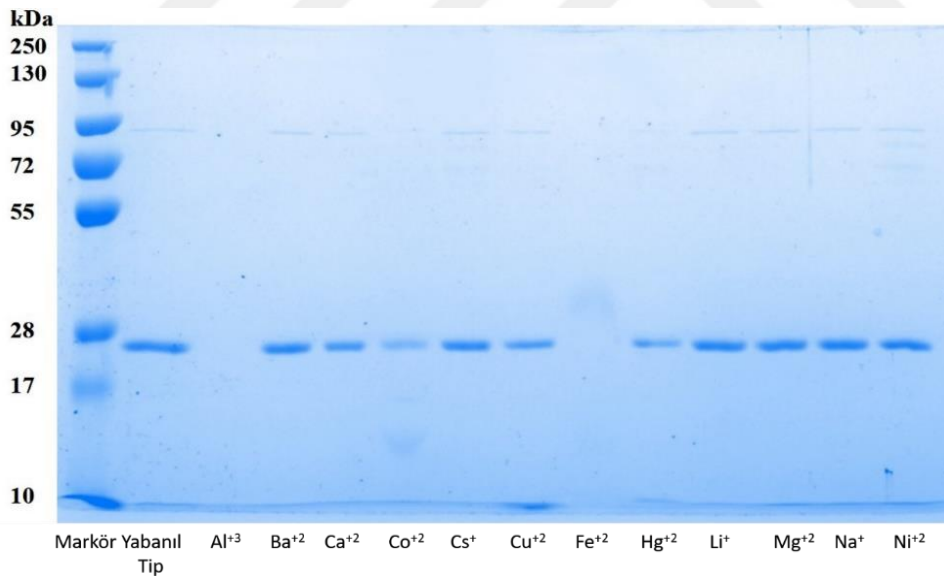
Saflaştırma sürecinin kontrolü amacıyla hazırlanan SDS PAGE jelinde (Şekil 4-4) yabancı tipli UnaG proteininin özellikle elüsyon aşamasında saf olarak elde edildiği görülmüştür. Elüsyon 1-2-3 birleştirilerek konsantrasyonu mikro hacimli spektrofotometrede ölçülüp 0,93 mg/mL konsantrasyona sahip 35 mL hacminde 32,55 mg protein elde edilmiştir

Fraksiyonların içerisinde bulunan imidazolün uzaklaştırılması amacıyla 6-8 kDa MWCO membran kullanılarak diyaliz işlemi uygulanmıştır. Tüm bu sürecin sonunda diyaliz ürünleri mikro hacimli spektrofotometrede ölçülmüş ve 0,63 mg/mL konsantrasyona sahip saf yabancı tip UnaG proteini elde edilmiştir.

4.2. Yabanıl Tip UnaG Proteininin Geri Kazanımı ve Yeniden Kullanılabilirliği

UnaG proteini ile UC-BR birleştirildikten sonra, UnaG proteininin geri kazanım çalışmaları farklı metal iyonlarının UnaG-UC-BR üzerine eklenip, etkilerinin incelenmesiyle yapılmıştır. Yapılan çalışmada öncelikle UnaG proteini ile metal etkileşimleri SDS-PAGE ile incelenmiş, ardından UnaG-UC-BR metal etkileşimlerine bağlı floresan ve UV-Vis ölçümleri alınmıştır. Bu etkileşimlere göre UnaG-UC-BR kompleksinden UC-BR'yi, onunla şelat yapıp ayırabilecek bir metal iyonu seçilerek, proteinin geri kazanım çalışması yapılmıştır.

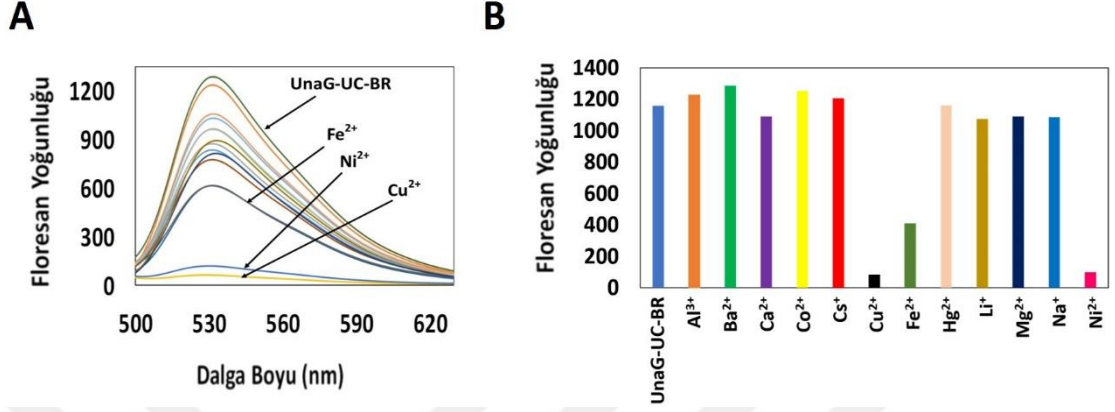
UnaG proteininin konformasyonel yapısının metal iyonları varlığında herhangi bir değişime uğrayıp uğramadığını göstermek adına SDS PAGE ile analiz yapılmıştır (Şekil 4-5). Yapılan analizde Al^{+3} iyonu proteini agregre hale getirirken, Co^{+2} iyonu ilavesinde proteinde kayıplar gözlenmiştir. Ayrıca Fe^{+2} metal iyonlarının proteinin yapısı üzerinde ki olumsuz etkisi, demir iyonu sütununda herhangi bir bant görülmemesinden anlaşılmaktadır.



Şekil 4-5 Metal iyon kompleksleri ile UnaG'in %12 SDS PAGE görüntüsü

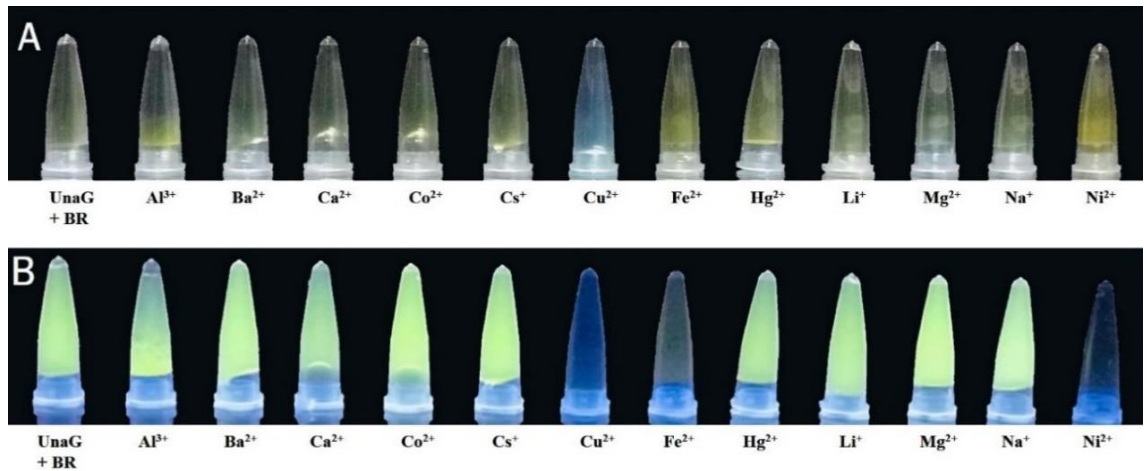
Çeşitli metal iyonlarının ($2 \times 10^{-7} M$) (Al^{+3} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} , Cs^{+} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Li^{+} , Mg^{+2} , Na^{+} ve Ni^{+2}) UnaG-UC-BR (0,3 mg/mL) üzerine ilavesiyle floresan yoğunluğu ölçümleri alınmıştır (Şekil 4-6A-B). UnaG-UC-BR $\lambda_{ex} = 498$ nm de uyarıldığında $\lambda_{em} = 528$ nm de emisyon piki gözlenmiştir. Metal iyonlarının ilavesiyle emisyon pikinde herhangi bir kayma gözlenmezken, floresan yoğunluğunda eklenen metal iyonuna bağlı

olarak farklı miktarlarda azalmalar gözlenmiştir. Cu^{+2} ve Ni^{+2} iyonları UnaG-UC-BR kompleksinin floresan şiddetini sönmüştür.



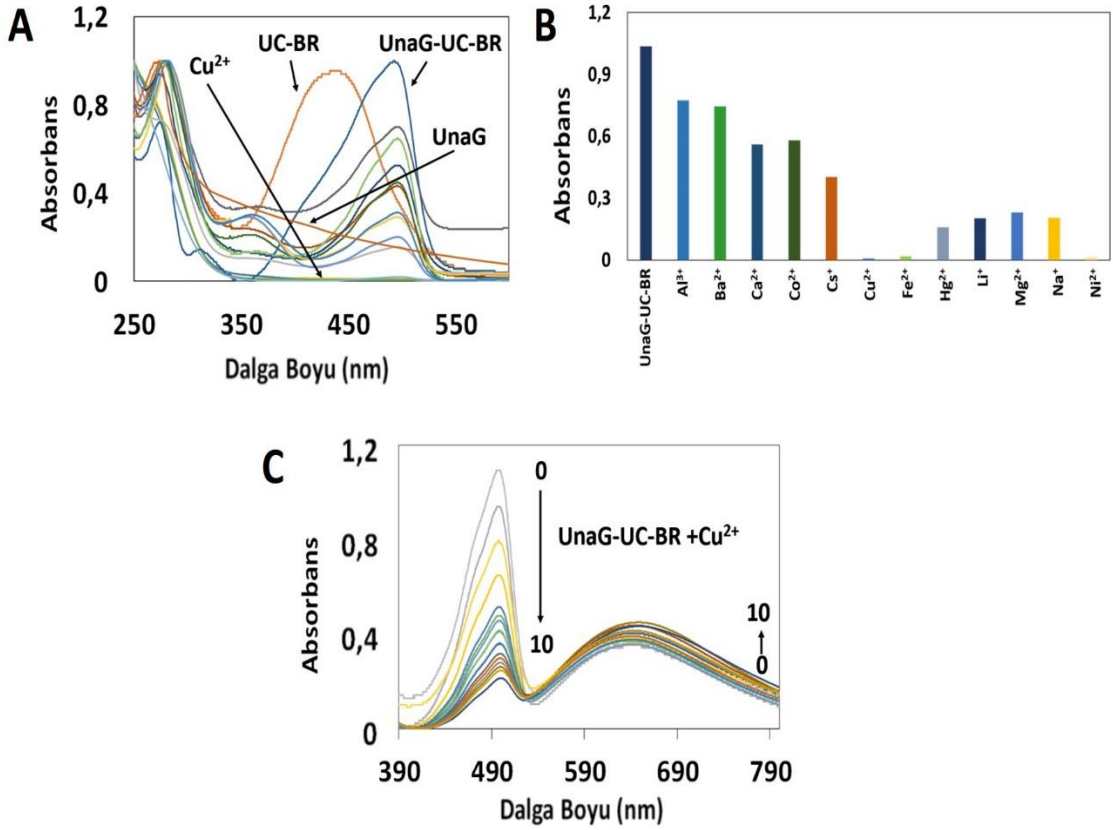
Şekil 4-6 A. Metal tuzlarının eklenmesi üzerine UnaG-UC-BR'nin floresans spektrumları ($\lambda_{\text{ex}} = 498 \text{ nm}$), **B.** Çeşitli metal iyonlarının UnaG-UC-BR'ye eklenmesi ile 527 nm'de emisyon yoğunluğunun değişimini gösteren bar grafiği

Metallerle UnaG-UC-BR arasındaki muhtemel etkileşimleri görmek adına gün ışığı ve UV ışık altında görüntüler alınmıştır (Şekil 4-7). Bakır, demir ve nikel iyonları floresan sönmüştür. Diğer metallerde kayda değer bir değişiklik görülmemiştir. Demir iyonları, yapılan SDS PAGE çalışmasında elde edilen görüntüye göre UnaG proteininin degradasyonuna neden olmuştur. Geri kazanım çalışmalarında Ni-NTA afinite kolonu kullanılması hedeflendiğinden, kolona Ni^{+2} ile spesifik olmayan bağlanmaların olmaması gerekmektedir. Bu yüzden, üç metalden sadece bakır geri kazanım çalışmalarında kullanılmıştır.



Şekil 4-7 Eklenen metal iyonlarıyla, UnaG-UC-BR'nin floresan renk değişimi (A) gün ışığı altında, (B) UV ışığı altında

Elde edilen UV-Vis sonuçlarına göre UC-BR için 496 nm ve UnaG için 280 nm civarında karakteristik pikler görülmüştür. UnaG ve UC-BR'nin birleştirilmesiyle iki pikte de düşüşler gözlenmiştir. Literatürde de belirtildiği üzere bu düşüşler UnaG ile UC-BR arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. UnaG-UC-BR bileşimine Cu^{+2} 'nin ilavesi ile piklerde yine bir düşüş gözlenmiştir. Diğer metal iyonlarının ilavesiyle oluşan piklerle kıyaslandığında en çok düşüş Fe^{+2} , Cu^{+2} ve Ni^{+2} 'de görülmüştür (Şekil 4-5A-B).

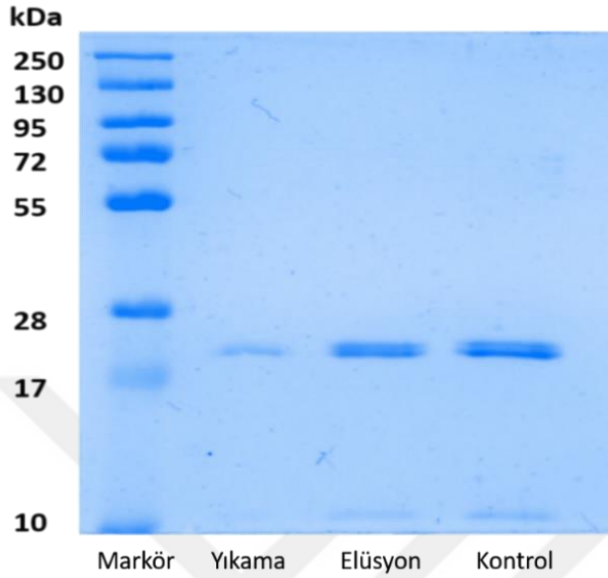


Şekil 4-8 A. UnaG, UC-BR, Cu^{+2} , UnaG-UC-BR, UnaG-UC-BR- Cu^{+2} 'nin normalize UV-Vis absorbans spektrumları, **B.** Çeşitli metal iyonlarının uygulandığı UnaG-UC-BR'nin 498 nm'de absorbansının değişimini temsil eden bar grafiği, **C.** UnaG-UC-BR'nin tris tamponunda Cu^{+2} iyonlarının (0-10 eşdeğer) eklenmesi ile elde edilen titrasyon profili

Literatürde, bakır ve bilirubin molekülleri arasında güçlü bir etkileşim olduğu bilinmektedir. Cu^{+2} 'nin UnaG-UC-BR üzerine etkisini göstermek için UV-Vis titrasyon denemesi yapılmıştır (Şekil 4-8C).

UnaG-UC-BR kompleksi ile bakır iyonları bir araya getirildiğinde bakır iyonlarının bilirubin ile etkileşimi sonucu floresan sönümlenme gerçekleşmiştir. Bu sönümlenmenin ardından elde edilen UnaG-UC-BR- Cu^{+2} karışımı Ni-NTA agaroz rezin kullanılarak afinite kromatografisi ile ayırma-saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Elde edilen

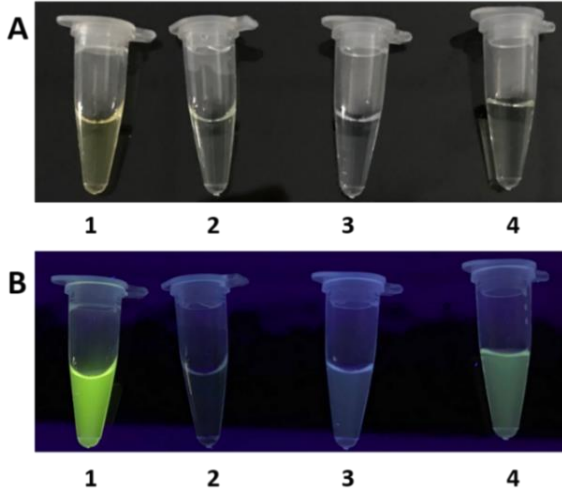
fraksiyonlara SDS PAGE uygulanmıştır ve jel görüntüsüne göre proteinin saf bir şekilde elde edildiği görülmektedir (Şekil 4-9). Geri kazanılan protein UnaG* olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4-9 UnaG*'ın %12 SDS PAGE jel görüntüsü (geri kazanım deneylerinden sonra), Kontrol: Yabancıl Tip ApoUnaG proteini

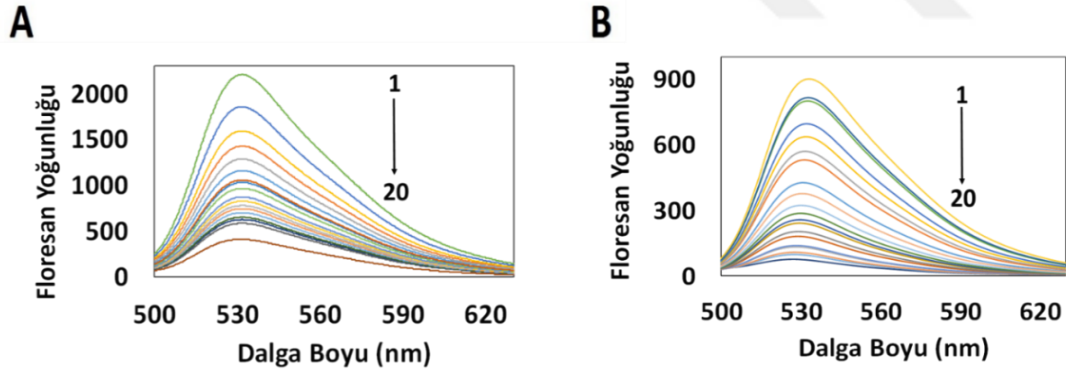
Ni-NTA agaroz rezin, nikel bazlı metal afinite kolonu ile His etiketli proteinlerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılır. Bu nedenle, Cu^{+2} ve UC-BR- Cu^{+2} kompleksleri, Apo-UnaG veya kolon ile herhangi bir etkileşime girmeden kolondan ayrılmıştır. Geri kazanım deneylerinden sonra elde edilen sonuçlara göre hem elüsyon hem de ApoUnaG'ın yaklaşık 27,3 kDa'da aynı bantta olduğu görülmüştür. Bu sonuç, ApoUnaG'ın bakır iyonları tarafından önemli ölçüde geri kazanıldığını kanıtlamıştır.

UnaG* proteininin geri kullanılabilirliği için üzerine UC-BR eklendikten sonra floresans spektroskopisi ile floresan yoğunluğu ölçümleri yapılmıştır. Mikro hacimli spektrofotometrede geri kazanılan proteinin konsantrasyonu 0,255 mg/mL olarak ölçülmüştür. Elde edilen saflaştırma ürünü UV ışık altında ve gün ışığı altında gözlemlenmiştir (Şekil 4-10).



Şekil 4-10 HoloUnaG ve Apo/HoloUnaG* proteinlerinin floresan ışıklarının karşılaştırılması **A:** Gün ışığında, **B:** UV ışık altında. 1. UnaG-UC-BR (0,31 mg/mL), 2. UnaG-UC-BR-Cu²⁺ 3. UnaG* (0,255 mg/mL), 4. UnaG*-UC-BR

UnaG*'ın tekrar kullanılabilirliği için yapılan bir diğer çalışma ise Cu²⁺ ile floresan titrasyondur. UnaG*-UC-BR floresan kompleksine artan miktarlarda Cu²⁺ ilavesiyle floresan şiddetinin sönümlenmesi gösterilmiştir. Geri kazanımın karşılaştırılması için aynı işlem UnaG-UC-BR kompleksine de uygulanmıştır (Şekil 4-11).



Şekil 4-11 Cu²⁺ iyon konsantrasyonunun 1 ila 20 eşdeğerde arttırılması üzerine (A) UnaG-UC-BR, (B) UnaG*-UC-BR'nin floresans spektrumları

Yapılan çalışmalar UnaG proteininin geri kazanıldığını ancak, elde edilen floresans spektrumlarına ve konsantrasyon ölçümlerine göre geri kazanımda kayıpların yaşanmasına bağlı olarak floresan şiddette ve konsantrasyonda düşüşlerin gözlemlenmiştir.

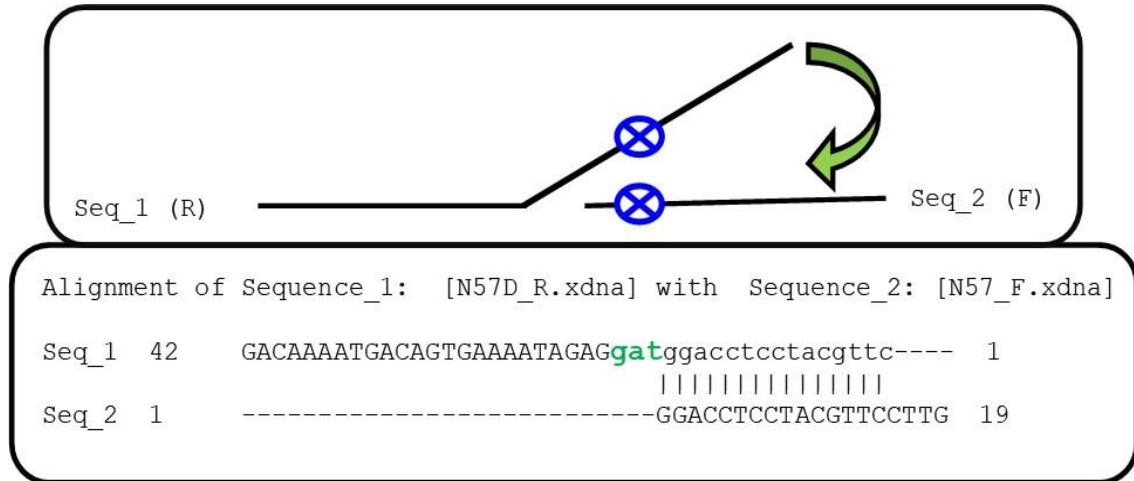
4.3. Mutasyon İşlemleri

Son yıllarda moleküler klonlama çalışmalarında nokta mutasyonlar için daha hızlı ve başarılı bir yöntem olması nedeniyle SLIC (sequence- and ligation-independent cloning)

yöntemi bu tez kapsamında da varyant UnaG proteinlerini elde etmek amacıyla tercih edilmiştir. Bu yöntemde reaksiyonun başlangıcında, T4 DNA polimerazın eksonükleaz aktivitesinin insört ve vektör arasındaki örtüşmeyi tam sağlaması için dNTP'ler reaksiyon ortamına ilave edilmeden süreç başlatılır. Örtüşme sağlandıktan sonra, reaksiyon ortamına dCTP tamponu eklenerek enzimin polimeraz aktivitesi göstermesi sağlanır ancak eklenen bu tamponda tam bir dNTP seti olmadığı için reaksiyon durur. Sonuçta birbirinin komplementeri olan 4 uç oluşur ve bu uçlar korunarak transformasyon yapılır. Transformasyon sürecinde *E.coli* oluşan uçları tamir eder. Protokolün bu modifikasyonu sayesinde yapılacak olan herhangi bir vektörün içine sekanstan bağımsız bir insört yerleştirme gerçekleştirilebilir.

Mutasyon noktalarındaki amino asitlerden bazıları bilirubinün UnaG'a bağlanması açısından önem arz ederken, bazıları floresan ligand bölgesinde olması nedeniyle dikkat çekmektedir. Bir kısmı ise yeri ve yapısı itibari ile aromatik halka içeren başka bir amino asit ile değiştirilmiş olanlardır. Mutasyonların kimyasal yapı değişimi Ek-A'da sunulmuştur.

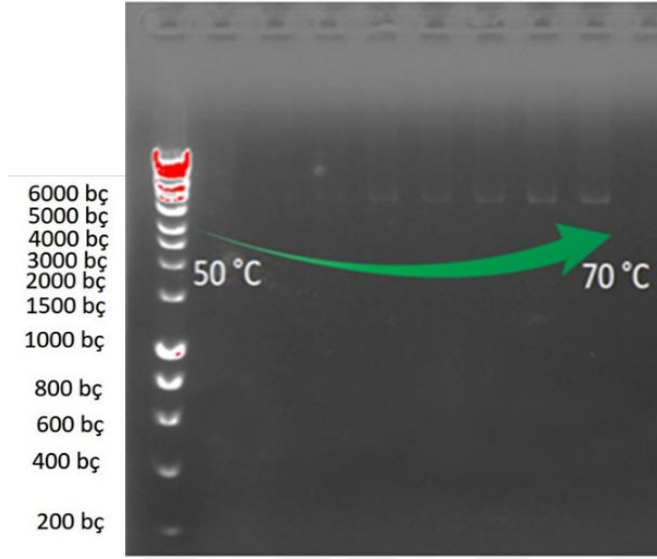
Yöntemde primer tasarımı mutasyonlar primerlerin içerisinde yer almakta olup tasarlanan bu mutajenik primerlerle PCR reaksiyonu yapılmıştır (Şekil 4-12).



Şekil 4-12 SLIC reaksiyonunda tek nokta mutasyonlar için tasarlanan mutajenik primer eşleşmesi

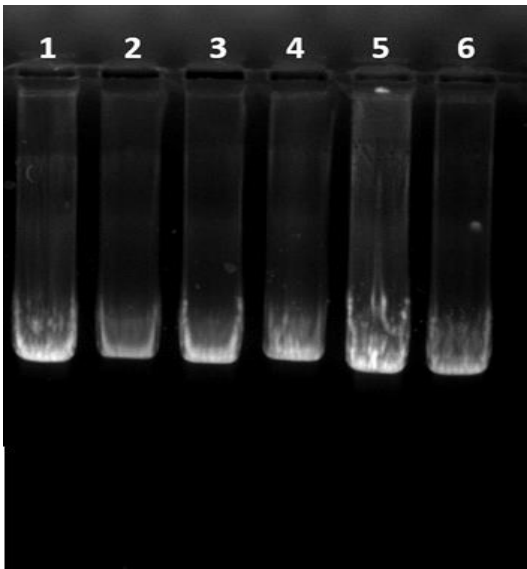
Primerler ve polimeraz enzimi için uygun çalışma sıcaklığı (annealing temperature) belirlenmek adına yapılan gradient PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 4-13'de sunulmuştur. Şekle göre, 50-

70°C arasında uygulanan PCR reaksiyonu sonucu en parlak ve belirgin bandın 70°C'de olduğu gör÷lmektedir.



Şekil 4-13 Gradient PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüsü

➤ **Tek nokta mutasyonlar için:** Bu optimizasyon basamağının ardından reaksiyon hacmi artırılarak Çizelge 3-2'de belirtilen miktarlar doğrultusunda klasik PCR reaksiyonu her bir tek nokta mutasyonu için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ürünleri elektroforez sisteminde yürütüldükten sonra (Şekil 4-14) mutasyona uğramış lineer pToIT-UnaG gen dizisi jelden saflaştırılmıştır.



Şekil 4-14 Her bir tek nokta mutasyon için yapılan PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi; 1. N57D, 2. N57E, 3. N57R, 4. L41F, 5.F17M, 6.F17Y

Safılaştırma işleminin ardından her bir lineer plazmitin konsantrasyonu mikro hacimli spektrofotometrede ölçülmüş olup sonuçları Çizelge 4-1’de (SLIC’ten önce konsantrasyon) sunulmuştur. Tekrar halkasal plazmid elde etmek için SLIC reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen halkasal plazmitlerle plazmid çoğaltılması amacıyla transformasyon yapılmıştır.

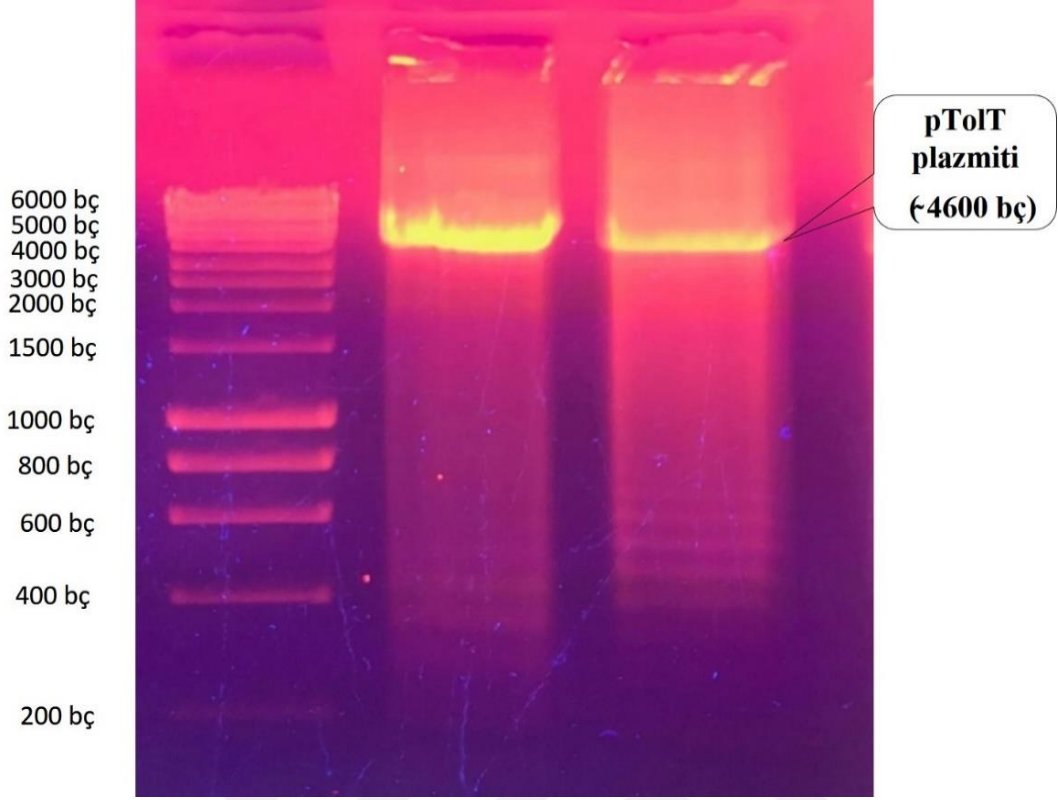
Plazmid izolasyonunun ardından her birinin konsantrasyonu mikro hacimli spektrofotometrede ölçülmüştür (Çizelge 4-1, SLIC’ten sonra konsantrasyon).

Çizelge 4-1 Tek nokta mutasyonlar için SLIC reaksiyonu öncesi ve sonrası plazmid konsantrasyonu

Mutasyon	SLIC’ten önce konsantrasyon (ng/μL)	SLIC’ten sonra konsantrasyon (ng/μL)
N57D	427,78	110,64
N57E	118,43	116,81
N57R	316,01	116,44
L41F	341,07	108,83
F17M	114,49	119,08
F17Y	147,59	117,43

Transformasyon işleminin ardından elde edilen kolonilerden Çizelge 3-6’da belirtilen miktarlarla koloni PCR yapılarak, sekans analizine göndermek için pozitif koloniler seçilmiştir (Şekil 4-16).

➤ **İkili nokta mutasyonlar için:** Lineerleştirilen pTolT plazmitinin agaroz jelden saflaştırılması yapılmıştır (Şekil 4-15). Plazmid izolasyonunun ardından konsantrasyonu mikro hacimli spektrofotometrede 280,77 ng/μL olarak ölçüldükten sonra SLIC reaksiyonunda kullanmak üzere son konsantrasyonu 100 ng/μL olacak şekilde seyreltilmiştir. Çizelge 3-5’de belirtilen miktarlar doğrultusunda gerçekleştirilen SLIC reaksiyonunun ardından transformasyon yapılmıştır.

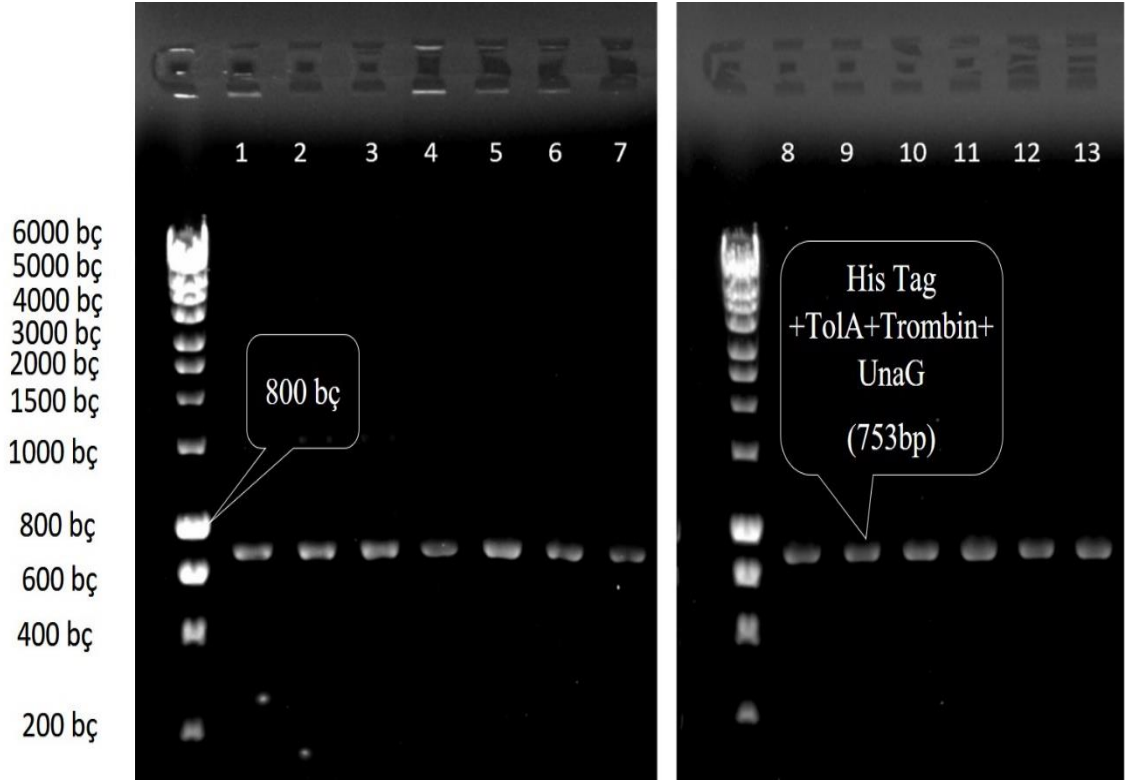


Şekil 4-15 Lineerleştirilen Plazmitin jel ekstraksiyondan önceki %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüsü

Transformasyon işleminin ardından elde edilen kolonilerden Çizelge 3-6'ya göre koloni PCR yapılarak, sekans analizine göndermek için pozitif koloniler seçilmiştir (Şekil 4-16). Koloni PCR'da beklenen, His Tag+TolA+Trombin+UnaG bandının 750 baz çifti seviyesinde olmasıdır. Agaroz jel görüntüsü bu beklentiyi doğrular niteliktedir. Çizelge 4-2, SLIC yöntemi ile ikili nokta mutasyonları yapıldıktan sonra plazmid saflaştırmadan elde edilen plazmitlerin konsantrasyonlarını göstermektedir.

Çizelge 4-2 SLIC yöntemi ile İkili nokta mutasyonları yapıldıktan sonra elde edilen plazmitlerin konsantrasyonları

Mutasyon	Konsantrasyon (ng/ μ L)	Mutasyon	Konsantrasyon (ng/ μ L)
T61A_T37A	165	W9F_W103F	140
T61S_T37S	141,4	Y99F_Y134W	142,7
T61V_T37V	160,9	Y99M_Y134M	127



Şekil 4-16 Koloni PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen jel görüntüsü; 1. T61A_T37A, 2. T61S_T37S, 3. T61V_T37V, 4. Y99F_Y134W, 5. Y99M_Y134M, 6. W9F_W103F, 7. Pozitif Kontrol (Yabancıl tip) 8. N57R, 9. N57E, 10. N57D, 11. L41F, 12.F17M, 13.F17Y

4.4. Sekans Analizi

Koloni PCR yapıldıktan sonra pozitif olduğu düşünülen ve plazmid izolasyonu yapılan varyantların DNA sekansının doğruluğunun kontrolü amacıyla DNA dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen sekanslama sonuçları, SLIC reaksiyonunun başarıyla yapıldığını ve tasarlanan 12 varyant UnaG proteinini eksprese etmek için plazmitlerin doğrulanmasını sağlamıştır. Dizi analizi sonuçları hem nükleotid dizi kromotogramı olarak “FinchTV Sequence Analyzer” programında hem de amino asit dizisi olarak “ExpASY Translate Tool” web uygulaması ile kontrol edilmiş ve tüm mutanlara ait sonuçlar Ek-B’de işaretlenerek sunulmuştur.

4.5. Varyant UnaG Proteinlerinin Üretim, Ayırma ve Saflaştırma Süreçleri

Varyant UnaG proteinlerinin üretilmesi için tüm plazmitlerin ayrı ayrı *E.coli* C41 suşuna transformasyonu yapılmıştır. Transforme hücrelerden ölçek büyütme ile protein üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretim aşamasında *E.coli* hücrelerinin belirlenen yoğunluğa ulaştıktan sonra indüklenmesinin ardından saatte bir alınan örneklerle üretimin

gerçekleştiği, alınan örneklerin elektroforez jeline yüklenmesiyle gösterilmiştir. SDS PAGE jelinde 27,3 kDa seviyesinde gözlenen bantların varlığı, varyant UnaG proteinlerinin üretildiğini göstermiştir.

Saflaştırma işlemlerinin tamamı proteinlerin degrades olmasını engellemek amacıyla +4°C’de yapılmıştır. Saflaştırma süreci Ni-NTA agaroz rezin ve TALON Metal Affinity Resin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4-3’de proteini daha saf elde etmek adına kolonun yıkanmasında kullanılan yıkama solüsyonlarının içerikleri verilmiştir. Farklı imidazol konsantrasyonlarına sahip olan bu solüsyonlar tüm saflaştırma süreçleri boyunca dolapta saklanmıştır.

Çizelge 4-3 Varyant UnaG proteinlerine ait saflaştırma basamaklarında kullanılan yıkama solüsyonlarının içerikleri

Ladder (BioRad Presicion Plus Dual Color Protein Ladder)
Yıkama1 (0 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)
Yıkama2 (1 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)
Yıkama3 (10 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)
Yıkama4 (25 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)
Yıkama5 (50 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)
Yıkama6 (75 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)
Yıkama7 (100 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)
Yıkama8 (150 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)
Elüsyon (350 mM İmidazol_ pH:7,5 fosfat tamponu)

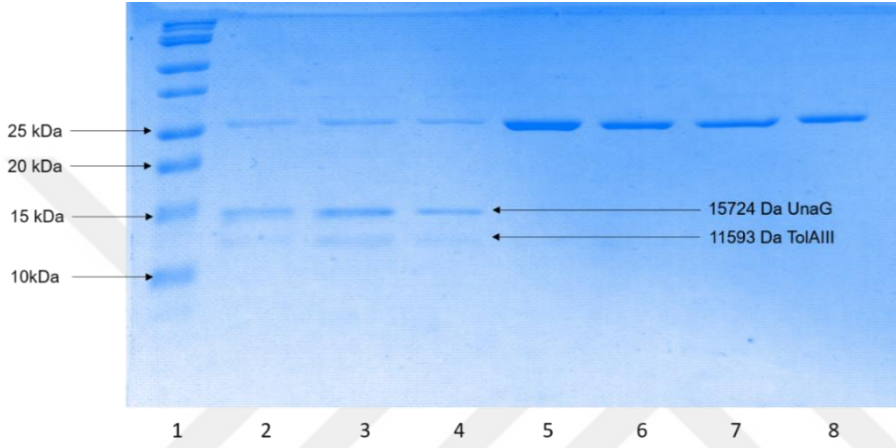
4.6. Varyant UnaG Proteinlerinin Karakterizasyon Çalışmaları

Yabanıl tip ve 12 varyant UnaG proteininin üretim, ayırma ve saflaştırma basamaklarından sonra elde edilen saf proteinlere karakterizasyon işlemleri uygulanmıştır.

4.6.1. Yabanıl tip UnaG proteini thrombin enzim kesimi

Kesim çalışmaları Merck (Novagen) 69671| Thrombin, Restriction Grade kiti kullanılarak üreticinin önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Yapılan kesim çalışmalarından anlaşılacağı üzere proteinin katlanmış halinde thrombin enzimi kendi kesim bölgesine ulaşamamakta ve kesimi gerçekleştirilememektedir (Şekil 4-17). Bu

durum proteinin kesim öncesi kaynatılarak lineer hale getirilmesi sonrası kesilebilmesiyle gösterilmiştir. Yaban tipli UnaG proteini ile gerçekleştirilen floresan çalışmaları, literatürde belirtilen yalın UnaG proteininin floresan özelliklerinden herhangi bir sapma göstermemiştir. Füzyon protein bilirubin afinitesi açısından, yalın UnaG ile son derece benzer sonuçlar vermiştir. *E.coli* TolAIII proteininin bilirubine karşı bir afinitesi bulunmamaktadır. Bu nedenle proteinin füzyonundan ayrılmasına gerek kalmamıştır.



Şekil 4-17 Thrombin kesim çalışmaları 1. BioRad Precision Plus Protein Marker, 2. Kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+2 ünite thrombin, 3. Kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+5 ünite thrombin, 4. Kesim öncesi kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+10 ünite thrombin, 5. Kesim sonrası kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+2 ünite thrombin, 6. Kesim sonrası kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+5 ünite thrombin, 7. Kesim sonrası kaynatılmış 10 µL 0,5 mg/mL UnaG+10 ünite thrombin, 8. Kontrol

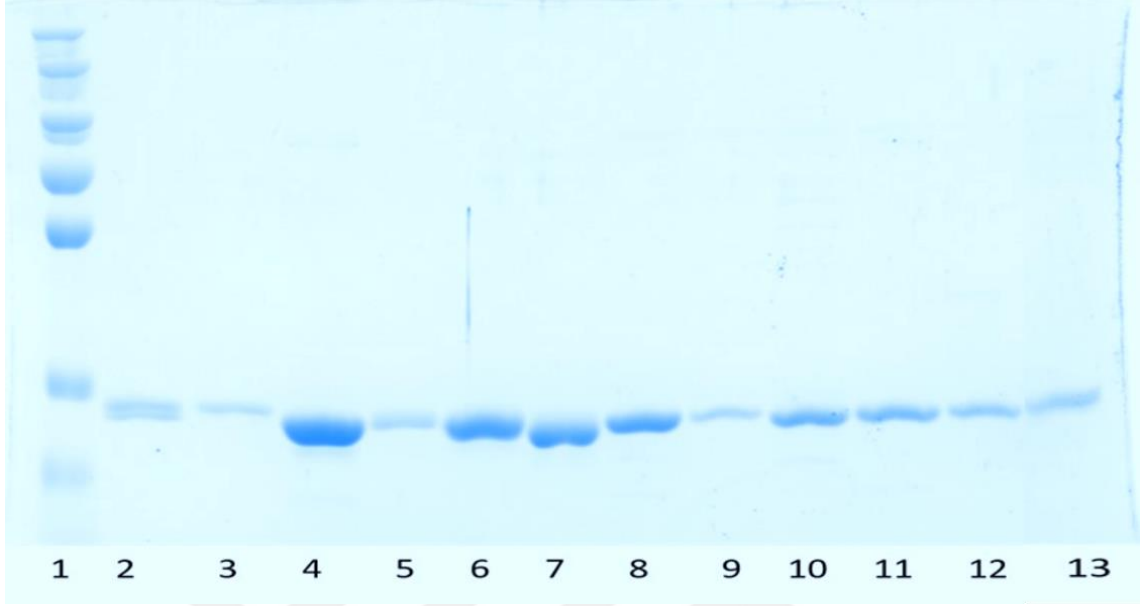
4.6.2. Elektroforez uygulamaları

Saflaştırma sürecinde elde edilen fraksiyonların saflık derecelerinin kontrolü için her birinden örnek alınarak hazırlanmış ve %12'lik SDS PAGE jelindeki kuyucuklara yüklenip yürütülmüştür. Elektroforetik işlemler tamamlandıktan sonra jel görüntüleri Biorad ChemiDoc™ MP görüntüleme cihazında görüntülenmiş ve kaydedilmiştir (Ek-C).

Tüm Varyant Proteinler

E.coli C41 suşunda ekspres edilen tüm UnaG varyantları içerisinde safsızlık içerenler 8-10 kDa MWCO değerine sahip diyaliz membranı ile diyaliz edilerek imidazolden arındırılmış ve ikinci aşama olarak tekrar saflaştırılmıştır. İkinci aşama saflaştırma çalışmalarında 6xHisTag için Ni-NTA'ya göre daha yüksek spesifitede afinite gösteren

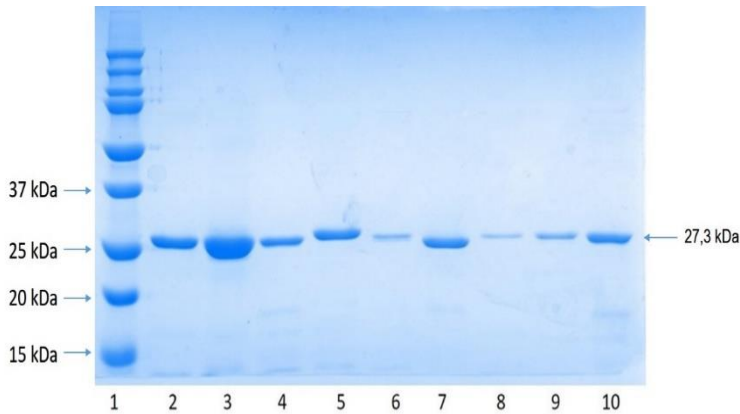
TALON kolan kullanılmış ve karakterizasyon çalışmalarında Şekil 4-18'de görülen numuneler kullanılmıştır.



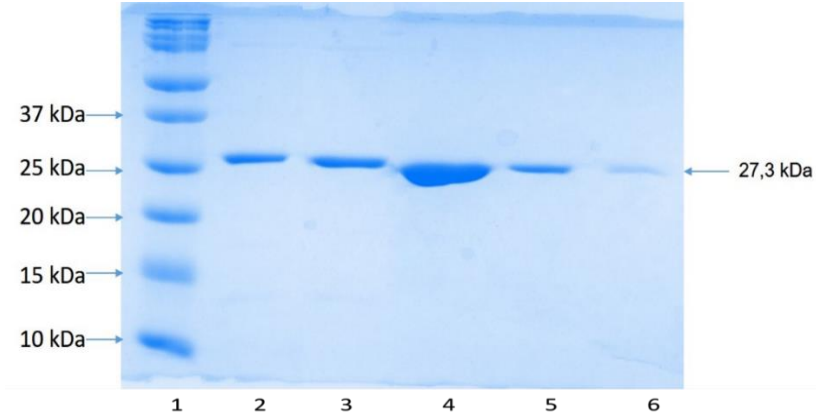
Şekil 4-18 Analizlerde kullanılan proteinlerin SDS PAGE jel görüntüsü 1. Ladder, 2. N57D, 3. N57E, 4. N57R, 5. F17M, 6. F17Y, 7. L41F, 8. Y99F_Y134W, 9. Y99M_Y134M, 10. T61A_T37A, 11. T61S_T37S, 12. T61V_T37V, 13. W9F_W103F

4.6.3. Western Blot ile protein analizi

Western blot yöntemiyle UnaG ve varyantlarının kalitatif analizi gerçekleştirilmiştir. Anti HisTag ile gerçekleştirilen Western blotlama işleminde 6xHisTag'a sahip rekombinant UnaG varyantlarının varlığı gösterilmiştir.

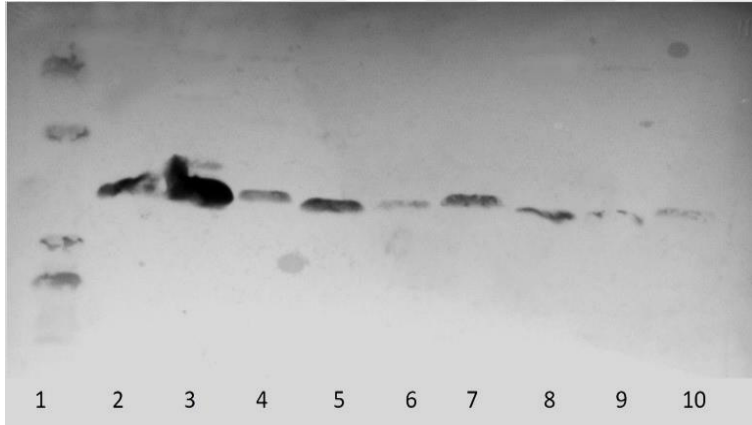


Şekil 4-19 Western Blot öncesi SDS PAGE 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabancı Tip UnaG, 3. F17M, 4. F17Y, 5. N57E, 6. N57R, 7. N57D, 8. L41F, 9. Y99F_Y134W, 10. Y99M_Y134M

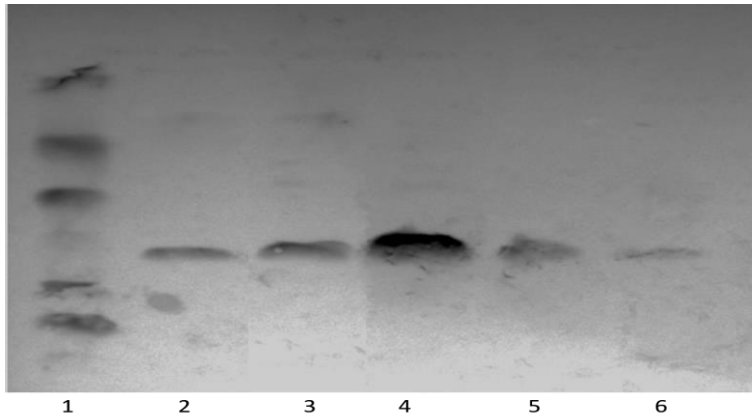


Şekil 4-20 Western Blot öncesi SDS PAGE 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. T61S_T37S, 4. T61V_T37V, 5. T61A_T37A, 6. W9F_W103F

Şekil 4-19 & 4-20 Western Blotta kullanılan %12'lik SDS PAGE jelleri birbirinin paraleli olup selüloz membrana proteinlerin geçip geçmediğini mukayese etmek için yapılmıştır.

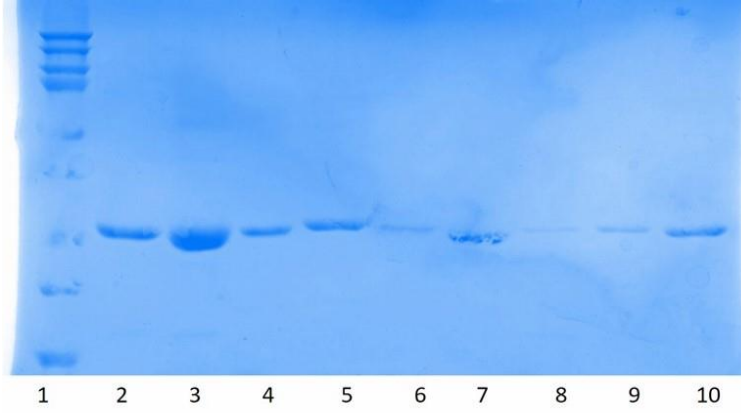


Şekil 4-21 Western Blot 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. F17M, 4. F17Y, 5. N57E, 6. N57R, 7. N57D, 8. L41F, 9. Y99F_Y134W, 10. Y99M_Y134M

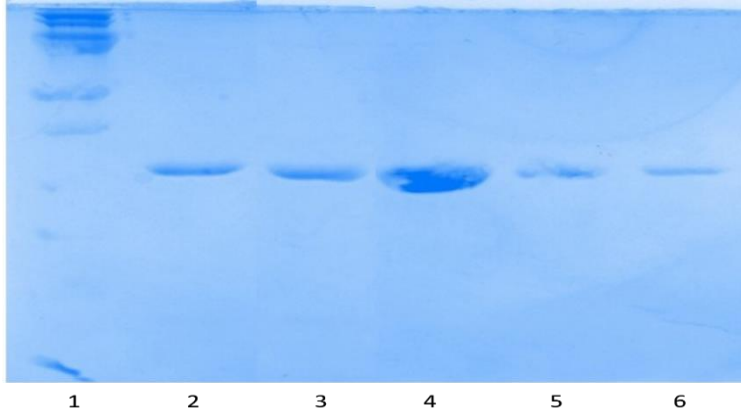


Şekil 4-22 Western Blot 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabanıl Tip UnaG, 3. T61S_T37S, 4. T61V_T37V, 5. T61A_T37A, 6. W9F_W103F

Şekil 4-21 & 4-22 proteinlere Western Blot yöntemi uygulandıktan sonra alınan selüloz membran jel görüntüsü olup hedef proteinlerimizin varlığını göstermiştir.



Şekil 4-23 Western Blot sonrası SDS PAGE 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabani Tip UnaG, 3. F17M, 4. F17Y, 5. N57E, 6. N57R, 7. N57D, 8. L41F, 9. Y99F_Y134W, 10. Y99M_Y134M



Şekil 4-24 Western Blot öncesi SDS PAGE 1. BioRad Presicion Plus Protein Marker, 2. Yabani Tip UnaG, 3. T61S_T37S, 4. T61V_T37V, 5. T61A_T37A, 6. W9F_W103F

Şekil 4-23 & 4-24 SDS PAGE jeline Western Blot yöntemi uygulandıktan sonra alınan görüntüleme sonucudur.

4.6.4. CD spektroskopisi

CD son yıllarda çözelti içerisinde proteinlerin yapılarının analiz edilmesinde kullanılan hızlı ve kolay uygulanabilir bir metot olarak araştırmacıların sıklıkla başvurduğu analiz yöntemlerinden birisidir. Spektropolarimetre cihazında bir sinyal alabilmek için molekül içerisinde en azından bir tane kiral merkezin bulunması gereklidir. Bu da karbon atomunun farklı 4 grupta bağ yapması, proteinlerin 3 boyutlu konformasyonlarını stabilize eden disülfit çapraz bağların varlığı, molekülün kiral

merkeze sahip başka bir molekülle kovalent olarak bağ yapması veya asimetrik çevresel şartlara sahip olması durumunda gerçekleşebilir (Kelly ve ark., 2005). Proteinlerde genellikle peptid bağları CD sinyalini oluşturan kromofor olarak kullanılırlar. Sonuç itibarıyla bir protein molekülünden alınan CD sinyalleri onun çevresel şartları veya bağlandığı liganda bağlı olarak değişir. Aslında CD sinyalinde meydana gelen değişim protein ligand etkileşiminin bir belirteci olarak görülmektedir. Ek-D'de görüleceği üzere tüm mutantlarda ApoUnaG, UC-BR ile etkileşerek HoloUnaG'ın meydana gelmesine yol açmış ve bunun bir sonucu olarak proteinin 3 boyutlu yapısında bir değişimin meydana gelmesine sebep olmuştur. Far UV CD ölçümünde meydana gelen bu kayma TolAIII-UnaG proteini ile UC-BR'nin bağladığına işaret etmektedir. Far UV CD sinyalinden anlaşılacağı üzere *E.coli*'de TolAIII ile birlikte füzyon olarak üretilerek saflaştırılan protein varyantlarının tamamı 3 boyutlu konformasyonunu kazanmıştır. CD sinyali proteinde baskın olan sekonder yapının antiparallel β -sheet olduğuna işaret etmektedir.

Proteinlerin UV-CD spektrumları polipeptit zincirinin ikincil yapısı hakkında bilgi sağlar. Yabanıl tip ve mutant UnaG proteinleri için ve ayrıca UC-BR varlığında, ikincil yapılarını kazandıkları söylenebilir. T61V_T37V, W9F_W103F, Y99M_Y134M ve L41F'nin CD spektrumlarına bakıldığında, 215-220nm'deki negatif tepe ve 208nm'deki negatif tepe, proteinin ikincil yapı içeriğindeki α -sarmal oranının artmaya başladığına işaret etmektedir. Fenilalanin içindeki fenil halkasının π - π etkileşimlerini arttırdığı ve böylece proteinin sekonder yapısındaki α -sarmal oranına katkıda bulundu düşünülmüştür. Yabanıl tip ve diğer tüm mutant UnaG proteinlerinde 215-220 nm'de zayıf fakat geniş negatif absorpsiyon piklerine sahip olmasıyla n - π * geçişinin olduğu görülmüştür. Bu dalga boyu aralığındaki karakteristik geçiş, β -sheet oranının proteinin ikincil yapı içeriğinde yüksek olduğunu göstermektedir.

4.6.5. Termal açılma sıcaklıkları

Proteinlerin stabilitesi ile sekonder yapı yüzdesi arasında dolaylı bir ilişki vardır. Proteinlerin tüm katlanması ve stabilitesi, bulunduğu sıcaklığa, tamponuna, elektrik yüküne, pH ve ikincil yapıya bağlıdır. Mutasyonlar sonucunda π - π etkileşimlerinde, hidrojen bağlarında ve diğer moleküler etkileşimlerde artmalar veya azalmalar proteinin ikincil yapılarında değişikliklerin olduğunu göstermektedir.

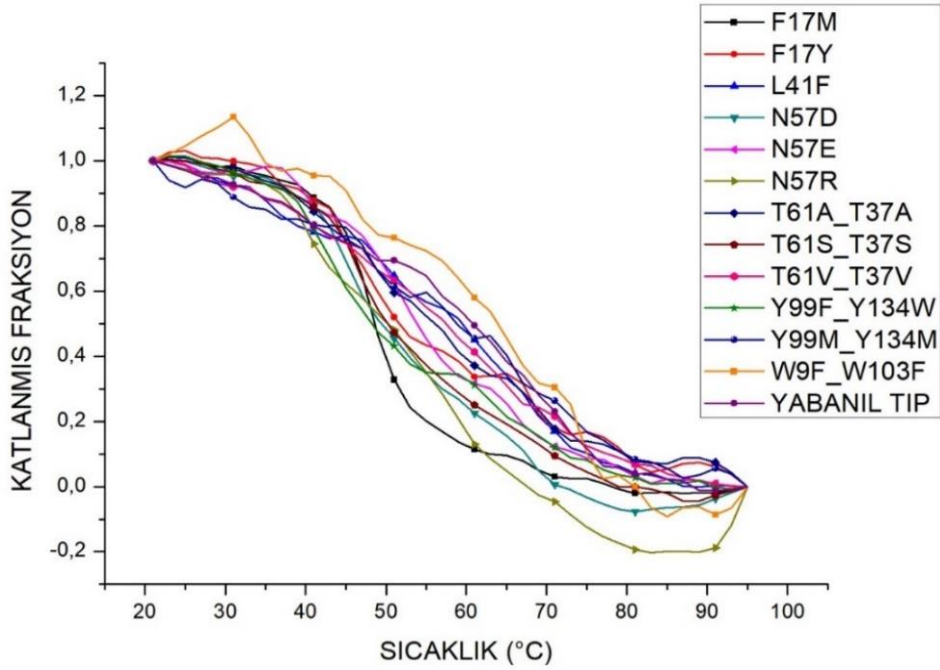
Far UV CD spektrumu sonuçlarına göre sekonder yapılarını kazanmış oldukları görülen UnaG varyantları için yine Jasco 810 spectropolarimeter cihazı kullanılarak termal açılma (thermal unfolding) sıcaklıkları belirlenmiştir (Çizelge 4-4). Normalize edilerek sunulan termal açılma sonuçları katlanmış fraksiyon miktarındaki sıcaklık artışına bağlı azalma cinsinden Ek-E’de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre tüm varyantların yabancı tip UnaG ile (ApoUnaG için 63°C; HoloUnaG için 65°C) benzer termal açılma sıcaklığına sahip olduğu belirlenmiştir. Mutantlardan Y99F_Y134W; Y99M_Y134M; T61A_T37A; N57E için Apo ve HoloUnaG versiyonları arasında herhangi bir termal açılma sıcaklık farkı gözlenmemiştir. Tüm mutantlar ve yabancı tip dikkate alındığında T61S_T37S ve F17M varyantında Apo ve HoloUnaG arasındaki termal açılma sıcaklık farkı en yüksek seviyeye ulaşmıştır (~ 8°C). UC-BR ile bağlandığında termal açılma sıcaklığı azalan tek varyant L41F olmuştur. Bu verilerden T61S_T37S varyantının holo versiyonunun en stabil varyant olduğu görülmüştür.

Çizelge 4-4 Yabancı tip ve varyant UnaG Apo/Holo proteinlerine ait termal açılma sıcaklıkları

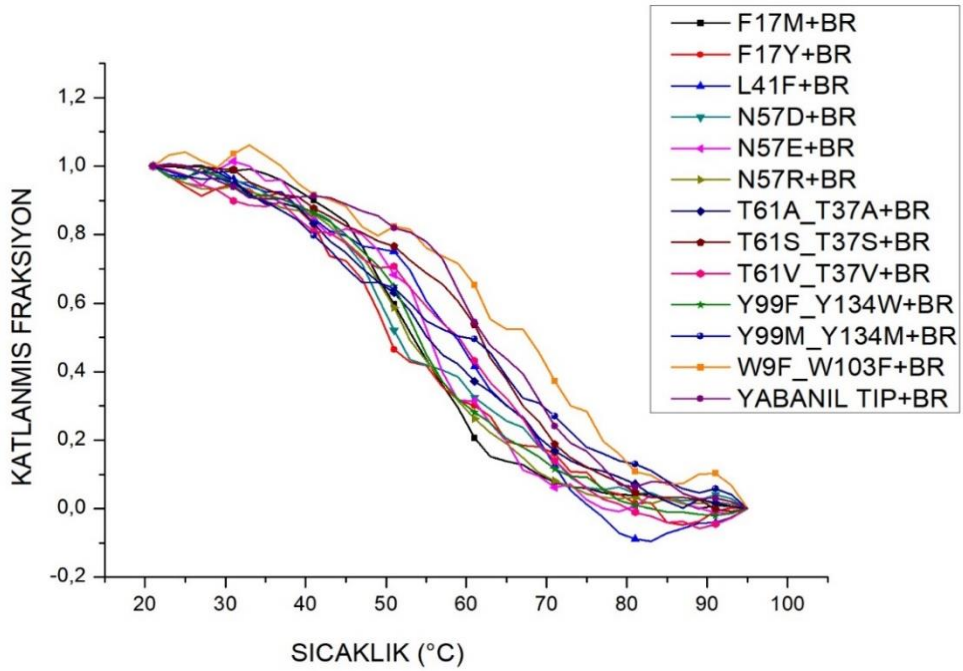
Protein Varyantı	ApoUnaG (UC-BR’siz)	HoloUnaG (UC-BR’li)
Yabancı Tip	63°C	65°C
Y99F_Y134W	58°C	58°C
Y99M_Y134M	60°C	60°C
W9F_W103F	61°C	63°C
T61V_T37V	59°C	61°C
T61S_T37S	60°C	68°C *
T61A_T37A	59°C	59°C
N57R	58°C	60°C
N57E	57°C	57°C
N57D	59°C	65°C
L41F	60°C	59°C
F17M	50°C	58°C *
F17Y	60°C	65°C

Far UV CD spektrumlarının sonuçlarına göre, ikincil yapılarını kazandıkları görünen UnaG varyantları için sıcaklık artışına bağlı katlanmış fraksiyon miktarında bir azalma belirlenmiştir. Sıcaklığa karşı çizilen yabancı tip ve mutant UnaG proteinlerinin termal

denatürasyon eğrilerine bakıldığında, 20°C'de elde edilen maksimum Far UV CD sinyali, proteinin tamamen katlanmış durumunu gösterirken, erime sıcaklığı (T_m), proteinin %50'sinin açıldığı orta nokta geçişine eşdeğer olarak alınır. Yabanıl tip ve tüm varyant Apo/HoloUnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri Şekil 4-25 & 4-26'da sunulmuştur.



Şekil 4-25 Yabanıl tip ve tüm varyant ApoUnaG proteinlerine ait termal açılma grafiği



Şekil 4-26 Yabanıl tip ve tüm varyant HoloUnaG proteinlerine ait termal açılma grafiği

4.6.6. Floresans spektroskopisi

Floresan alışmaları kapsamında ilk olarak her bir varyanta ve yabanıl tipe ait eksitasyon ve emisyon noktaları belirlenmiştir. Elde edilen uyarım ve ışıma verilerine göre yabanıl tip HoloUnaG 498 nm’de en yüksek uyarılma pikini gösterirken; ışıma pikini yaklaşık 528 nm’de vermiştir. Elde edilen bu veri literatürde bildirilen sonuçlarla bire bir örtüşme göstermiştir. Bu manada TolAIII proteinin herhangi bir floresan kaymasına neden olmadığı belirlenmiştir. Diğer tüm elde edilen varyantlara ait uyarılma ve ışıma noktaları izelge 4-5’te, grafikleri Ek-F’de verilmiştir. Gerçekleştirilen floresans spektroskopisi çalışmalarına göre uyarılma ve ışıma noktaları açısından tüm mutantlar yabanıl tip ile benzer noktalarda pik vermiştir.

Çizelge 4-5 Varyant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışıma noktaları

Protein Varyantı	Uyarılma (λ_{ex})	İşima (λ_{em})
Yabanıl Tip	498 nm	528 nm
Y99F_Y134W	495 nm	528 nm
Y99M_Y134M	495 nm	532 nm
W9F_W103F	498 nm	527 nm
T61V_T37V	490 nm	525 nm
T61S_T37S	498 nm	531 nm
T61A_T37A	490 nm	532 nm
N57R	496 nm	530 nm
N57E	495 nm	530 nm
N57D	498 nm	530 nm
L41F	498 nm	527 nm
F17M	498 nm	525 nm
F17Y	504 nm	537 nm

Aromatik halkaların floresan yoğunluğu üzerinde bir etkisi olduğu bilinmektedir. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik kalıntıların ışığı absorbe etmek ve π elektronlar yoluyla polar temas sağlamak için modifiye edilebileceği dşnlmştir. Aromatik halkalar uygun bir aı ve mesafede olduğunda, aralarında sertliğe katkıda bulunan $\pi - \pi$ bağları oluşur. Floresan yoğunluğu genellikle kromofor yapısının kararlılığı ile ilişkilidir.

4.6.7. Varyantların bilirubin ile ayrışma sabitlerinin belirlenmesi

K_d değerinin büyüklüğü veya küçüklüğü ile ligandın bağlandığı moleküle ilgisi ters orantılıdır. Küçük K_d değeri ligandın bağlandığı moleküle ilgisinin fazla olduğunu gösterir.

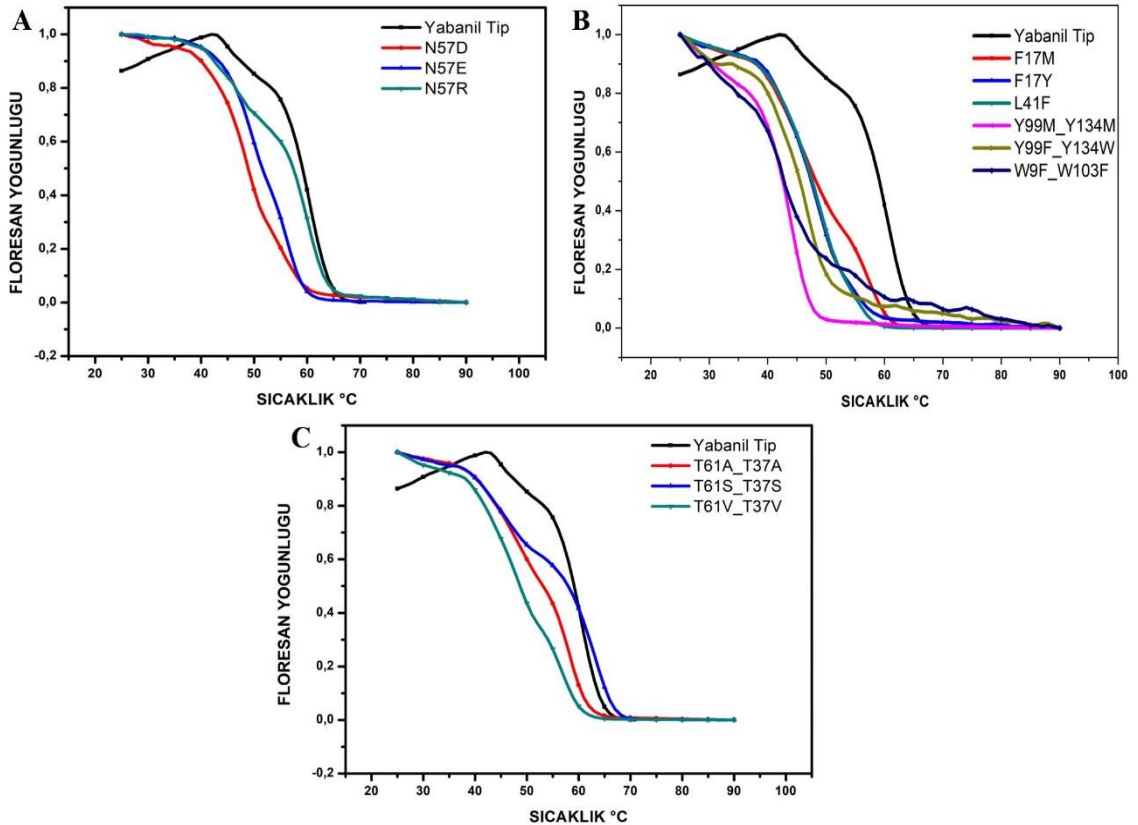
Literatürdeki verilere ve yapılan analiz sonucunda elde edilen sonuçlara göre yabancı tipli TolAIII-UnaG proteininin yaklaşık 100 nM civarında bir K_d değerine sahip olduğu görülmektedir. Yabancı tip ve geliştirilen varyantlar arasında L41F mutanlığı UC-BR'ye karşı yaklaşık 700 kat daha küçük bir K_d (0,14nM) değerine sahip olması nedeniyle çok daha yüksek bir afiniteye sahiptir ve bu yüzden çok daha hassas ölçümlerde kullanılabilceği öngörülmektedir. Geliştirilen varyantlar içerisinde sadece Y99F_Y134W mutasyonuna sahip UnaG versiyonunda K_d değeri yabancı tipe göre yükseliş gösterirken, diğerleri oldukça düşük K_d değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Elde edilen varyantlara ait ayrışma sabiti eğrileri Ek-G'de, verilmiştir

Çizelge 4-6 UnaG proteinlerine ait UC-BR için K_d değerleri

Protein Varyantı	K_d (nM UC-BR)
Yabancı Tip	103,51 ± 17,56
Y99F_Y134W	236,52 ± 34,15
Y99M_Y134M	19,92 ± 2,73
W9F_W103F	10,43 ± 1,89
T61V_T37V	23,04 ± 4,72
T61S_T37S	68,3 ± 17,43
T61A_T37A	27,08 ± 6,29
N57R	11,10 ± 1,3
N57E	13,00 ± 1,72
N57D	2,79 ± 0,2
L41F	0,14 ± 0,017
F17M	8,66 ± 2,17
F17Y	6,45 ± 0,5

4.6.8. Sıcaklığa bağlı floresan şiddeti

Gerçek zamanlı PCR’da yapılan analizde, tüm varyant UnaG proteinlerinin 35-40°C aralığında floresan şiddetinin düşmeye başladığını ancak yabancı tipin varyantların aksine yaklaşık 45°C’ye kadar floresan şiddetinin arttığı, sonrasında hızlı bir şekilde düştüğü görülmüştür. Y99M_Y134M varyantının floresan şiddetinin diğer varyantlara göre daha düşük bir sıcaklık olan 50°C’de sıfırlanmasıyla en düşük florofor bölge kararlılığına sahip olduğu söylenebilir. Bunun yanı sıra W9F_W103F ve Y99M_Y134W varyantlarının 65°C’ye kadar düşüğe olsa floresan şiddetine sahip olmaları florofor bölgelerinin diğer varyantlara göre daha dayanıklı olduğunu göstermektedir. T61S_T37S varyantının ise 68°C’ye kadar floresan özellik göstermesi, en stabil varyant olduğunu göstermekte ve bu veri termal açılma sıcaklıklarından elde edilen verilerle örtüşmektedir. Şekil 4-27, tüm varyantlara ait sıcaklığa bağlı floresan şiddetinin değişimini göstermektedir.



Şekil 4-27 Sıcaklığa bağlı floresan yoğunluğunda gözlenen değişimler; **A.** Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesini içeren mutasyonlar, **B.** Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesini içeren mutasyonlar, **C.** Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesini içeren mutasyonlar

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

2013 yılında Kumagai ve ark., tarafından keşfedilerek kristal yapısı açığa çıkarılan UnaG proteinine ait farklı varyantlar, protein mühendisliği teknikleriyle üretilerek saflaştırılmıştır. Kumagai ve ark., (2013) gerçekleştirdikleri çalışmada UnaG proteininin Un-konjuge bilirubine spesifik olarak bağlandığını ve bu sayede HoloUnaG'a dönüşerek ışık spektrumunun yeşil bölgesinde floresan ışımaya yaptığını belirlemişlerdir. Bu çalışmadan hareketle geliştirilen tez kapsamında Un-konjuge bilirubine karşı UnaG proteininin algılayıcı olarak kullanılabileceği bir bilirubin biyosensörünün geliştirilmesi için UnaG proteininin farklı varyantlarının elde edilmesi ve bu varyantların biyofiziksel karakterizasyonlarının yapılması bu tezin temel amacını oluşturmaktadır.

UnaG proteininin yüksek yapılı bir organizma kaynaklı olması nedeniyle prokaryotik üretim sisteminde inklüzyon cisimciği oluşturma ve toksisite gösterme ihtimaline karşı UnaG proteininin ve varyantlarının ekspresyonu çalışmalarının *E.coli* pTolT ekspresyon sisteminde TolAIII proteini ile birlikte füzyon olarak yapılması tercih edilmiştir.

Yabanıl tip üretim ve optimizasyon işlemleri başarıyla gerçekleştirilmiştir. *E.coli* C41 suşu özellikle yavaş gelişmesi ve heterolog protein ekspresyonunu yavaş yapması nedeniyle yüksek yapılı canlılara ait proteinlerin ve de özellikle toksik proteinlerin üretilmesinde sıklıkla kullanılan bir *E.coli* çeşididir. Bu nedenlerden dolayı ve Şekil 4-2'de görülen SDS görüntüsündeki protein bantlarına göre konakçı hücre olarak *E.coli* C41 suşu yabanıl tip UnaG proteinini daha iyi eksprese ettiği için seçilmiştir. SDS PAGE jelinde 27,3 kDa seviyesinde gözlenen bantların yabanıl tip UnaG proteinine ait olduğu gösterilmiştir (Şekil 4-3). Ayırma süreçlerinde parçalama yöntemi olarak enzimatik ve mekanik yöntemler kullanılmış ve ardından ultrasantrifüj ile hücre kalıntıları çöktürülmek suretiyle hedef proteinin süpernatantta kalması sağlanmıştır. Saflaştırma yöntemi olarak 6xHis-Tag afinite kuyruğu kullanılarak afinite kromatografisi yöntemi kullanılmış olup Ni-NTA agaroz rezin ve/veya TALON rezin ile hazırlanan kolonlara süpernatant aktarılmıştır. Kromatografi sonucu elde edilen fraksiyonlardan alınan örnekler SDS PAGE yöntemiyle analize tabi tutulmuş ve proteinin saf bir şekilde elde edildiği gösterilmiştir. Ayrıca üretilen yabanıl tip UnaG proteini için floresans spektroskopisi, CD spektroskopisi, sıcaklığa bağlı floresan

değişim analizi, Western Blotlama ve termal açılma sıcaklıklarının belirlenmesi gibi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda nokta mutasyonlar için farklı yöntemler bulunmuştur. Bu tez kapsamında uygulaması kolay, hızlı ve başarı yüzdesi yüksek olması nedeniyle SLIC yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle bilirubin bağlanma bölgesini direkt ve/veya indirekt etkileyecek şekilde UnaG proteininin amino asit sekansında hem tek noktada mutasyon içeren hem de iki farklı noktada mutasyon içeren olmak üzere toplamda 12 farklı mutasyon yapılarak, tüm genetik manipülasyonların doğruluğu DNA sekans analizi ile belirlenmiştir. Mutasyon noktaları polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesini içeren mutasyonlar (N57D, N57E, N57R), bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesini içeren mutasyonlar (F17M, F17Y, L41F, Y99F_Y134W, Y99M_Y134M, W9F_W103F) ve floresan ligandın çevresinin değiştirilmesini içeren mutasyonlar (T61A_T37A, T61S_T37S, T61V_T37V) olarak üç ayrı grupta gerçekleştirilmiştir.

Kumagai ve ark., (2013), asparajin (N57)'deki glutamik asit ve alanin mutasyonlarının bilirubin bağlanması için önemli olduğunu ve ayrıca serinin (S80) bilirubin bağlanma bölgesinde bulunduğunu bildirmiştir. UnaG'in olası konfigürasyonuna göre, N57 ve S80'nin bulunduğu nokta döngü bölgesidir. Amino asit dizisinin dikkatli analizi ile, bu döngülerin, pozitif ve negatif yüklü kalıntılar arasında oluşan elektrostatik köprüler sonucunda oluştuğu bulunmuştur. Asparajin peptid bağından dolayı zayıf hidrojen bağı yapar. Asparajinde ki elektron verici gruplar, elektronlarını kendi içinde rezonans yaptırır. Glutamik asit, aspartik asit ve arjinin bilirubin ile güçlü hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşim yapabilir. Bu noktada yapılan mutasyonlar sonucu çok daha kuvvetli hidrojen bağı yapabilen gruplar eklenmiş ve moleküller arası etkileşim hidrojen bağı üzerinden arttırılmıştır. Daha zayıf hidrojen bağı yapma kabiliyetine sahip asparajin ile daha kuvvetli bir hidrojen bağı yapabilen moleküller arası etkileşimi artıran glutamik asit, aspartik asit ve arjinin yer değiştirilmiştir. Bir amino asit değişimiyle bu güçlü hidrojen bağları oluşturulmuş ve böylece K_d değerleri hesaplanarak afinitenin arttığı gösterilmiştir.

Fenilalanin, fenil halkası üzerindeki π bağları nedeniyle lösinden daha az polardır. Fenil halkası π - π etkileşimlerine katkıda bulunduğu için alfa sarmalı oranı artar. Lösün (L41)

bilirubin bağlanma bölgesinde olmamasına rağmen, UnaG proteininde florofor bölgesinin oluşumunda etkilidir. Bu noktada aromatikliğin etkisi L41F mutasyonu ile araştırılmıştır ve ayrışma sabiti hesaplanmıştır.

Fenilalanindeki fenil halkası güçlü π - π etkileşimleri yapabilir. Buna karşın metiyoninde güçlü hidrojen bağları yapabilen kükürt ve tirozinde bir hidroksil grubu vardır. F17M mutasyonu ile fenilalanin metiyonin ile yer değiştirilmiştir. Kükürt, fenil halkasına göre polariteyi artırır ve hidrojen bağına olumlu yönde katkıda bulunur. Ayrıca daha büyük bir molekül olan fenil alanin yerine metiyonin eklenmesiyle sterik engel azaltılmıştır. Dolayısıyla hem sterik etkinin ortadan kalkması hem de polar hidrojen bağı yapabilecek bir grubun eklenmesiyle afinite artırılmıştır. Aromatik halka hidrojen bağları oluşturmadığından, bilirubin ve fenilalaninin benzen halkasındaki aromatik piron halkaları birbirine yaklaşarak π - π bağları kurmak isteyecektir. Ama sterik engelden dolayı bu etkileşim çok etkili değildir. Fenil alanin yerine metiyonin getirilmesiyle, kükürt sayesinde daha etkili hidrojen bağları K_d sabitini düşürmüştür. F17Y mutasyonu ile eklenen hidroksil grubu ile polarite artırılmış olup, tirozindeki hidroksil grubu hidrojen bağlarına katkıda bulunmuştur. Bu sayede hem F17Y hem de F17M mutasyonu ile bilirubin afinitesinin arttığı görülmüştür.

Polaritenin ve emilimin, emisyon üzerinde bir etkisi olup olmadığını görmek için tirozin amino asitleri üzerinde mutasyonlar yapılmıştır. Y134 bilirubin bağlanma bölgesindeyken, Y99'daki mutasyon emisyon üzerinde dolaylı bir etkiye sahip olabilecek yan zincirleri değiştirmek için yapılmıştır. Tirozin amino asitleri ile fenilalanin ve triptofan mutasyonları (Y99F_Y134W) sonucu bir hidroksil grubunun çıkarılmasıyla hidrojen bağı yapacak grup uzaklaştırılmıştır. Böylece bilirubinün bağlanmasını etkileyecek sadece aromatik benzen halkası kalmış ve aralarındaki zayıf π - π etkileşiminden dolayı afinitenin daha da düştüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca Y134W mutasyonu ile daha büyük bir amino asit olan triptofanın eklenmesiyle sterik engel artmış ve π - π etkileşimi oluşması engellenmiştir. Tirozin amino asitleri ile metiyonin amino asitlerinin yer değiştirildiği mutasyonlarda ise polarite artırılmıştır. Daha küçük bir protein olan metiyoninin eklenmesiyle sterik engeller azaltılmış ve kükürtlü gruplarla hidrojen bağlarına katkıda bulunulmuştur. Böylece Y99M_Y134M mutasyonunda afinite artarken, Y99F_Y134W mutasyonunda π - π bağları

kurulamadığı ve sterik engel olduğu için UnaG'ın UC-BR yakınlığı azaldı ve ayrışma sabitinin de arttığı görülmüştür.

Triptofanın emisyonu indirekt olarak etkileme ihtimali bulunan fenilalanin ile yer değiştirilmesini içeren mutasyonlar (W9F_W103F) gerçekleştirilmiştir. Büyük miktarda absorblama yapan ve floresan olan triptofan yerine daha küçük ve daha az aromatik halka içeren fenilalaninin eklenmesiyle polarite azaltılmıştır. Sterik engelin azaltılmasıyla UnaG'ın bağlanma afinitesinin arttığı gözlemlenmiştir.

Polaritenin etkisini görebilmek için, bilirubin bağlanma noktalarından biri olan T61 dönüm bölgesinde ve bu bölgenin tam karşısında yer alan T37 dönüm bölgesinde daha az polar amino asitler olan alanin ve valinle yapılan mutasyonlar ve daha polar olan serinle yapılan mutasyon sonucu yabancı tiple karşılaştırıldığında afinitenin arttığı görülmüştür. Ancak bu artış alanin ve valinde beş kat iken serinde iki kat kadar olmuştur. Afinitedeki bu değişim elbette sadece daha az/çok polar bir amino asit değişimiyle değil aynı zamanda eklenen aminoasitlerin moleküler olarak büyüklükleriyle de ilişkilidir.

Elde edilen varyantların üretim, ayırma ve saflaştırma işlemleri yabancı tiple optimize edilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Tek aşamada saf olarak elde edilemeyen varyantlar, diyaliz yöntemiyle imidazolden arındırılıp, saflaştırma işlemi ikinci kez tekrarlanmıştır. Bu aşamada bazı numuneler için daha yüksek His afinite özelliğine sahip TALON rezin kullanılmış ve karakterizasyon çalışmaları için tüm varyantlar saf bir şekilde elde edilebilmiştir. Saflaştırılan proteinlerde bulunan 6xHis-Tag'a karşı anti body kullanılarak Semi-Dry Western Blotlama ile ilgili proteinler gösterilmiştir. Ayrıca üretilen varyant UnaG proteinleri için SDS PAGE ile saflık derecesi analizi yapıldıktan sonra floresans spektroskopisi, CD spektroskopisi, sıcaklığa bağlı floresan değişim analizi, Western Blotlama ve termal açılma sıcaklıklarının belirlenmesi gibi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yabancı tip ve varyant UnaG proteinlerinin sekonder yapılarını kazanıp kazanamadıklarının belirlenmesi amacıyla Far UV CD Spektroskopisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Alınan sonuçlara göre hem yabancı tip için hem de tüm mutantlar için sekonder yapıya ait veriler yaklaşık 200 nm'ye kadar alınmıştır. CD spektroskopisi sonuçlarına göre tüm proteinlerde baskın sekonder yapının anti paralel β -sheet olduğu

anlaşılmıştır. Özellikle N57R mutantında UC-BR ile bağlanma sonucunda protein sekonder yapısında bulunan α -heliks kuyruk kısmında hafif bir uzamaya işaret eden veri değişimi gözlenmiştir.

Yine CD spektropolarimetresi kullanılarak yabancı tip ve varyantlar için termal açılma çalışması yapılmıştır. Geliştirilen mutantların Apo halleri yaklaşık benzer termal açılma sıcaklıklarına sahipken, Holo formları arasında en yüksek termal açılma sıcaklığına sahip olan T61S_T37S varyantıdır (ApoUnaG T61S_T37S 60°C, HoloUnaG T61S_T37S 68°C) Yabancı tipli TolAIII-UnaG füzyonunun Apo ve Holo formlarının açılma sıcaklıkları ise sırasıyla 63°C ve 65°C olmuştur. Geliştirilen mutantlardan en düşük bozulma sıcaklığına ise F17M mutantı sahip olmuştur (ApoUnaGF17M 50°C, HoloUnaGF17M 58°C).

Geliştirilen varyantların 7 tanesinde ve yabancı tipli UnaG proteininde Apo ve HoloUnaG versiyonları arasında UC-BR ile birleştiğinde termal açılma sıcaklığı açısından bir artış meydana gelmiştir. Diğer mutantlarda ise bu parametre açısından bir değişiklik meydana gelmemiştir. Sadece L41F varyantında HoloUnaG, ApoUnaG'a göre 1°C daha düşük termal açılma sıcaklığına sahip olmuştur (59°C / 60°C). Bunun da nedeni L41F varyantının β -tabaka ile α -heliks'in birleştiği noktada olmasıdır. Fenilalanin gibi büyük moleküler yapıya sahip aminoasitler α -heliks yapıyı bozmaktadır. Bu noktaya eklenen fenilalanin α -heliks yapıyı bozarak stabiliteyi düşürmüştür.

Floresans spektroskopisi çalışmalarıyla tüm UnaG proteinlerine ait uyarılma ve floresan ışımaya noktaları belirlenmiş ve yabancı tip TolAIII-UnaG füzyonuna ait verilerin Kumagai ve ark., (2013) tarafından yalın UnaG ile gerçekleştirilen çalışma ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (λ_{ex} : 498 nm, λ_{em} : 528 nm). Geliştirilen mutantlar arasında yabancı tipten en fazla sapma gösteren varyant F17Y (λ_{ex} : 504 nm, λ_{em} : 537 nm) olarak bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmada aynı konsantrasyonlarda kullanılan proteinlerin floresan şiddetlerinde düşüşler görülmüştür. Aynı şartlar altında ve floresan spektroskopisinde aynı parametreleri kullanarak alınan ölçümlerde en düşük floresan şiddete sahip varyantın L41F olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen uyarılma ve ışımaya parametreleri kullanılarak UC-BR ile tüm varyantlar ve yabancı tipli UnaG titre edilmiş ve UC-BR'ye karşı lineer doygunluk eğrileri

çıkarılmıştır. UC-BR'ye karşı daha yüksek afinite gösteren ve bununla birlikte ölçülebilir seviyede bir floresan ışımaya yapabilen mutantların elde edildiği gözlenmiştir. Özellikle L41F mutantı yabancı tipe göre en düşük K_d ile, afinitesi en yüksek mutant olmuştur. Bunun yanında Holo L41F varyantının florometrik özellikleri ölçülebilir aralıkta bir floresan ışımaya göstermiştir.

Sonuç itibariyle gerçekleştirilen bu tez kapsamında UnaG proteini *E.coli* prokaryotik ekspresyon sisteminde rekombinant olarak TolAIII ile birlikte füzyon olarak üretilerek saflaştırılmış ve 12 farklı mutantı geliştirilerek yabancı tipe oranla (Y99F_Y134W hariç) tamamında UC-BR'ye karşı daha yüksek afinite ve ölçülebilir aralıkta floresan ışımının olduğu belirlenmiş ve tüm proteinlerin biyofiziksel karakterizasyonları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen mutantlardan T61S_T37S, termal stabilitesinin en yüksek olması, ölçülebilir seviyede bir floresan ışımaya vermesi ve afinitesinin yabancı tipten daha iyi olması nedeniyle muhtemel bir UC-BR biyosensörü geliştirilmesi için aday varyant olarak seçilmiştir.

KAYNAKLAR

- Adeosun, S. O., Moore, K. H., Lang, D. M., Nwaneri, A. C., Hinds Jr, T. D., & Stec, D. E., 2018. A novel fluorescence-based assay for the measurement of biliverdin reductase activity. *Reactive oxygen species* (Apex, NC), 5(13), 35.
- Altuner Torun, Y., Ertural, U., Ergul, A. B., Karakukcu, C., & Akin, M. A., 2017. Reduction in serum paraoxonase level in newborns with hyperbilirubinemia as a marker of oxidative stress. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 30(19), 2297-2300.
- Malloy, H. T., & Evelyn, K. A., 1937. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem*, 119(2), 481-90.
- Ameri, M., Schnaars, H., Sibley, J., & Honor, D., 2011. Comparison of the vanadate oxidase method with the diazo method for serum bilirubin determination in dog, monkey, and rat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(1), 120-123.
- Anonim, 1998. Fluorescence Overview of Excitation and Emission Fundamentals, <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/fluoroexcitation.html>, (Erişim Tarihi: 05.10.2019).
- Anonim, 2013. Bilirubin, <http://eclinpath.com/chemistry/liver/cholestasis/bilirubin/>, (Erişim Tarihi: 12.10.2019).
- Anonim, 2015. Bilirubin Production and Excretion, <https://step1.medbullets.com/gastrointestinal/110032/bilirubin-production-and-excretion>, (Erişim Tarihi: 14.10.2019).
- Anonim, 2016. Moleküler Lüminesans Spektroskopisi, https://abs.mehmetakif.edu.tr/upload/1127_905_dosya.pdf, (Erişim Tarihi: 01.10.2019).
- Arias, I.M., Ohmi, N., Bhargava, M., Listowsky, I., 1980. Ligandin: an adventure in liverland, *Mol. Cell. Biochem.*, 29, 71–80.
- Babin, S. M., & Sova, R. M. 2014. Preliminary development of a fiber optic sensor for measuring bilirubin. *Analytical chemistry insights*, 9, 59.
- Beşergil, B. 2015. Enstrümantal Analiz Temel İlkeler, Moleküler fluoresans spektroskopisi. *Gazi Kitabevi*, Ankara.
- Cao, X., Zhang, C., Gao, Z., Liu, Y., Zhao, Y., Yang, Y., ... & Xu, J., 2019. Ultrafast internal conversion dynamics of bilirubin bound to UnaG and its N57A mutant. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(5), 2365-2371.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.

- Chirgwandi, Z. G., Panas, I., Johansson, L.-G., Norden, B., Willander, M., Winkler, D., Ågren, H., 2008. Properties of a Biophotovoltaic Nanodevice, *J. Phys. Chem. C Lett.*, 112, 18717–18721.
- Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., 2010. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiol. Rev.*, 90, 1103–1163.
- Day, R. N., & Davidson, M. W. (Eds.), 2014. The fluorescent protein revolution. *CRC Press*, s. 4-20.
- Deliolanis, N., Kasmieh, R., Wurdinger, T., Tannous, B. A., Shah, K., & Ntziachristos, V., 2008. Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep-tissue molecular imaging applications. *Journal of biomedical optics*, 13(4), 044008.
- Erapaneedi, R., Belousov, V. V., Schäfers, M., & Kiefer, F., 2016. A novel family of fluorescent hypoxia sensors reveal strong heterogeneity in tumor hypoxia at the cellular level. *The EMBO journal*, 35(1), 102-113.
- Fox, I. J., Chowdhury, J. R., Kaufman, S. S., Goertzen, T. C., Chowdhury, N. R., Warkentin, P. I., ... & Strom, S. C., 1998. Treatment of the Crigler–Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *New England Journal of Medicine*, 338(20), 1422-1427.
- Funahashi, A., Komatsu, M., Furukawa, T., Yoshizono, Y., Yoshizono, H., Orikawa, Y., ... & Itakura, T., 2016. Eel green fluorescent protein is associated with resistance to oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 181, 35-39.
- Gwaltney-Brant, S. M., 2016. Nutraceuticals in hepatic diseases: In Nutraceuticals. *Academic Press* (pp. 87-99).
- Ha, C. E., & Bhagavan, N. V., 2011. Essentials of medical biochemistry: with clinical cases. *Academic Press*.
- Hayashi, S., & Toda, Y., 2009. A novel fluorescent protein purified from eel muscle. *Fisheries Science*, 75(6), 1461.
- Hu, H., Wang, A., Huang, L., Zou, Y., Gu, Y., Chen, X., ... & Yang, Y., 2018. Monitoring cellular redox state under hypoxia using a fluorescent sensor based on eel fluorescent protein. *Free Radical Biology and Medicine*, 120, 255-265.
- Huang, W., Zhang, J., Chua, S. S., Qatanani, M., Han, Y., Granata, R., & Moore, D. D., 2003. Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 4156-4161.
- Iwatani, S., Nakamura, H., Kurokawa, D., Yamana, K., Nishida, K., Fukushima, S., ... & Miyawaki, A., 2016. Fluorescent protein-based detection of unconjugated bilirubin in newborn serum. *Scientific reports*, 6, 28489.

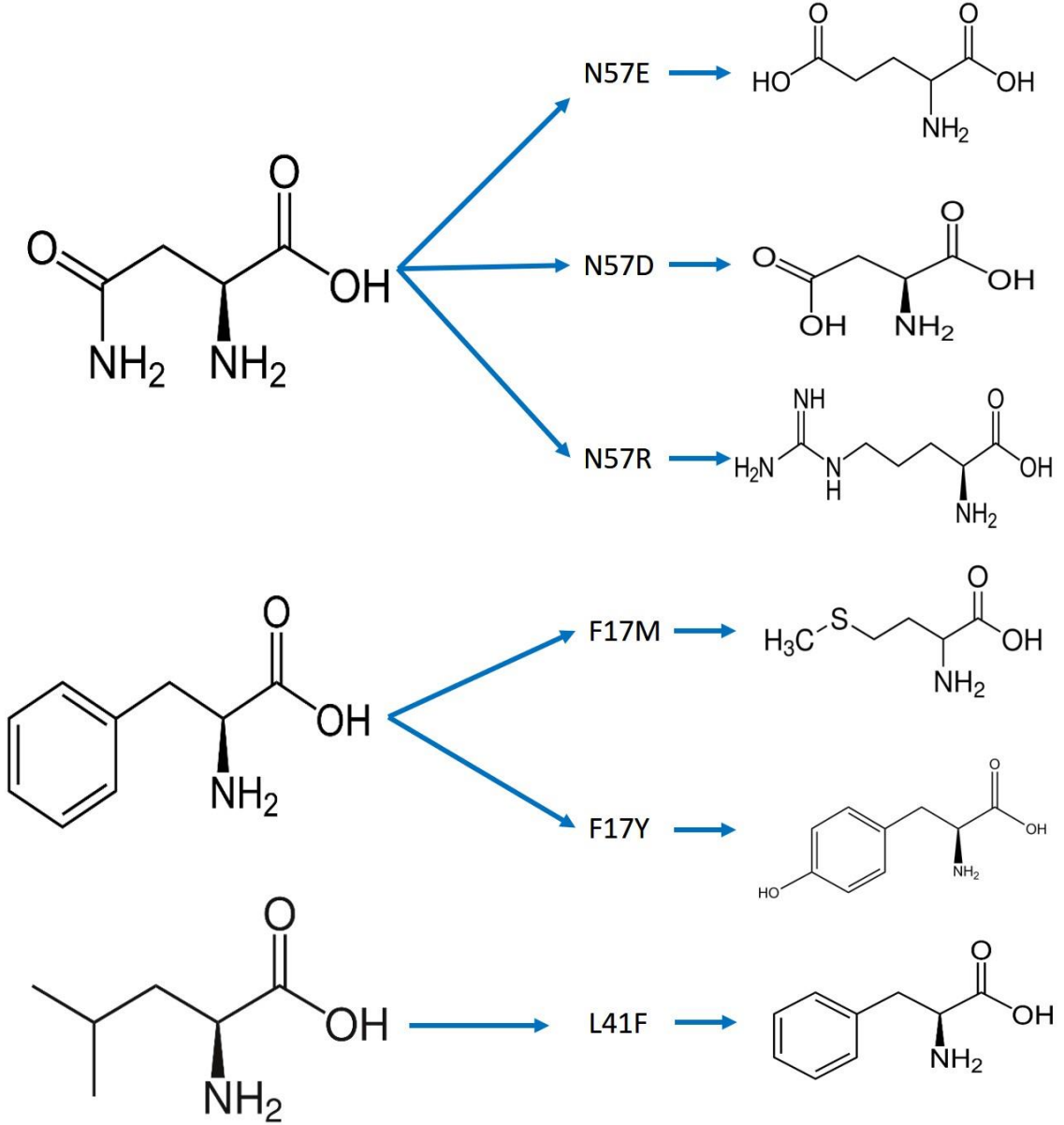
- Jendrassik, L., and Gr6f, P., 1938. Colorimetric Method of Determination of bilirubin. *Biochem. Z.*, 297, 81.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119-139.
- King, E. J., & Coxon, R. V., 1950. Determination of bilirubin with precipitation of the plasma proteins. *Journal of clinical pathology*, 3(3), 248.
- Kumagai, A., Ando. R., Miyatake. H., Greimel. P., Kobayashi. T., Hirabayashi. Y., Shimogori. T., Miyawaki. A., 2013. A Bilirubin-Inducible Fluorescent Protein from Eel Muscle, *Cell*, 153, 1602-1611.
- Lakowicz, J. R., 1999. Introduction to fluorescence. *In Principles of fluorescence spectroscopy* (pp. 1-23). Springer, Boston, MA.
- Laterza, O. F., Smith, C. H., Wilhite, T. R., & Landt, M., 2002. Accurate direct spectrophotometric bilirubin measurement combined with blood gas analysis. *Clinica chimica acta*, 323(1-2), 115-120.
- Lathe, G. H., & Ruthven, C. R. J., 1958. Factors affecting the rate of coupling of bilirubin and conjugated bilirubin in the van den Bergh reaction. *Journal of clinical pathology*, 11(2), 155.
- Lee, E., Shim, S. H., & Cho, M., 2018. Fluorescence enhancement of a ligand-activated fluorescent protein induced by collective noncovalent interactions. *Chemical science*, 9(44), 8325-8336.
- McDonagh, A. F., Palma, L. A., & Lightner, D. A., 1980. Blue light and bilirubin excretion. *Science*, 208(4440), 145-151.
- Miyawaki, A., Shcherbakova, D. M., & Verkhusha, V. V., 2012. Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications. *Current opinion in structural biology*, 22(5), 679-688
- Nagaoka, S., & Cowger, M. L., 1979. A novel method to determine total and free serum bilirubin. *Analytical biochemistry*, 96(2), 364-377.
- Ngashangva, L., Bachu, V., & Goswami, P., 2019. Development of new methods for determination of bilirubin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 162, 272-285.
- Odell, G. B., 1959. The dissociation of bilirubin from albumin and its clinical implications. *The Journal of pediatrics*, 55(3), 268-279.
- Piatkevich, K. D., Subach, F. V., & Verkhusha, V. V., 2013. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals. *Chemical Society reviews*, 42(8), 3441-3452.

- Pimenta, F. M., Jensen, J. K., Etzerodt, M., & Ogilby, P. R., 2015. Protein-encapsulated bilirubin: paving the way to a useful probe for singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14(4), 665-677.
- Plavskii, V. Y., Mostovnikov, V. A., Tret'Yakova, A. I., & Mostovnikova, G. R., 2008. Sensitizing effect of Z, Z-bilirubin IX α and its photoproducts on enzymes in model solutions. *Journal of Applied Spectroscopy*, 75(3), 407-419.
- Powell, W. N., 1944. A method for the quantitative determination of serum bilirubin with the photoelectric colorimeter. *Am J Clin Pathol*, 14(Technical Suppl 8), 55-58.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229-233.
- Puppalwar, P. V., Goswami, K., & Dhok, A., 2012. Review on Evolution of Methods of Bilirubin Estimation. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 1, 17-28.
- Rawal, R., Chauhan, N., Tomar, M., & Gupta, V., 2017. A contrivance based on electrochemical integration of graphene oxide nanoparticles/nickel nanoparticles for bilirubin biosensing. *Biochemical Engineering Journal*, 125, 238-245.
- Rice, E. W., 1958. International survey of clinical chemistry procedures. *Clinica Chimica Acta*, 3(2), 121-130.
- Schaap, F. G., Van der Vusse, G. J., & Glatz, J. F., 2002. Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates. In *Cellular Lipid Binding Proteins* (pp. 69-77). Springer, Boston, MA.
- Shitashima, Y., Shimosawa, T., Asahi, T., & Miyawaki, A., 2018. A dual-ligand-modulable fluorescent protein based on UnaG and calmodulin. *Biochemical and biophysical research communications*, 496(3), 872-879.
- Shitashima, Y., Shimosawa, T., Kumagai, A., Miyawaki, A., & Asahi, T., 2017. Two distinct fluorescence states of the ligand-induced Green fluorescent protein UnaG. *Biophysical journal*, 113(12), 2805-2814.
- Stoner, R. E., & Weisberg, H. F., 1957. Ultramicro method for serum bilirubin by diazo blue reaction. *Clinical chemistry*, 3(1), 22-36.
- Storch, J., Thumser, A.E.A., 2000. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1486, 28-44.
- Takeda, T. A., Mu, A., Tai, T. T., Kitajima, S., & Taketani, S., 2015. Continuous de novo biosynthesis of haem and its rapid turnover to bilirubin are necessary for cytoprotection against cell damage. *Scientific reports*, 5, 10488.
- Tietze, K. J., 2011. Clinical Skills for Pharmacists-E-Book: A Patient-Focused Approach. *Elsevier Health Sciences*.

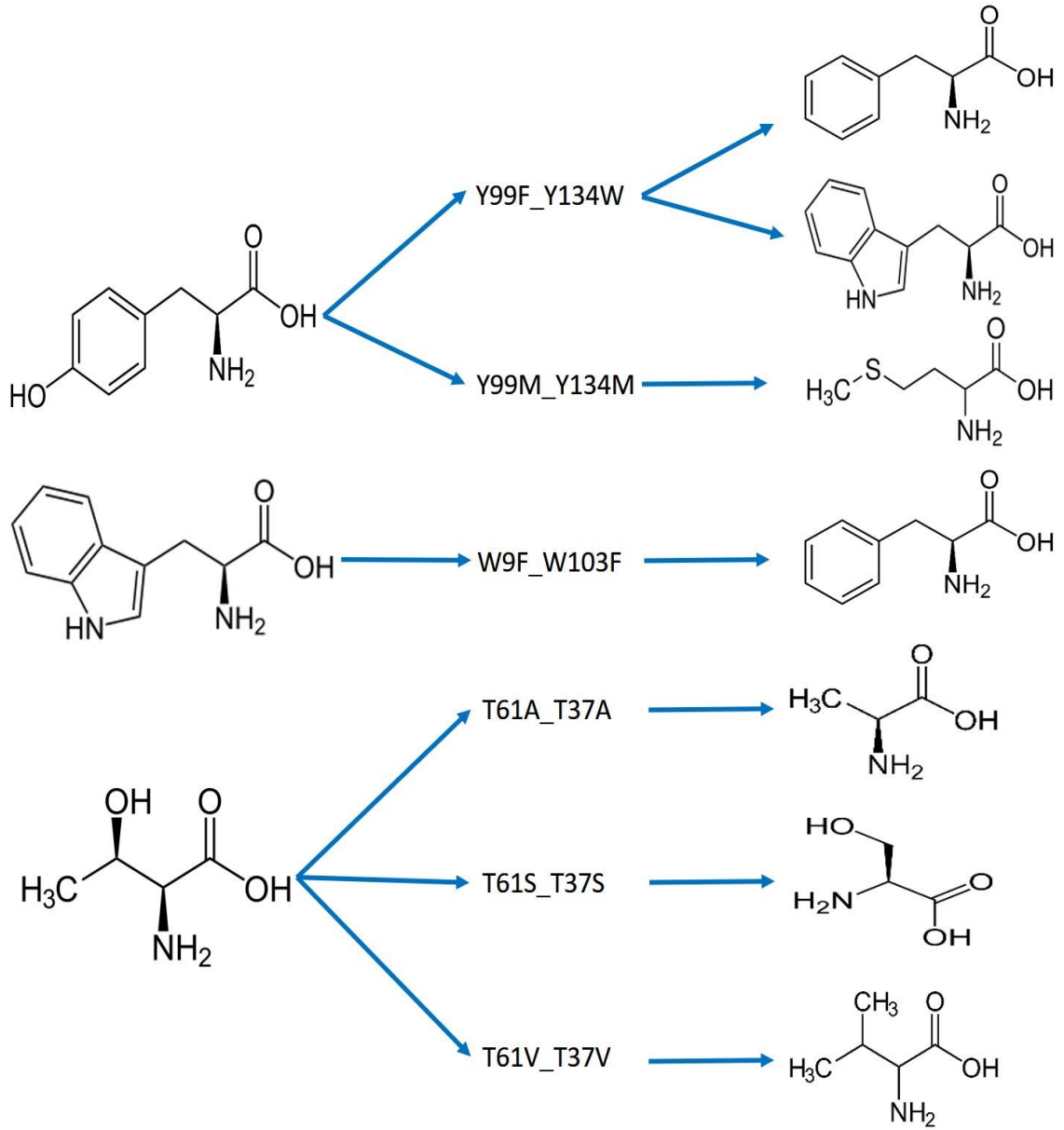
- Tsien, Y., R., 1998. The Green Fluorescent Protein, *Annual Review of Biochemistry*, 67, 509-544.
- Tsukamoto, K., 2006. Oceanic biology: spawning of eels near a seamount, *Nature*, 439, 929.
- Ulusu, Y., 2019. Escherichia coli Ekspresyon Plazmiti pTolT'nin Nokta Mutasyonu Yöntemiyle Moleküler Modifikasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (17), 1-8.
- ULUSU, Y., 2020. First vertebrates fluorescence protein UnaG: bacterial expression, purification and characterization.
- Wall, K. P., Dillon, R., & Knowles, M. K., 2015. Fluorescence quantum yield measurements of fluorescent proteins: a laboratory experiment for a biochemistry or molecular biophysics laboratory course. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 43(1), 52-59.
- Wang, J., & Ozsoz, M., 1990. A polishable amperometric biosensor for bilirubin. *Electroanalysis*, 2(8), 647-650.
- Watson, D., & Rogers, J. A., 1961. A study of six representative methods of plasma bilirubin analysis. *Journal of clinical pathology*, 14(3), 271-278.
- White, D., Haidar, G. A., & Reinhold, J. G., 1958. Spectrophotometric measurement of bilirubin concentrations in the serum of the newborn by the use of a microcapillary method. *Clinical chemistry*, 4(3), 211.
- Yeh, J. T. H., Nam, K., Yeh, J. T. H., & Perrimon, N., 2017. eUnaG: a new ligand-inducible fluorescent reporter to detect drug transporter activity in live cells. *Scientific reports*, 7, 41619.
- Zelenka, J., Leníček, M., Muchová, L., Jirsa, M., Kudla, M., Balaž, P., ... & Vitek, L., 2008. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues. *Journal of Chromatography B*, 867(1), 37-42.
- Zhang, B., Fung, Y., Lau, K., & Lin, B., 1999. Bilirubin–human serum albumin interaction monitored by capillary zone electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, 13(4), 267-271.
- Zimmer, M., 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical reviews*, 102(3), 759-782.
- Zimmer, M., 2009. GFP: from jellyfish to the Nobel prize and beyond. *Chemical Society Reviews*, 38(10), 2823-2832.
- Zimmerman, A.W., Veerkamp, J.H., 2002. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59, 1096–1116.

EKLER

5.1. Ek-A: Mutasyonların kimyasal yapı değişimi



Ek-A 1. Tek nokta amino asit mutasyonlarında kimyasal yapı değişimi



Ek-A 2. İki nokta amino asit mutasyonlarında kimyasal yapı değişimi

5.2. Ek-B: Sekans Analizi Kromotogramları

N57D

5'3' Frame 1

MetVEKFEVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVIENGPTFLDQTQVKFKLGEEFDEFPSSDRRKG
VKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYVREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYRRATE

Translate

Home | Contact

Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1

FXLLXEGDIPICITITRATMetAHOGPISITMetPGRNLLSKVSSMetTHRPMetOAKPVRCAStopNWHPMetVCYWISNLKVAIPHEVRT
RWQQLNLRSSRNHQARQYMetKCSKTRHWTSVVGDLWFRADPWSRNLLAPGRSQTAILVNTStopKLSEQRNStopAMetVGMetPR
RRHCTSPRRTEKStopQStopKStopRMetDLLRSLTLKStopSSNStopGRSSTNFLIIEEKAStopNLSStopTWWERSWCTYKSGTARRRR
MetSERStopRTVNWSStopHLRWETSWLCAITGGRRNEVDERVRFEDPAANKARKEAELAAATAEQStopLAStopPLGASKRVLRGF
LLKGGTISGYPPQDGGCXHDRVVXSGSARXEQDW

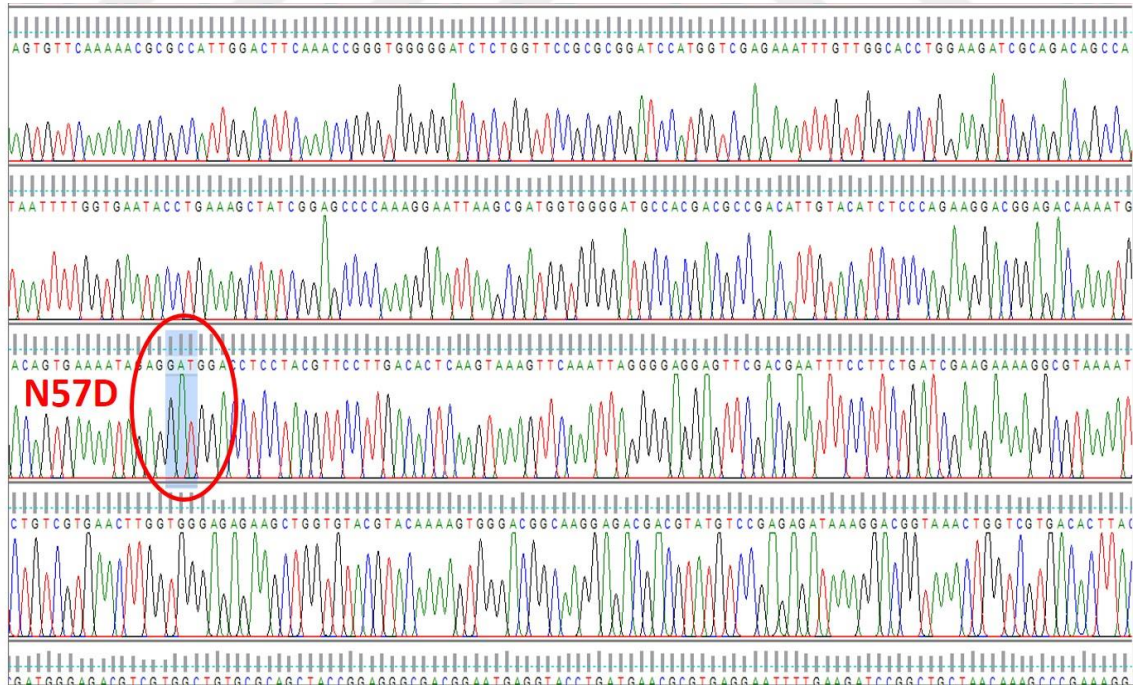
5'3' Frame 2

XVYFXKEIYHASPSPSLEQQWDRGRYQStopLCRADStopICYRKStopVLStopRIVLCRQNLAAHKTGTRWYVTGYQTStopRWR SRL
SGCVGSSStopTCEDPETTKPSIStopSVQKRAIGLQTGWGISGSARIHGREICWHLEDRRQPStopFWStopIPESYRSPKGIKRWGGC
HDADIVHLP EGRQRNDSETRGWTSYVPSHSSKVVQIRGGVRRISFStopSKKRRKICRELGGREAGVRTKVGRRQDDVCPRDKGR
StopTGRDITYDGRRRGCQLPEGDGMetRYLMetNAStopGILKIRLLTKPERKLSWLLPPLSNNStopHNPLGPLNGSStopGVFCStopKEEL
YPDIHRTGVVXMetIStopXXVAPSXSXSRT

5'3' Frame 3

XFTLXRPNTKHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGKTCTLRILKLPDGMetLDDIKPEGGDPALCQAALAAA
KLAKIKPFGAVYEVFKNAPLDFKPGGGSLVPRGSMetVEKFEVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDK
MetTVIEDGPTFLDQTQVKFKLGEEFDEFPSSDRRKGKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYVREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSY
RRATEStopCStopStopTREFStopRSGCStopQSPKGSStopVGCCHRStopAITSITPWGLStopTGLEFFAERRNYIRISTGRVWXPStop
SRSSXWLVVXXRAGL

Ek-B 1. N57D mutasyonuna ait ExPASy Translate Tool sonucu



Ek-B 2. N57D mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

N57E

5'3' Frame 1

MetVEKFEVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVIENGPTFLDTQVKFKLGEFEFSDRRKG
VKSVVNLVGEKLVVYQKWDGKETTYYVREIKDGKLVTLTMetGDVVAVRSYRRATEStop

Translate **N57E** Home | Contact

Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1

YFVXL StopEGDIPICITITIRATMetAHQGGPISITMetGRNLNLSKVSSMetTHRPMetQAKPYRCAStopNWHPMetVCYWISNLKVAIPHFV
RLRWQQNLNRRSRNHQARQYMetKCSKTRHWSENRYGDLWFRADPWSRNLLAPGRSQTAIILVNTStopKLSEPQRNStopAMetVGMet
PRRRHCTSPRRTEIKStopQStopKStopRKDLKSLTLKStopSSNStopGRSSTNFLLEEKAStopNLSStopTWWERSWCYKSGTARRRR
MetSERStopRTANWSStopHLRWETSWLCAATGGRRNEVPDERVRFEDPAANKARKEAELAAATAEQStopLAStopPLGASKRVLKG
FAERNYIRISTGTGVVAMetIAXSIVXGSEASRTGRRPKRSDSAPKXGXRRNCINAYSASSTPXX

5'3' Frame 2

ILFXFKKEIYHASPSPSLEQQWTRGRYQStopLCRADStopICYRKStopVLStopRIVLCRQNLVAAHKTGRWYVTGYQTStopRWRST
LSCGCGSSStopTCDEPETTKSGSIStopSVQKRAIGLQTGWGISGSARIHGREICWHLEDRRQPStopFWStopIPESYRSPKGIKRWGG
CHDADIVHLPGRRRQNDSENRRGRTSYVPStopHSSKVQIRGGVRRISFStopSKKRRKICRELGGREAGVRTKVGRQGGDDVCPDRKGR
QTGRDTYDGRRRGCACPEGGGMetRYLMetNAStopGILKIRLLTKPERKLSWLLPPLSNNStopHNPLGPLNGSStopRGFLLKGGTISG
YPQERVWSPStopSRXStopXXQVAKRAGLGGGQSGRTVLRXRXXEIASTHIALAARHX

5'3' Frame 3

FCXXLRRLRHHHHHHSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGKICTLRIKLAPDGMetLLDIKPEGGDPALCOAALAA
AKLAKI KPPQAVYEVFKNAPLDFKPGGGSLVPRGSMetVEKFEVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDG
KMetTVIIEEGPTFLDTQVKFKLGEFEFSDRRKGKSVVNLVGEKLVVYQKWDGKETTYYVREIKDGKLVTLTMetGDVVAVRS
YRRATEStopRStopRREEFStopRSGCStopQSPKGSStopVGCCHRStopAITSITPWGLStopTGLEGVFCStopKEELYPDHIRNGCGR
HDRVXDSXSKStopRSEQDWAAAKAVGQCSEXGCXStopKLHQRIStopRStopQHAIX

Ek-B 3. N57E mutasyonuna ait ExpASy Translate Tool sonucu



Ek-B 4. N57E mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

N57R

5'3' Frame 1

MetVEK FVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVIENGPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYYVREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYRRATEStop

ExpASY
Bioinformatics Resource Portal

N57R Translate Home | Contact

Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1

FCLXLRROXTMHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFDASSYAGKTCTLRIKLAPDGMETLLDIKPEGGDPALCQAALAAKLAKIKPKLAVYEVFKNAPLDFKPGGGSLVPRGSMetVEK FVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVIENGPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYYVREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYRRATEStop

Stop Stop TREEF Stop RSGC Stop QSPKGS Stop VGCCR Stop AITSITPWGL Stop TGLEFFAERRNYIRISTGRVWSP Stop SRSR Stop WLQAKRAGLGGGQSGRTVLRXRVIIEIASTHIALAARHNDWXCXPNGXXPAXRPGSTGXTK

5'3' Frame 2

FVXL Stop EGDIPCITITITRATMetAHQGGPISITMetPGRLLNLSKVSSMetTHRPMetQAKPVRCAStopNWHPMetVCYWISNLKVAIPHFVRLRWQQLNRRSRNHQARQYMetKCSKIRHWTSNRVGDWFERADPWSRNLLAPGRSQTAILLVNTStopKLSEPQRN Stop A MetVGMetRRRHCTSPRRTEKStopQ StopK StopREDLLRSLTLKStopSSN StopGRSSTNFLIEEKA StopNLS StopTWWERSWCTYKSGTARRRRMetSERStopRTVNWSS StopHLRWETSWLCAATGRRNEVPDERVRFEDPAANKARKEAELAAATAEQStopLA StopPLGASKRVLRGFLKGGTISGYPDGCGRHDRVVDGSGKStopRSEQDWAAAKAVGQCSXNGCXStopKLHQRI StopR StopQHAI MetTGAXXRMetXXXPCXGPAYPXStopPS

Ek-B 5. N57R mutasyonuna ait ExpASY Translate Tool sonucu



Ek-B 6. N57R mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

F17Y

5'3' Frame 1

MetVEKFGVTWKIADSNHFGFYLKAIGAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVVYQKWDKSETTYVREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYRRATEStop

EXPASY
SIB Bioinformatics Resource Portal

Translate

Home | Contact

Translate Tool - Results of translation

F17Y

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1

FKKEIYHASPPSLEQQWRIRGRYQStopLCRADStopICARKStopVLStopRIVLCRQNLAAHKTGTRWYVTGYQTStopRWRSRRLTSGCVGSSStopTCEDPETTKPGSIStopSVQKRAIGLQTGWGISGARIHGREICWHLEDRRQPStopLWStopIPESYRSPKGIKRWWGCHDADIVHLPERRQNDSENREWTSYVPStopHSSKVQIRGGVRRISStopSKRRKICRELGGREAGVRTKVGRQDDVCPRDKGRStopTGRD TYDGRRRGCAQLPEGDGMetRYLMetNAStopGILKIRLLTKPENKLSWLLPPLSNNStopHNPLGPLNGSStopGFFAERNYIRISTGGCGRHDRVVDSGSKStopRSEQDWAAAKAVGQCSENGCAStopKLHQRIStopRStopQHAIVTGDVGMetESRKGPAVPANQAYAStop

5'3' Frame 2

LRRRYTMetHHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGTCTRIKLAPDGMetLLDIKPEGGDPALCQAALAAAKLAKIPKPPSQAVYEVFKNAPLDFKPGGGSLVPRGSMetVEKFGVTWKIADSNYGYLKAIGAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVVYQKWDKSETTYVREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYRRATEStopGTStopStopTREEFStopRSGCStopQSPKGSStopVGCCHRStopAITSITPGLStopTGLRGFLLKGGTISGYPQEGVVAStopLAStopSIVAPSSASRTGRRPKRSDSAPRTGAHRNCINAYSASSTPStopLAStopLSEWNPAKARQYRLTKPMetP

Ek-B 7. F17Y mutasyonuna ait ExpASy Translate Tool sonucu



Ek-B 8. F17Y mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

F17M

5'3' Frame 1
MetVEKFKVGTWKIADSNFGEYLKAIGAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPFTLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYVQWVWGKETTYYREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYRRATEStop

ExpASY
Bioinformatics Resource Portal

Translate

Home | Contact

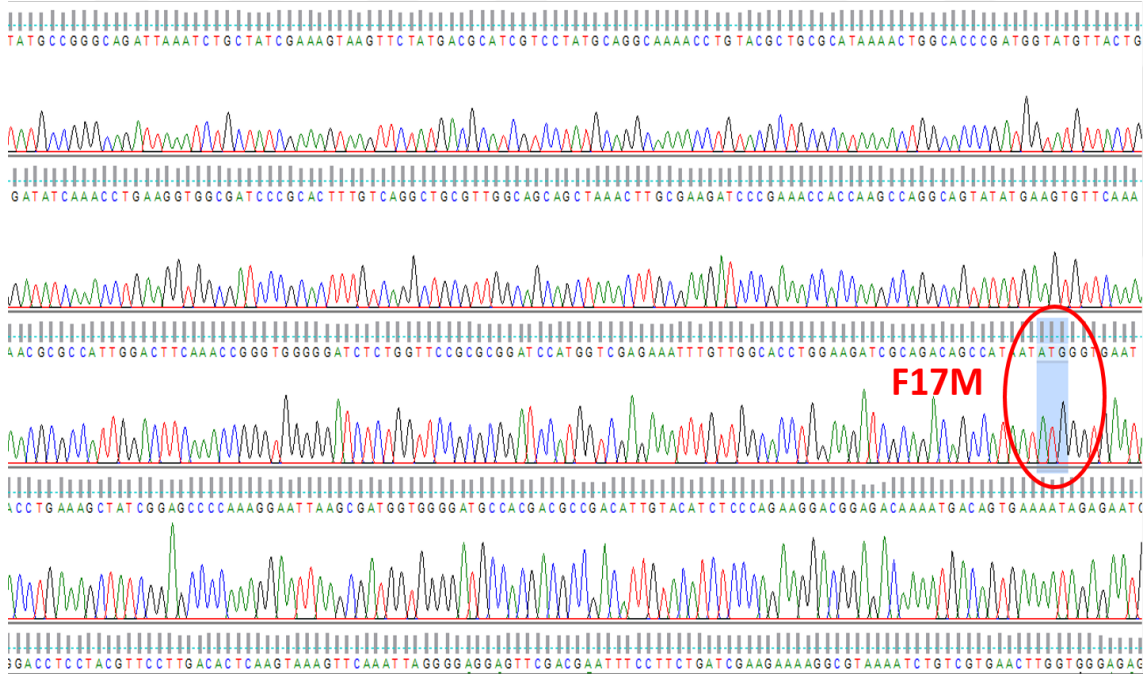
Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1
ILFXFKKEIYHASPSPSLEQQWRIRGRYQ Stop LCRAD Stop ICRPK Stop VL Stop RIVLCRQNLAAHKTGRWYVTGYQT Stop RWRSR
L SGCVGS Stop TCEDEPTTKPGSI Stop SVQKRAIGLQTGWGISGARIHGREICWHLEDRRQP Stop YG Stop IPESYRSPKGIKRWG
CHDADIVHLEPGRQNDSENREWTSYVP Stop HSSKVQIRGGVRRGF Stop SKRRKICRELGGREAGVRTKVGRQDDVCPDRKGR
Stop TGRDITYDGRRRGCAQLPEGDG MetRYL MetNA Stop GILKIRLLTKFARKLSWLLPPLSNN Stop HNPLGPLNGS Stop GVFC Stop KEEL
YPDIHRTGVA MetIA Stop SIVAPSSSEASRTGRRPKRSDSAPXTGAHRNUNAYSASSTP Stop Stop LAXXEXT

5'3' Frame 2
FCXXLRRRYT MetHHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFDASSYAGCTTQIKLAPDG MetLDIKPEGGDPALCQAALAA
AKLAKIPKPPSQAVYEVFKNAPLDFKPGGGSLVPRGS MetVEKFKVGTWKIADSN MetG YLKAIGAPKELSDGGDATTPTLYISQKDG
DK MetTVKIENGPPFTLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYVQWVWGKETTYYREIKDGKLVVTLT MetGDVVAVR
SYRRATE Stop GT Stop Stop TREEF Stop RSGC Stop QSPKGS Stop VGCHR Stop AITSI F WGL Stop TGLEGFFAERNYIRISTGRVWSP
Stop SRSR Stop WLQVAKRAGLGGGQSGRTVLRXRVRIEIASTHIALAARHSWXXXXXR

Ek-B 9. F17M mutasyonuna ait ExPASy Translate Tool sonucu



Ek-B 10. F17M mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

L41F

5'3' Frame 1
MetVEKFGVTWKIADSHNFGEYLKAIAGAPKELSDGGDATTPTLYIQKDGDKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKG
VKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYVREIKDGKLVVTLTMDGTVAVRSYRRATEStop

Translate L41F

Translate Tool - Results of translation

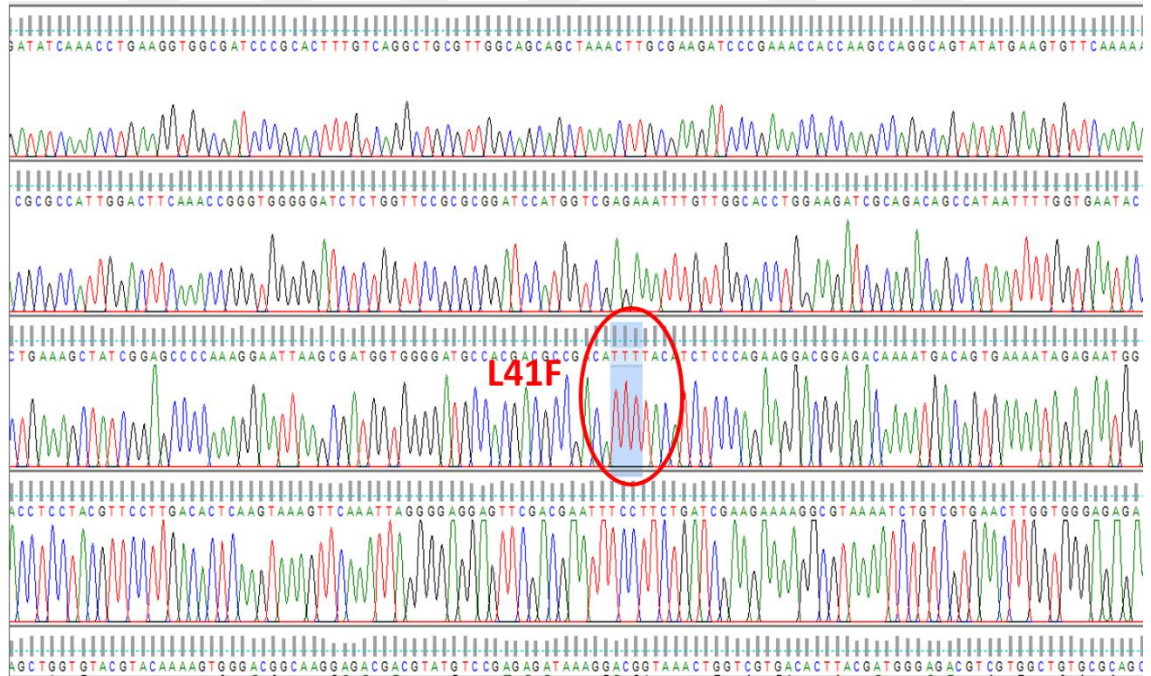
Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 1
XXFVStopLStopEGDIPCITITITRATMetAHQGPISTITMetPGRNLNLLSKVSSMetTHRPMetQAKPYRCAStopNWHFMetVGYWISNLKVAIF
HFVRLRWQQLNLRSSRNHQARQYMetKCSKTRHWTSNRVVDLWRADPWSRNLLAPGRGTATILVNTStopKLESPQRNStopAMetV
GMetPRRRRHFTSPRRRTEKStopQStopKStopRMetDLLRSLTLKStopSSNStopGRSSTNFLLEEKStopNLSStopTWWERSWCTYKSGTA
RRRRMetSERStopRTVNWSStopHLRWETSWLCAATGGRRNEVPDERVNFEDPAANKARKEALAAATAEQStopLAStopPLGASKRV
LRGFLKGGTISGYPDGCGRHDRVVDSGKStopRSEQDWAAAKAVGQCSEXGCAStopKLHQTStopRStopQHAIVTGXAVGMetXX
XPQXARQYRXNQAXXIQGDXX

5'3' Frame 2
XILFNFKKEIYHASPPSLEQQWRIRGRYQStopLCRADStopICYRKStopVLStopRIVLCRQNLAAHKTGTQWYVTGYQTStopRWRSR
TSGCGVSSStopTCEDPETTKPGSIStopSVQKRAIGLQTGWGISGSARIHGREICWHLEDRRQPStopFWStopIPESYRSPKGIKRW
GCHDADILHLEPGRRRQNDSENREWTSYVPStopHSSKVQIRGGVRRISFStopSKRRKICRELGGREAGVRTVGRQGGDDVCPDRKG
RStopTGRDYGRRRGCALPEGDGMetRYLMetNAStopGILKIRLLTKPERKLSWLLPPLSNNStopHNPLGPLNGSStopGVFCStopKEE
LYPDIHRTGVVAStopSIVAPSSSEASRTGRRPKRSDSAPKXGAHRNCINAYSASSTPStopStopLAXLSEWXXRKKXPSTGXTKP
XPASRVTXP

5'3' Frame 3
XFCLTLRRYTMetHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGKTCTLRKIKLAPDGMetLLDIKPEGGALCQAALA
AAKLAKIPKPPSQAVYEVFKNAPLDFKPGGGSLVPRGSMetVEKFGVTWKIADSHNFGEYLKAIAGAPKELSDGGDATTPTLYIQKDG
DKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGKVSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYVREIKDGKLVVTLTMDGTVAVR
SYRRATEStopGTStopStopTREEFStopRSGCStopQSPKGSStopVGCCHRStopAITSITPWGLStopTGLEGFFAERRNYIRISTGRVWSP
StopSRSRStopWLQVAKRAGLGGGQSGRTVLRXRVRIEIASTHIALAARHSWDXCRNGXXPAXGPAVPAXPSXXLXHPGStopRXP

Ek-B 11. L41F mutasyonuna ait ExPASy Translate Tool sonucu



Ek-B 12. L41F mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

Y99F_Y134W

5' Frame 1

MetVEKFGVTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLYIQKWDGKETTYYREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYERATEStop

EXPASy
Bioinformatics Resource Portal

Translate

Home | Contact

Y99F_Y134W

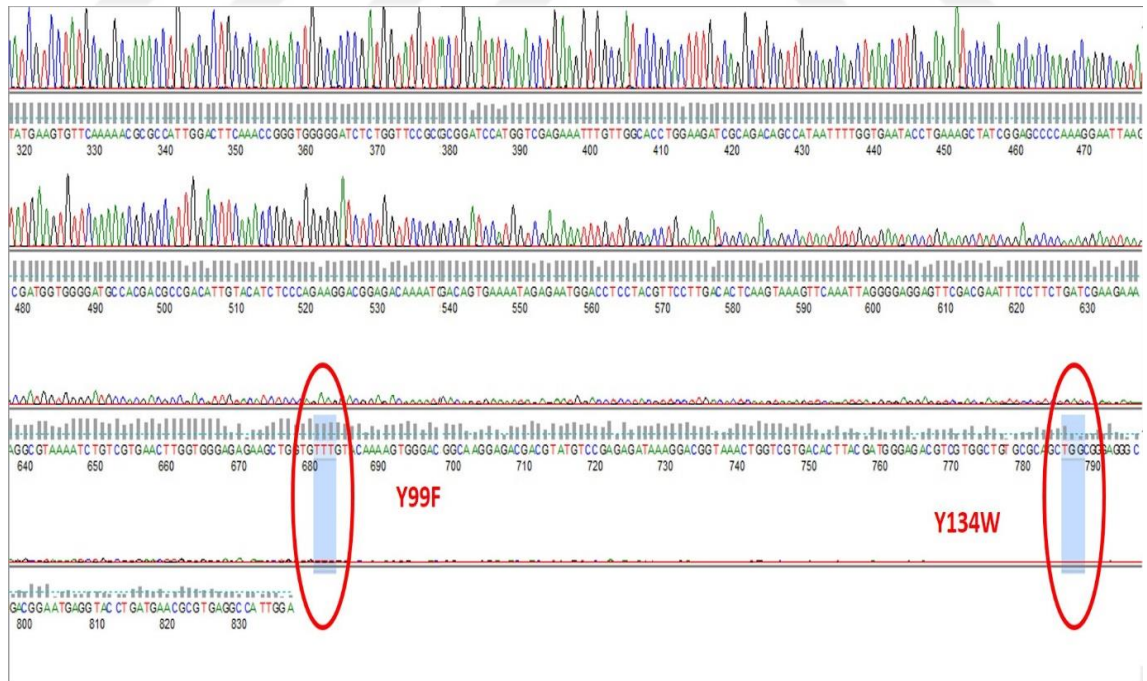
Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5' Frame 3

KEILStopNILFTLRRRYTMetHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFDASSYAGKTCTLRIKLAPDGMetLLDIKPEGGDPALCQAALAAAKLAKIPKPPSQAVYEVFNAPLDFKPGGSLVPRGSMetVEKFGVTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLYIQKWDGKETTYYREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYERATEStopMetRYLMetNAStopGHW

Ek-B 13. Y99F_Y134W mutasyonunun sekanslama sonucunun ExPASy Translate Tool sonucu



Ek-B 14. Y99F_Y134W mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

Y99M Y134M

5'3' Frame 1

MetVEKVFVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYQKWDGKETTYYREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSGYRRATE Stop

 **ExpASY**
Bioinformatics Resource Portal

Translate

Home | Contact

Y99M_Y134M

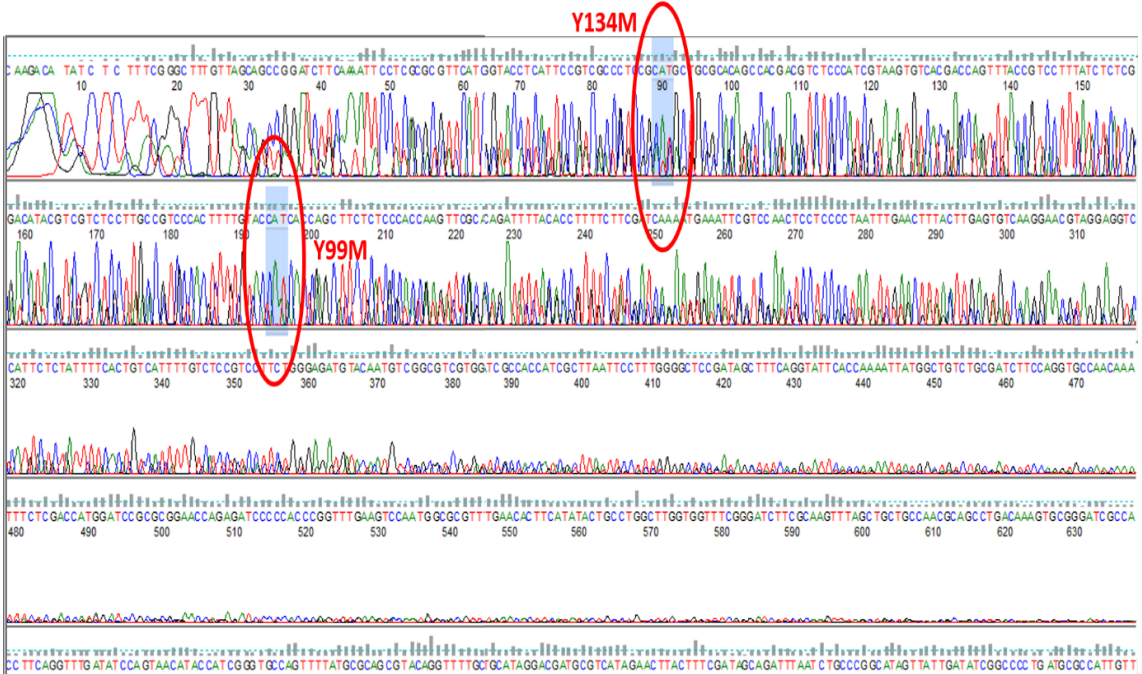
Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

3'5' Frame 1

HNGFFLEIILLTLRRRYTMetHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFDASSYAGKTCTLRILKAPDGMetLLDIKPEGGDPALCQAALAAAKLAKIPKPPSQAVYEVFKNAPLDFKPGGSLVPRGSMetVEKVFVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEELDEFHDDRKGKSVANLVGEKLVYQKWDGKETTYYREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSGYRRATE Stop GT Stop Stop TREEF Stop RSGC Stop QSPKEICL

Ek-B 15. Y99M_Y134M mutasyonunun sekanslama sonucunun ExpASY Translate Tool sonucu



Ek-B 16. Y99M_Y134M mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

* T7 geri primeri ile dizileme yapıldığı için sekans sonucu 3'-5' yönündedir.

W9F W103F

5'3' Frame 1

MetVEKFGVGIADSHNEGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKGDGKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGVKSVVNLVGERLWVYVQWIGKETTYYREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYRRATE Stop

ExPASy
Bioinformatics Resource Portal

Translate

Home | Contact

Translate Tool - Results of translation

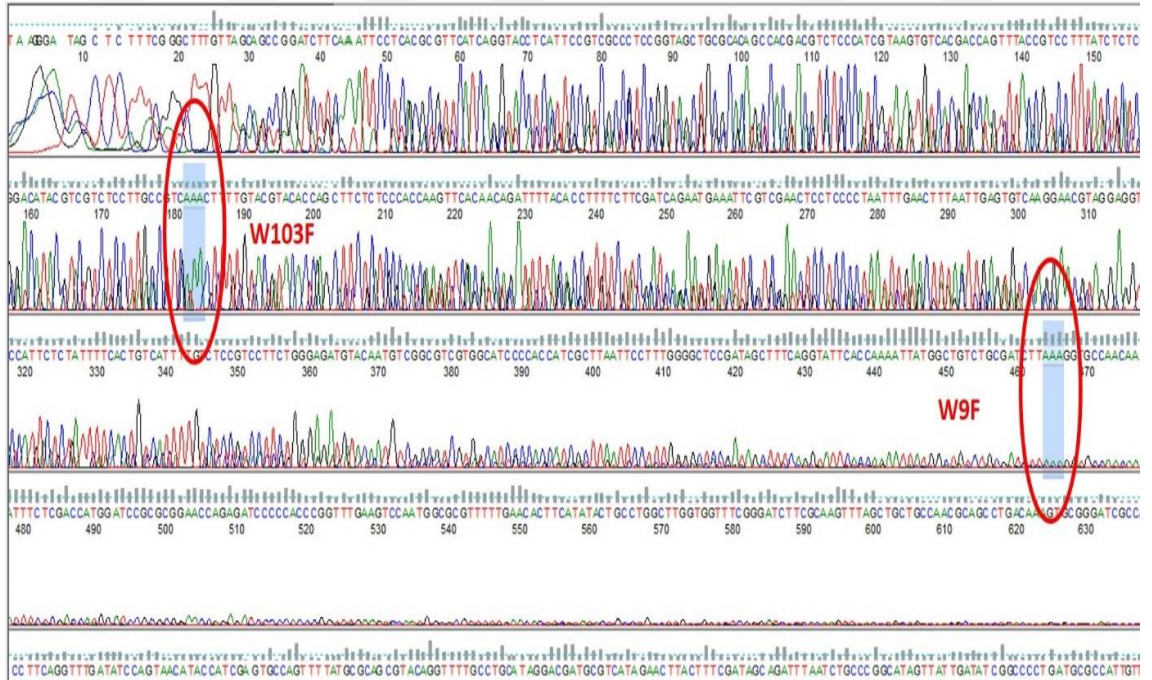
Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames. In the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

W9F_W103F

3'5' Frame 2

FRGTHNGFPSRNNFVYLYEGDIPICITITRANNGASGADINNYAGQIKSAIESKFPYDASSYAGKTCTLRIKLALDGMetLLDIKPEGGDPALCQAAALAAKLAKIPKPPSQAVYEVFNAPLDFKPGGSLVPRGSMetVEKFGVGIADSHNEGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKGDGKMetTVKIENGPPTFLDTQVKFKLGEEFDEFHSDRRKGVKSVVNLVGERLWVYVQWIGKETTYYREIKDGKLVVTLTMetGDVVAVRSYRRATE Stop GT Stop Stop TREEF Stop RSGC Stop QSPKELSL

Ek-B 17. W0F_W103F mutasyonunun sekanslama sonucunun ExPASy Translate Tool sonucu



Ek-B 18. W0F_W103F mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

* T7 geri primeri ile dizileme yapıldığı için sekans sonucu 3'-5' yönündedir.

T61V T37V

5' Frame 1

MetVEK FVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGD **AT**PTLYISQKDGDK MetTVKIENGP**TA**LDTQVKFKLGEEFDEFPSSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYYREIKDGKLVVTL**Met**SDVVAVRSYRRATE Stop

ExPASy
SIB
Bioinformatics Resource Portal

Translate

T61V T37V

Home | Contact

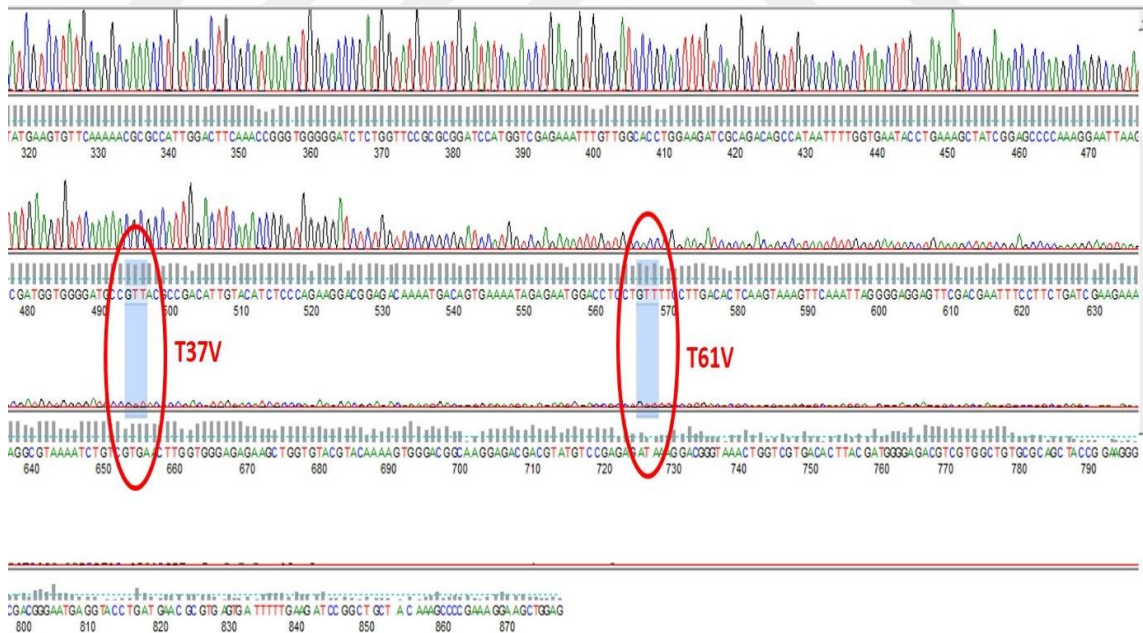
Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5' Frame 2

QGSL Stop IFCLTLRRRYT MetHHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGKTCTLR IKLAPDGMetLLDKPECDPALCQAALAAAKLAKIPKPPSQAYVEVEKNA PLDFKPGGSLVPRGS MetVEK FVGTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGD **VT**PTLYISQKDGDK MetTVKIENGP **VF**LDTQVKFKLGEEFDEFPSSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYYREIKDG **Stop** TCGD TDYDGETSWLCAATGRATGMetVY MetNA StopVIFEDPAATKPRKEAG

Ek-B 19. T61V_T37V mutasyonunun sekanslama sonucunun ExPASy Translate Tool sonucu



Ek-B 20. T61V_T37V mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

T61S T37S

5'3' Frame 1

MetVEKFGVTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPTLDLTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKG
 VKSVVNLVGEKLVVYQKWDGKETTYYVREIKDGKLVLEIMetGDVVAVRSYRRATE Stop

ExPASy
 Bioinformatics Resource Portal

Translate

T61S_T37S

Home | Contact

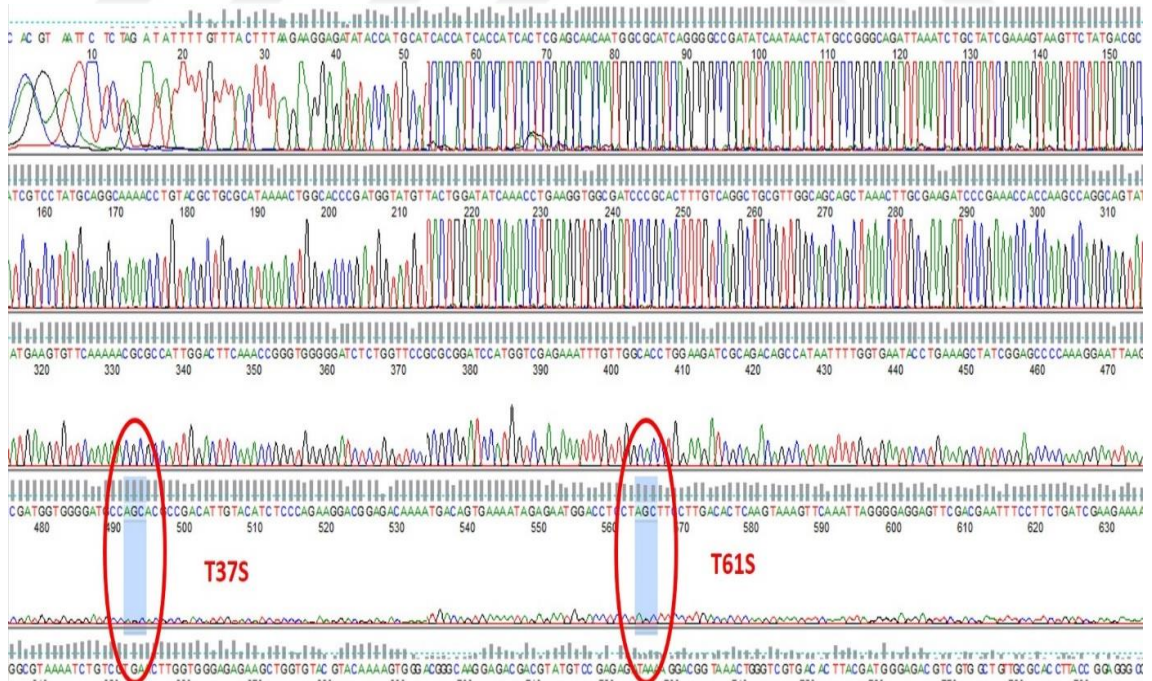
Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 3

KYSLDILFTLRRRYTMetHHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFDASSYAGKTCTLRIKLAPDGMetLLDKPEGGDPALCQ
 AALAAAKLAKIPKPPSQAYVEFKNAPLDFKPGGSLVPRGSMetVEKFGVTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDASPTLYIS
 QKDGDKMetTVKIENGPTLDLTQVKFKLGEEFDEFPSDRRKGKSVVNLVGEKLVVYQKWDGKETTYYVREIKDGKTRGTYDGRR
 RGCAQLPEGDGNEVPDLRLNF

Ek-B 21. T61S_T37S mutasyonunun sekanslama sonucunun ExPASy Translate Tool sonucu



Ek-B 22. T61S_T37S mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

T61A T37A

5'3' Frame 1

MetVEKFGVTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDATTPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPTLDTQVKFKLGEFEDEFPSDRRKGVKSVVNLVGEKLVYVQKWDGKETTYVREIKDGKLVVLEMetGDVVAVRSYRRATEStop

 **ExpASY**
Bioinformatics Resource Portal

Translate

T61A_T37A

Home | Contact

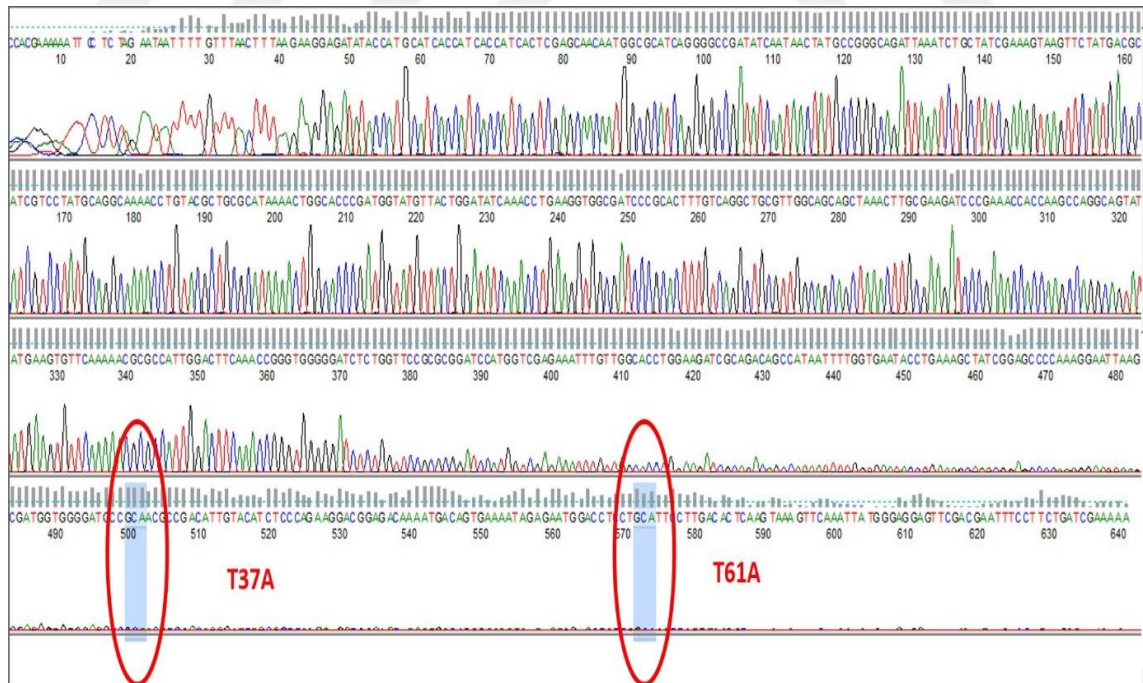
Translate Tool - Results of translation

Open reading frames are highlighted in red. Please select one of the following frames - in the next page, you will be able to select your initiator and retrieve your amino acid sequence:

5'3' Frame 2

HEKIPLEStopFCLTLRRRYTMetHHHHHSSNNGASGADINNYAGQIKSAIESKFYDASSYAGKTCTLRIKLAPDGMetLLLDIKPEGGDPALCQAALAAAKLAKIPKPPSQAYVEYFNAPLDFKPGGSLVPRGSMetVEKFGVTWKIADSHNFGEYLKAI GAPKELSDGGDAAAPTLYISQKDGDKMetTVKIENGPPTLDTQVKFKLWEEFDEFPSDRK

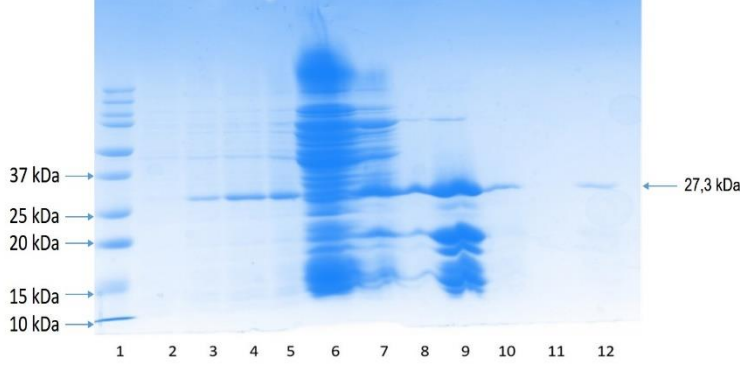
Ek-B 23. T61A_T37A mutasyonunun sekanslama sonucunun ExpASY Translate Tool sonucu



Ek-B 24. T61A_T37A mutasyonunun sekanslamasına ait kromotogram

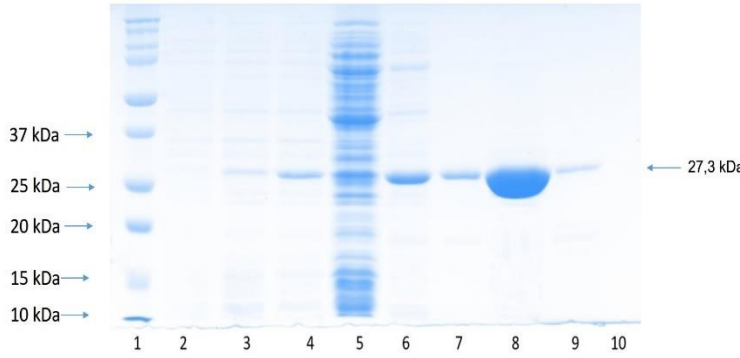
5.3. Ek-C: Elektrophorez Uygulama Çıktıları

N57D



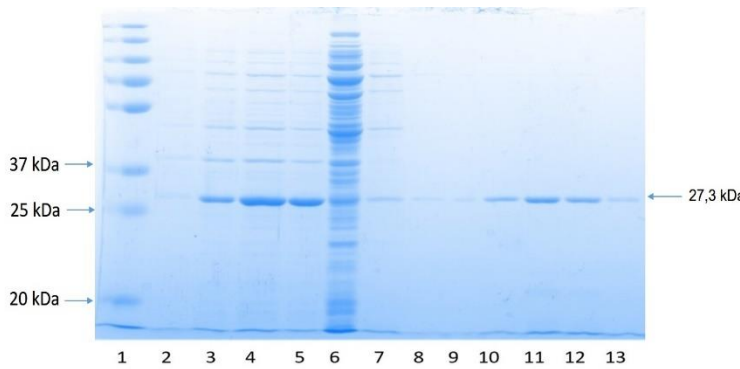
Ek-C 1. N57D üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama 5, 12. Elüsyon

N57E



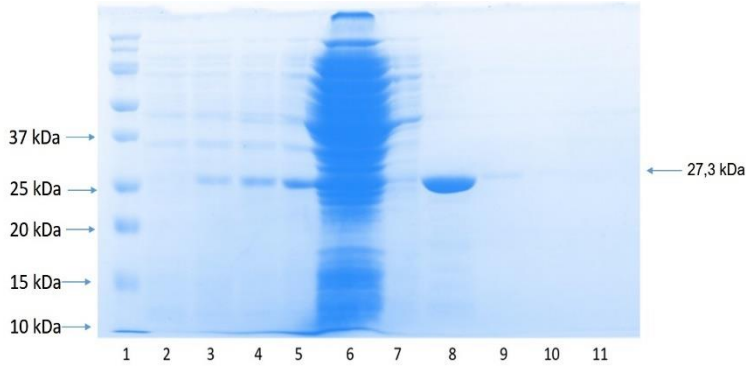
Ek-C 2. N57E üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Kolondan geçmiş süpernatant, 6. Yıkama1, 7. Yıkama2, 8. Yıkama3, 9. Yıkama4, 10. Elüsyon

N57R



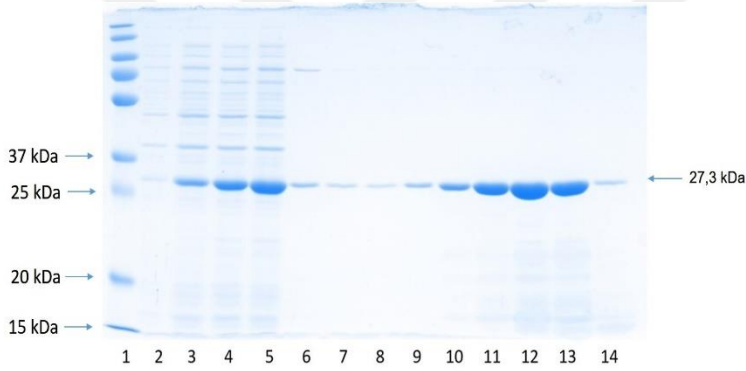
Ek-C 3. N57R üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Yıkama6, 13. Elüsyon

F17Y



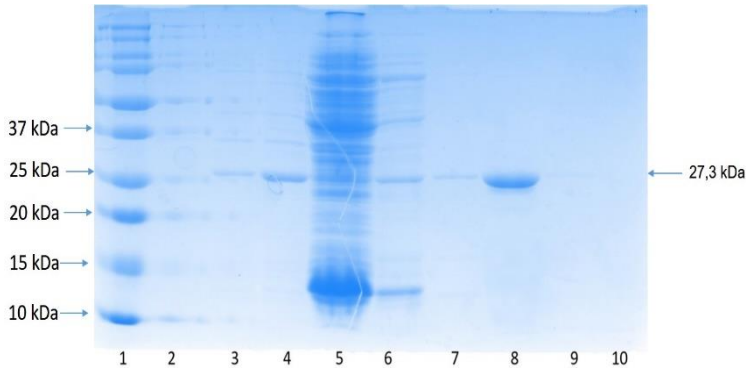
Ek-C 4. F17Y üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Elüsyon

F17M



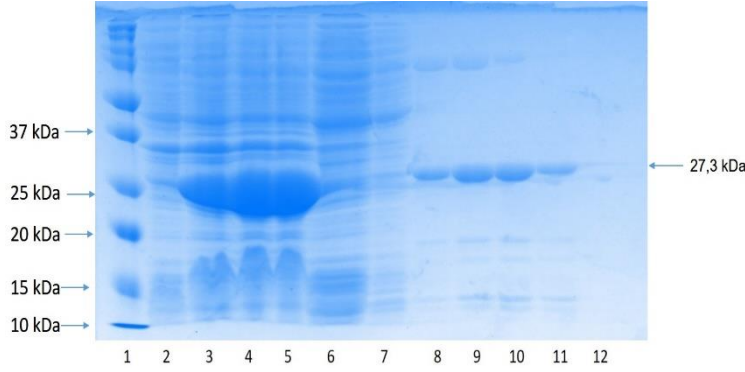
Ek-C 5. F17M üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Yıkama1, 7. Yıkama2, 8. Yıkama3, 9. Yıkama4, 10. Yıkama5, 11. Yıkama6, 12. Yıkama7, 13. Yıkama8, 14. Elüsyon

L41F



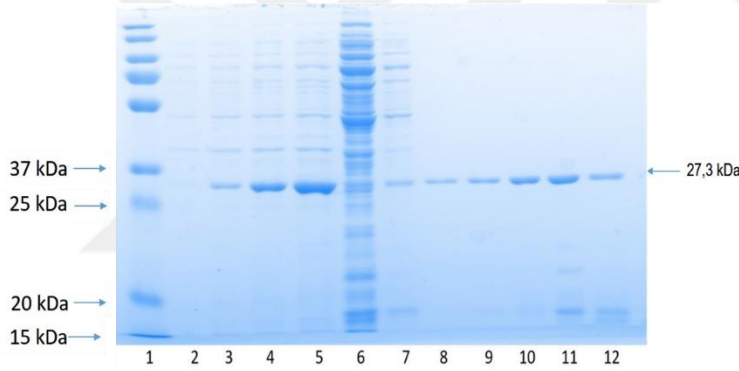
Ek-C 6. L41F üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Kolondan geçmiş süpernatant, 6. Yıkama1, 7. Yıkama2, 8. Yıkama3, 9. Yıkama4, 10. Elüsyon

Y99F_Y134W



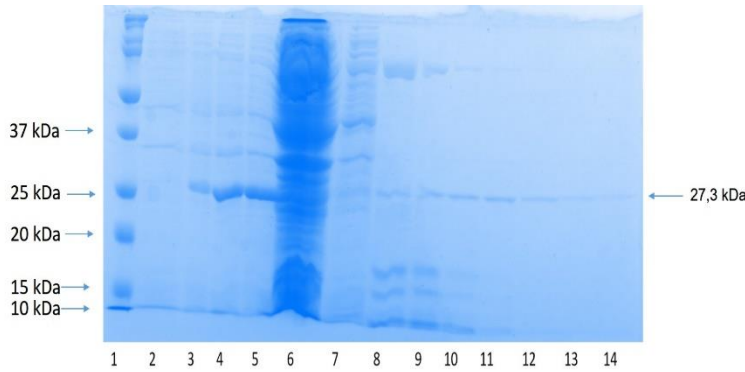
Ek-C 7. Y99F_Y134W üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Elüsyon

Y99M_Y134M



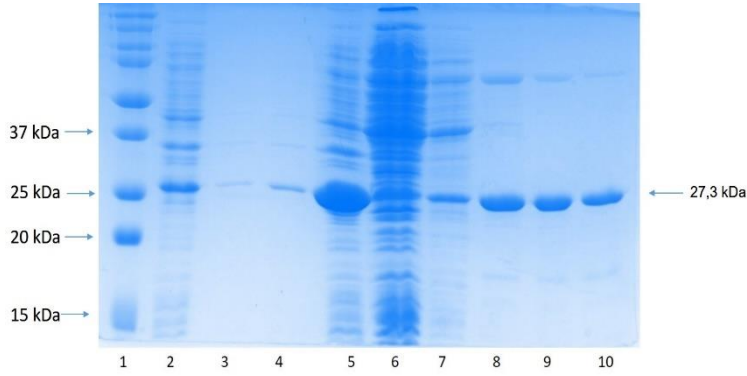
Ek-C 8. Y99M_Y134M üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Elüsyon

W9F_W103F



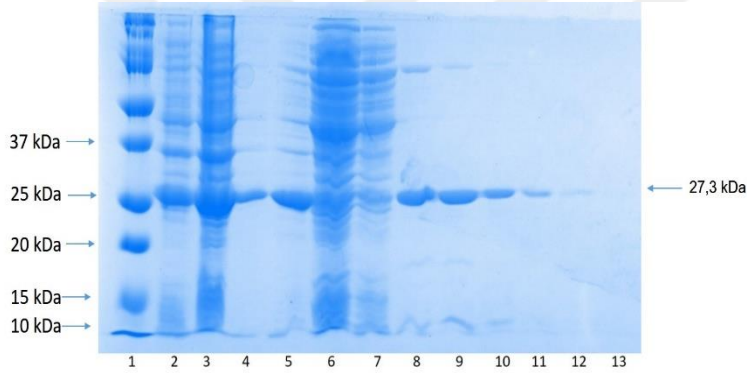
Ek-C 9. W9F_W103F üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırncı saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Yıkama6, 13. Yıkama7, 14. Elüsyon

T61A T37A



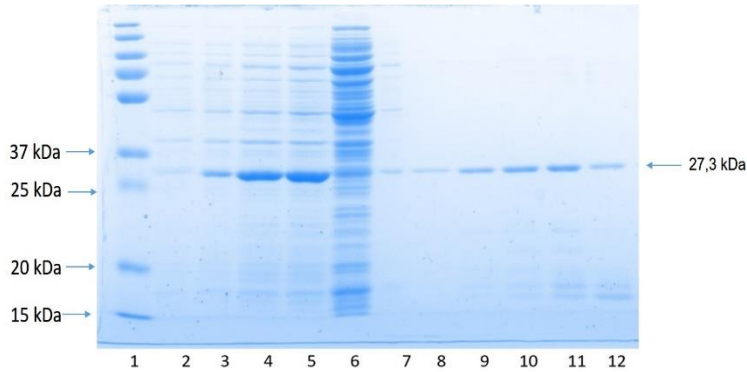
Ek-C 10. T61A_T37A üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Elüsyon

T61S T37S



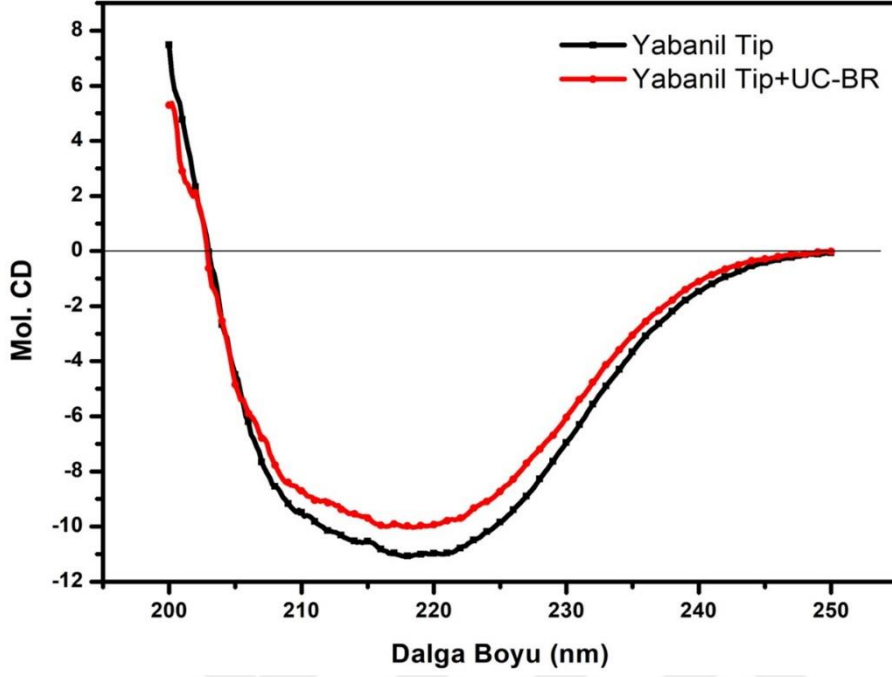
Ek-C 11. T61S_T37S üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Yıkama6, 13. Elüsyon

T61V T37V

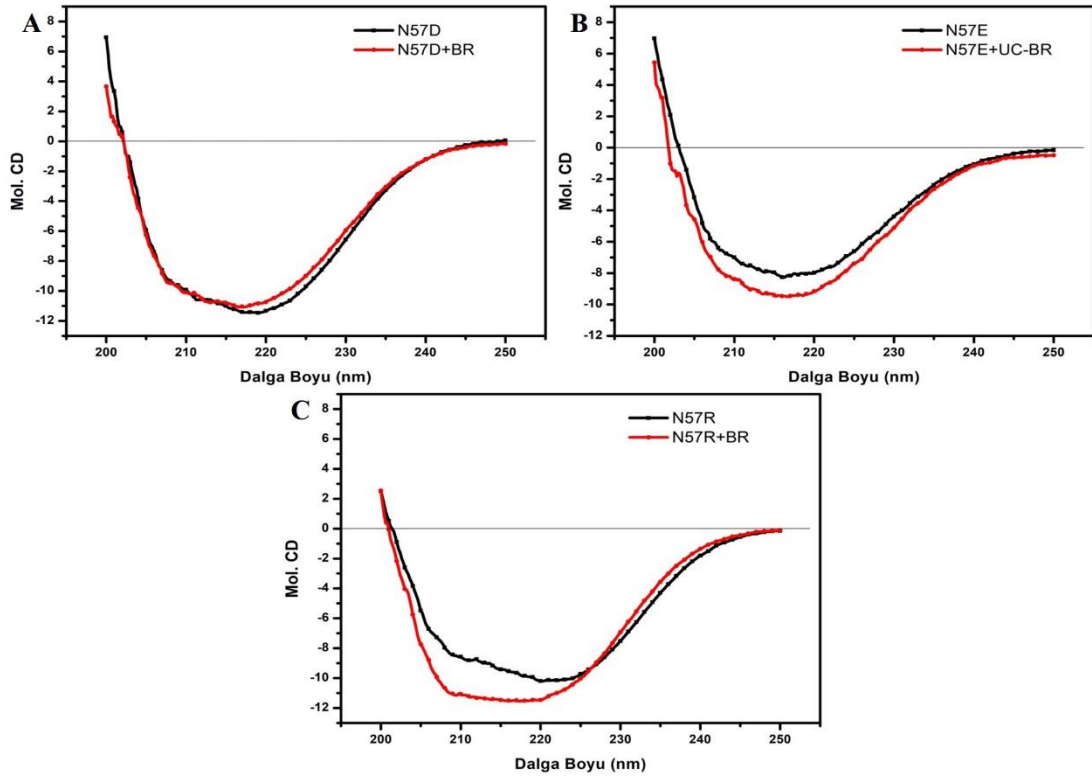


Ek-C 12. T61V_T37V üretim ve saflaştırma SDS PAGE jel görüntüsü; 1. Ladder, 2. Üretimin sıfırinci saati, 3. Üretimin birinci saati, 4. Üretimin ikinci saati, 5. Üretimin üçüncü saati, 6. Kolondan geçmiş süpernatant, 7. Yıkama1, 8. Yıkama2, 9. Yıkama3, 10. Yıkama4, 11. Yıkama5, 12. Elüsyon

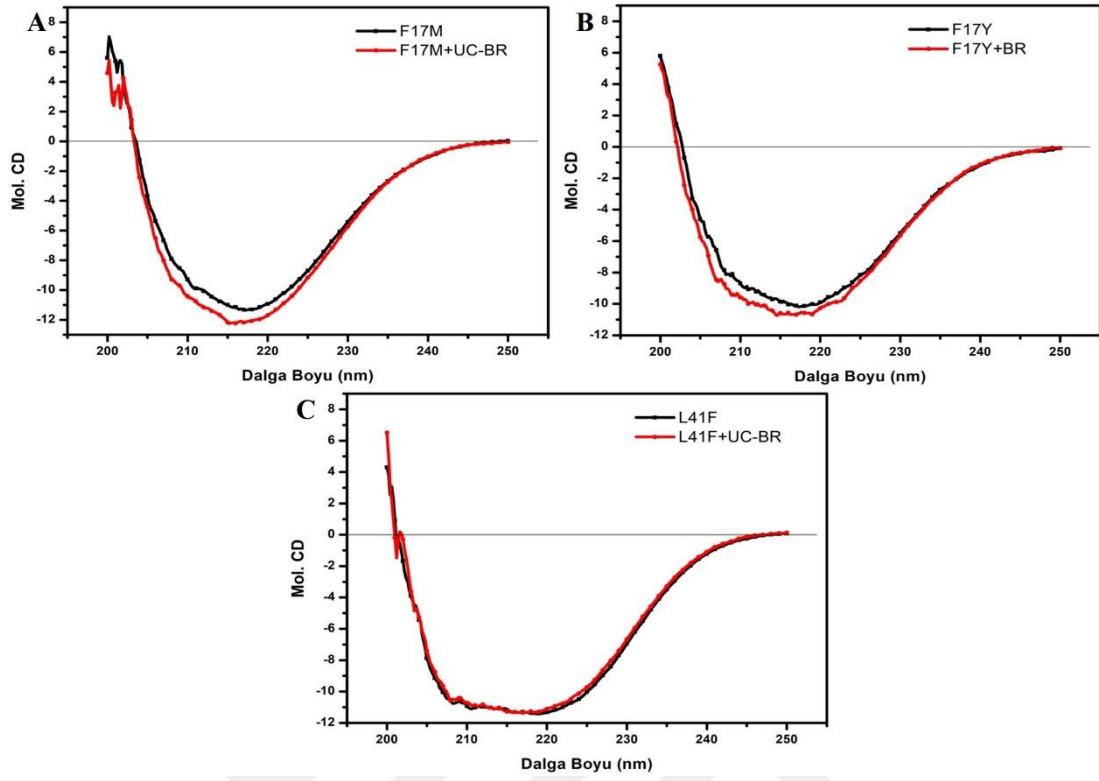
5.4. Ek-D: CD Spektroskopisi Çıktıları



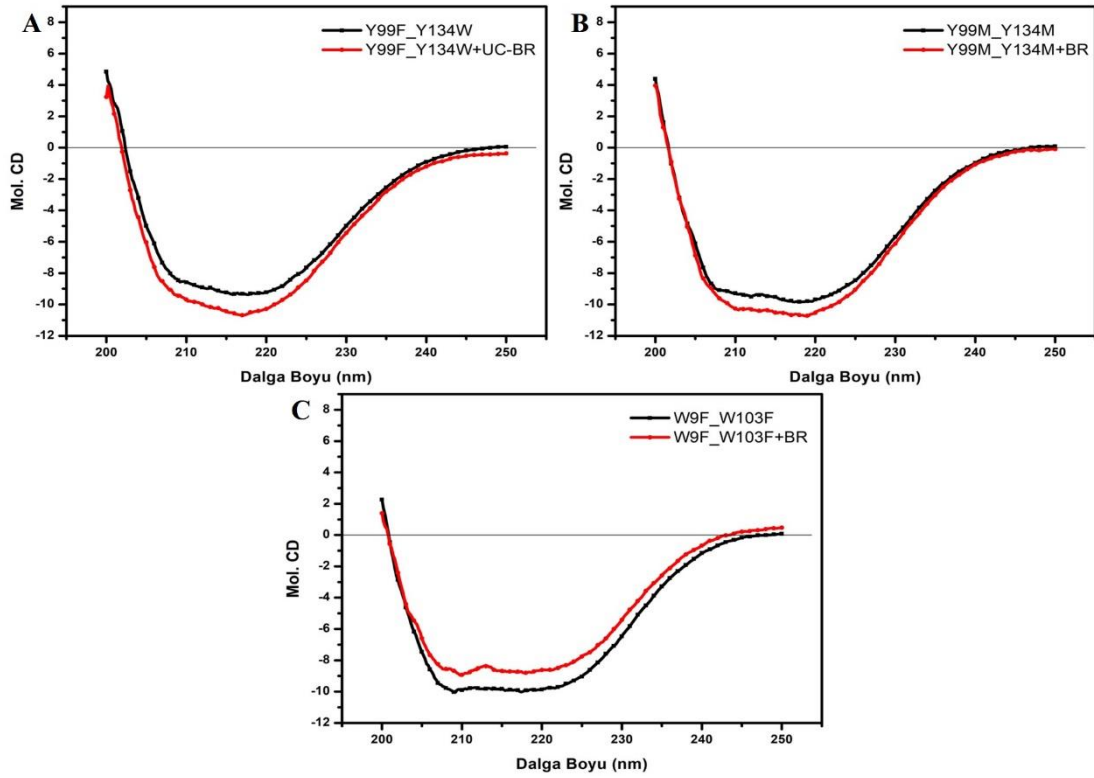
Ek-D 1. Yabanil tip Apo/HoloUnaG proteinine ait Far UV CD spektrumu



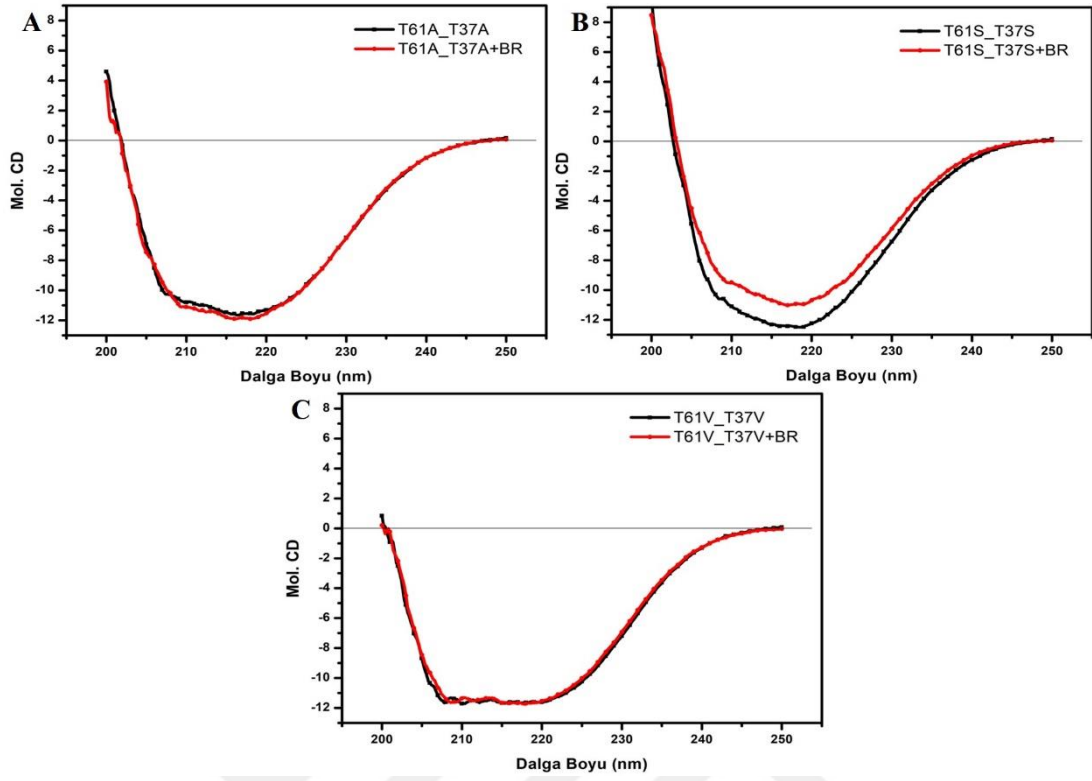
Ek-D 2. Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesi ile elde edilen mutant UnaG proteinlerine ait Far UV CD spektrumları (A. N57D, B. N57E, C. N57R)



Ek-D 3. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi ile elde edilen mutant UnaG proteinlerine ait Far UV CD spektrumları (**A.** F17M, **B.** F17Y, **C.** L41F)

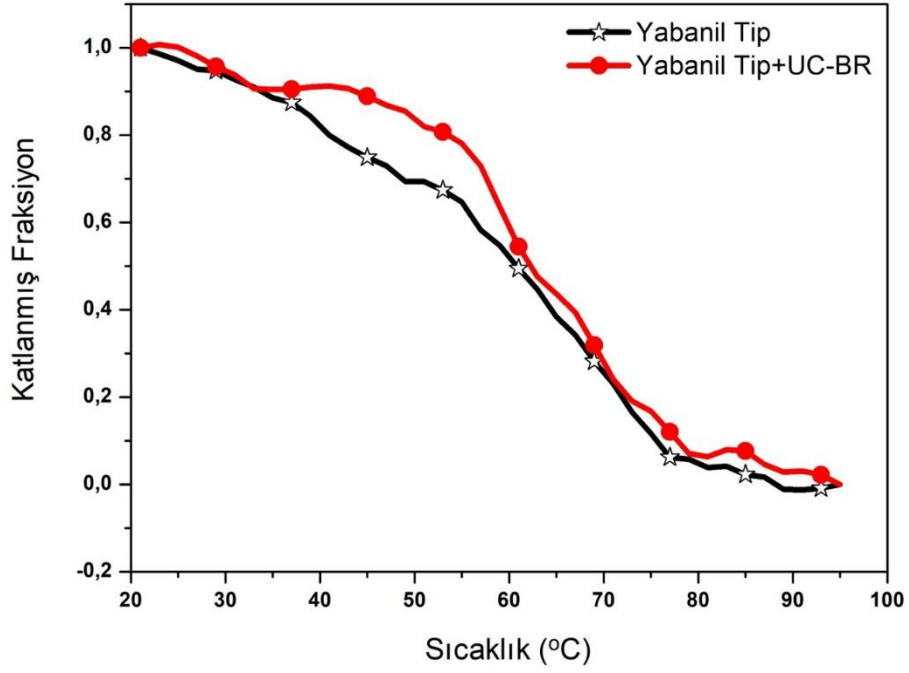


Ek-D 4. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi ile elde edilen mutant UnaG proteinlerine ait Far UV CD spektrumları (**A.** Y99F_Y134W, **B.** Y99M_Y134M, **C.** W9F_W103F)

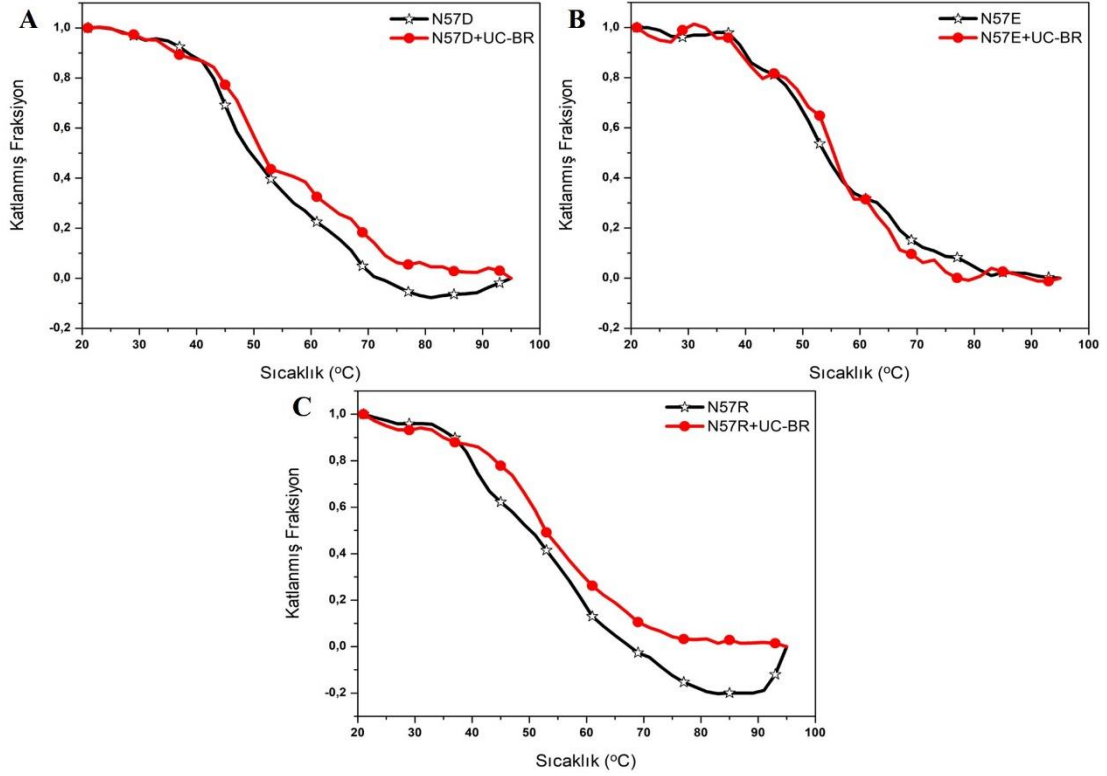


Ek-D 5. Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesi ile elde edilen mutant UnaG proteinlerine ait Far UV CD spektrumları (**A.** T61A_T37A, **B.** T61S_T37S, **C.** T61V_T37V)

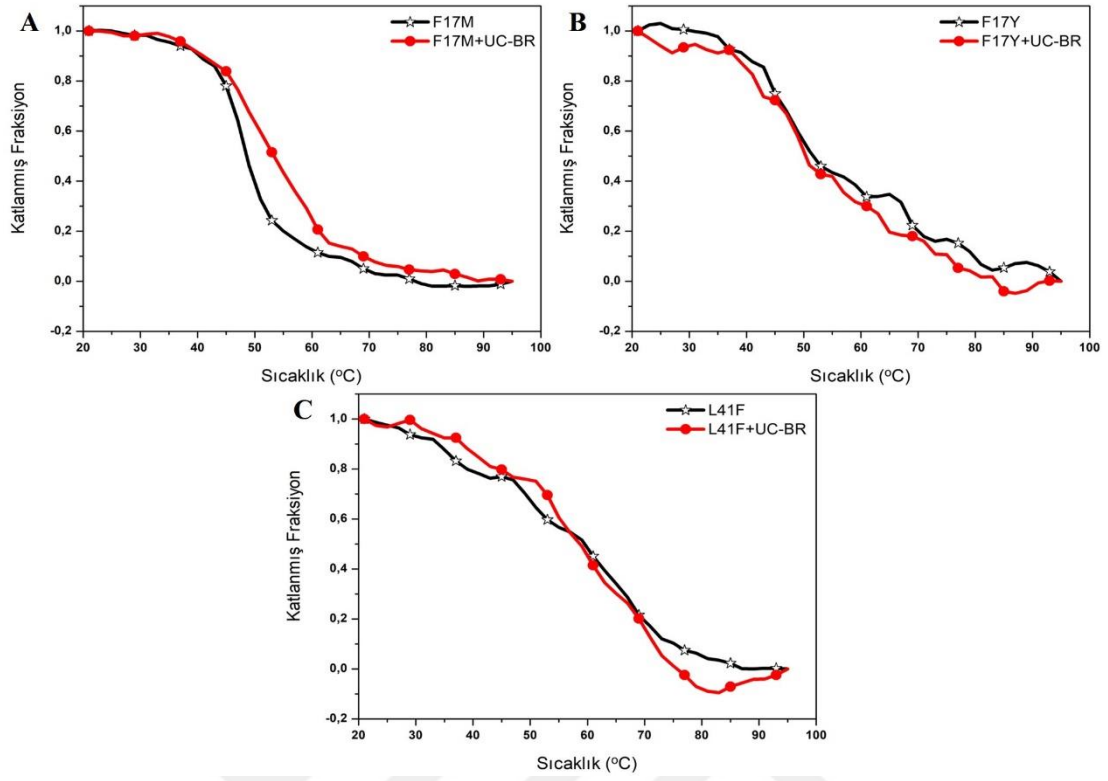
5.5. Ek-E: Termal Açılma Sıcaklık Çıktıları



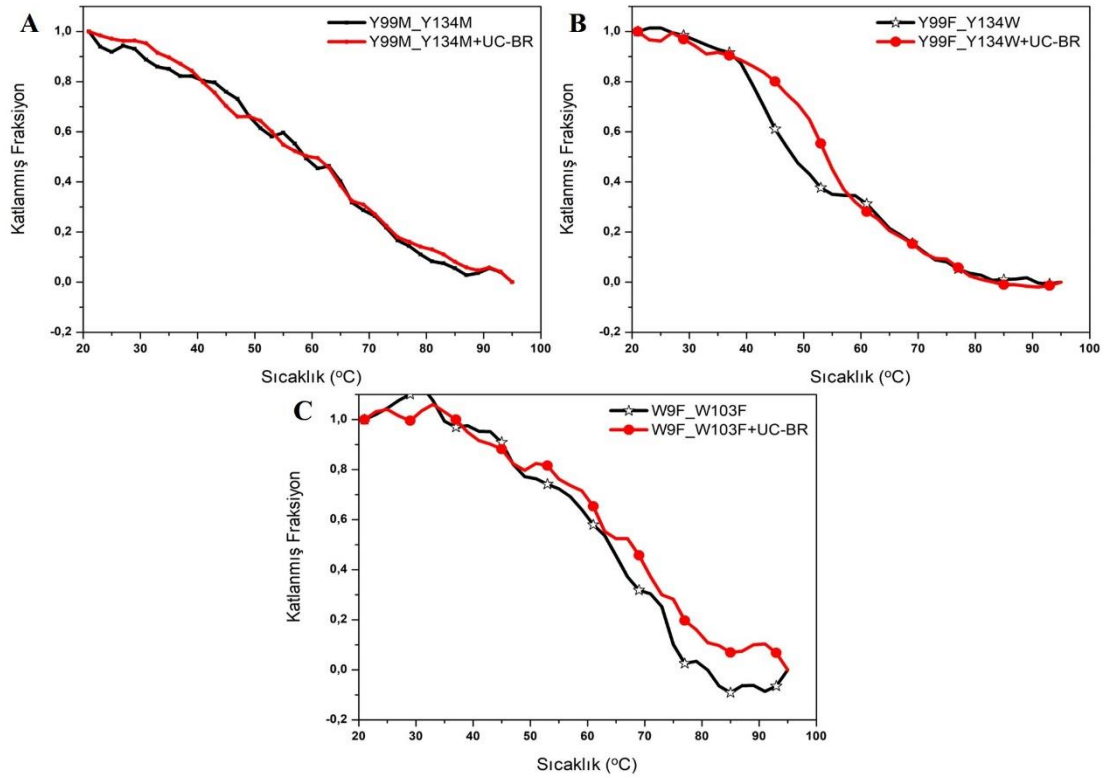
Ek-E 1. Yabanil tip Apo/HoloUnaG proteinine ait termal açılma grafiği



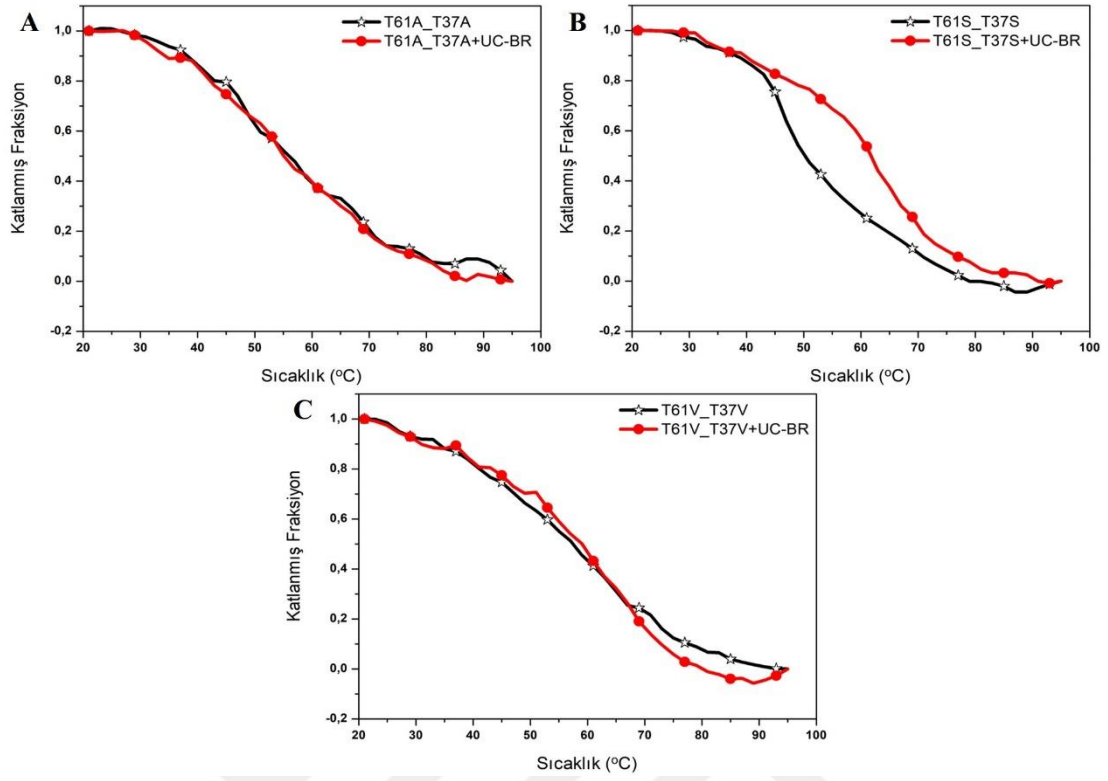
Ek-E 2. Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesiyle elde edilen Apo/Holo mutant UnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri (A. N57D, B. N57E, C. N57R)



Ek-E 3. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi elde edilen Apo/Holo mutant UnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri (A. F17M, B. F17Y, C. L41F)

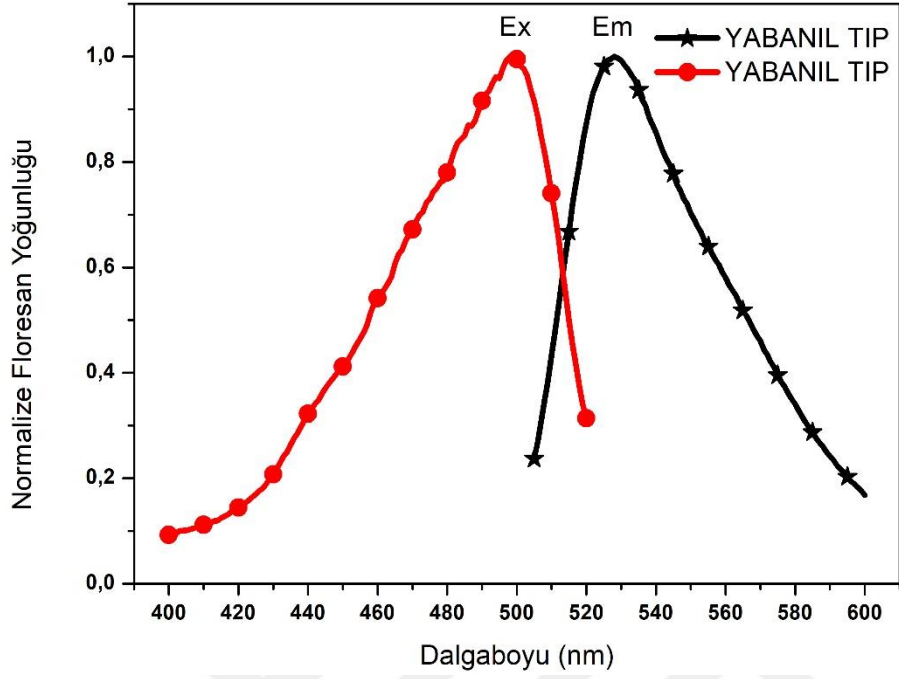


Ek-E 4. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesi elde edilen Apo/Holo mutant UnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri (A. Y99F_Y134W, B. Y99M_Y134M, C. W9F_W103F)

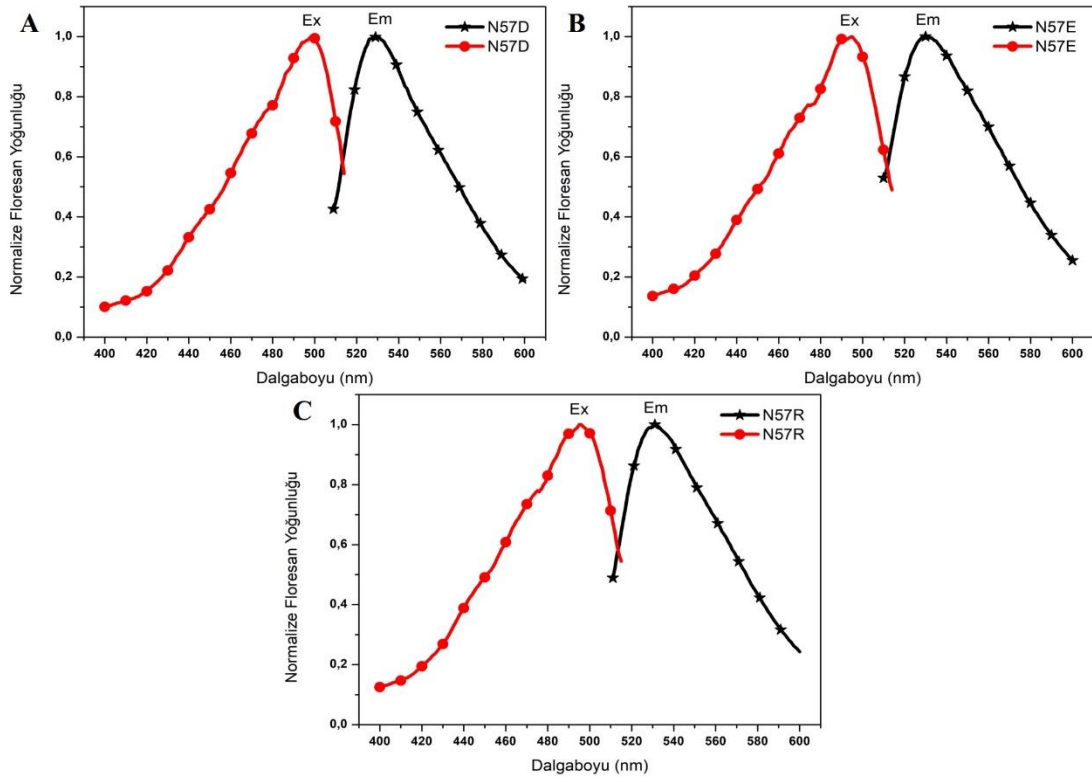


Ek-E 5. Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesiyle elde edilen Apo/Holo mutant UnaG proteinlerine ait termal açılma grafikleri (**A.** T61A_T37A, **B.** T61S_T37S, **C.** T61V_T37V)

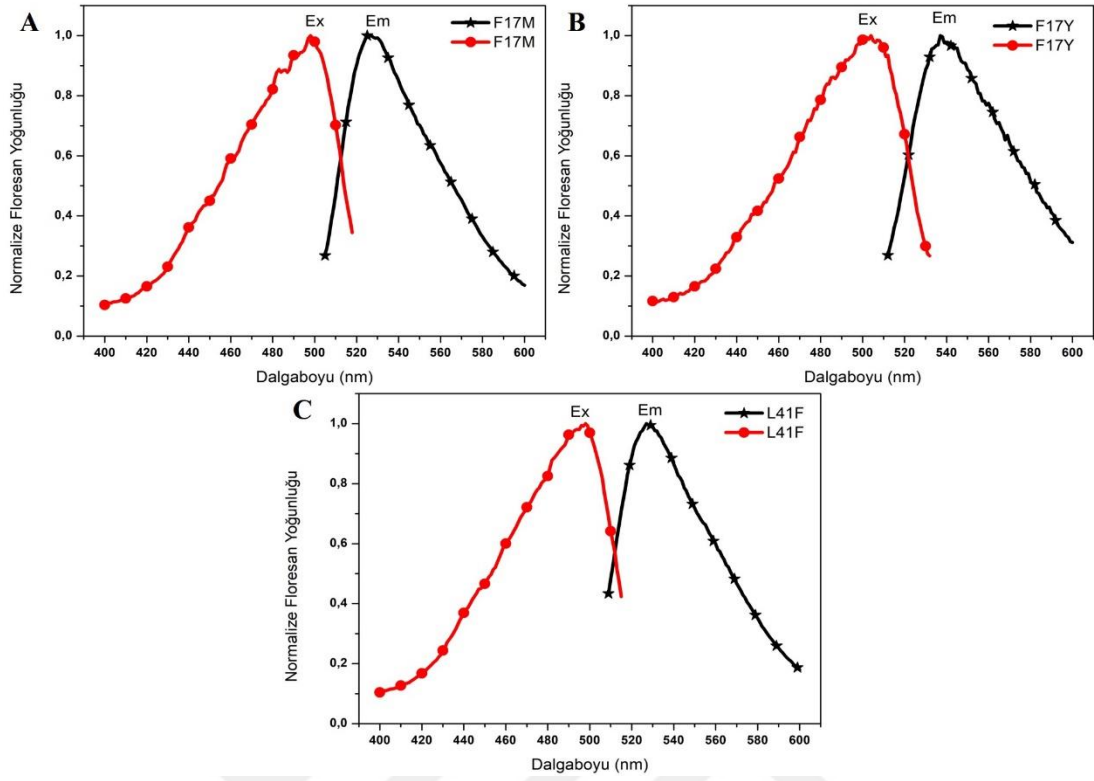
5.6. Ek-F: Floresan Spektroskopisi Çıktıları



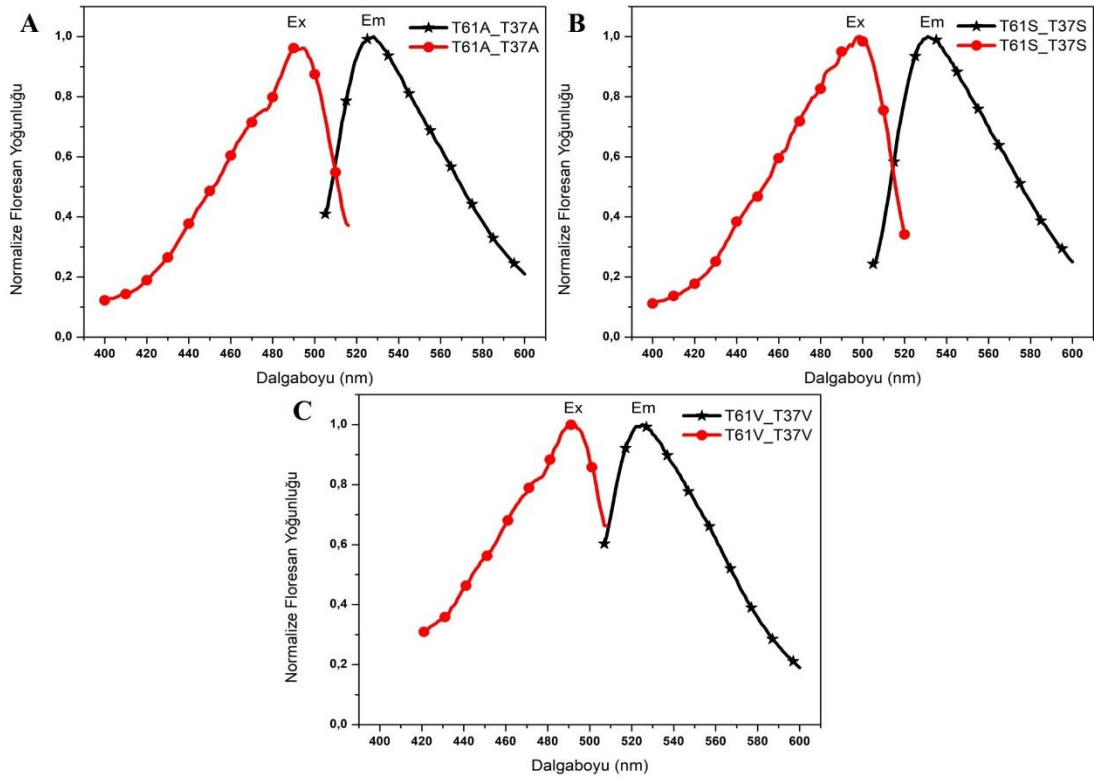
Ek-F 1. Yabanıl tip HoloUnaG proteinine ait uyarılma ve ışıma grafiği



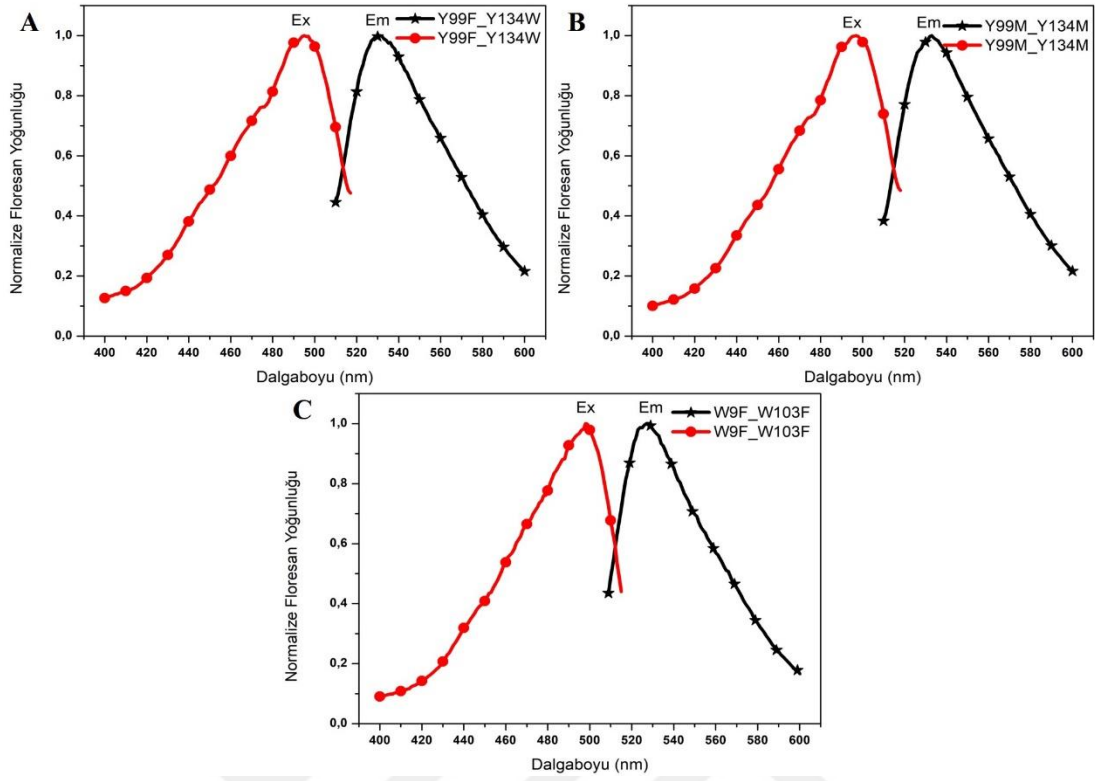
Ek-F 2. Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesiyle elde edilen mutant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışıma grafikleri (A. N57D, B. N57E, C. N57R)



Ek-F 3. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesiyle elde edilen mutant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışımaya grafikleri (A. F17M, B. F17Y, C. L41F)

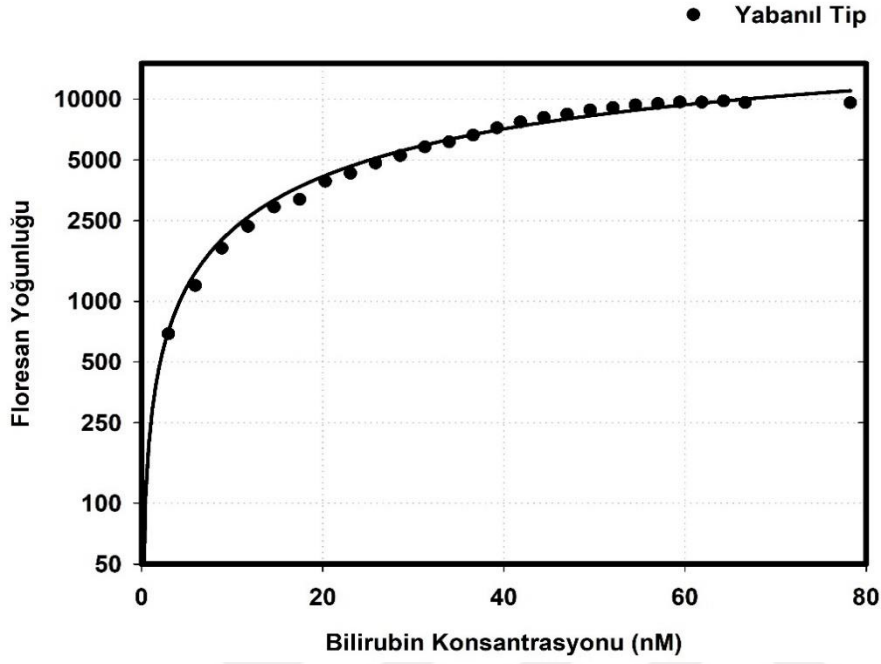


Ek-F 4. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesiyle elde edilen mutant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışımaya grafikleri (A. Y99F_Y134W, B. Y99M_Y134M, C. W9F_W103F)

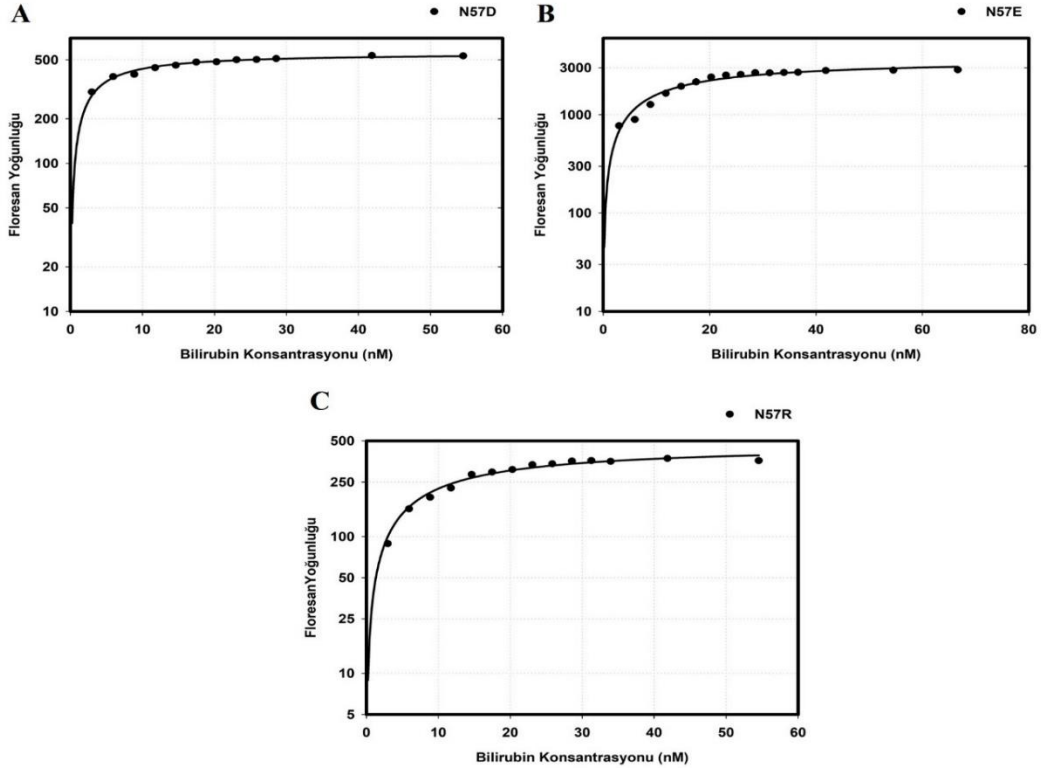


Ek-F 5. Floresan ligandinin çevresinin değiştirilmesiyle elde edilen mutant HoloUnaG proteinlerine ait uyarılma ve ışma grafikleri (**A.** T61A_T37A, **B.** T61S_T37S, **C.** T61V_T37V)

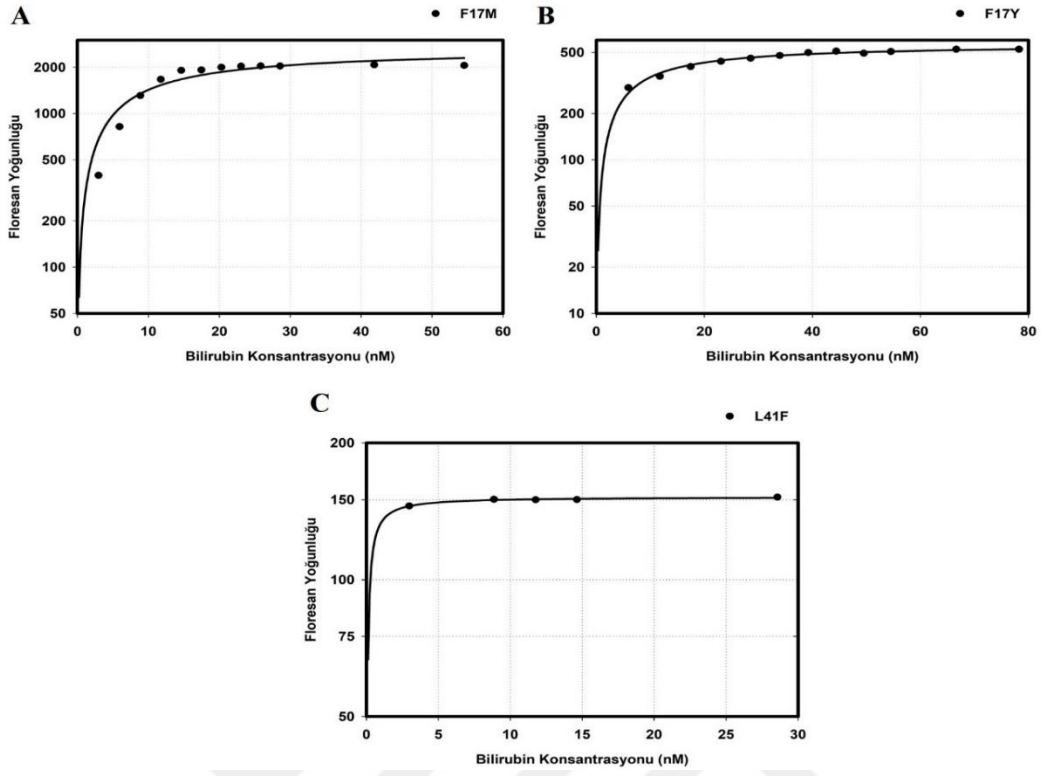
5.7. Ek-G: Ayrışma Sabiti Çıktıları



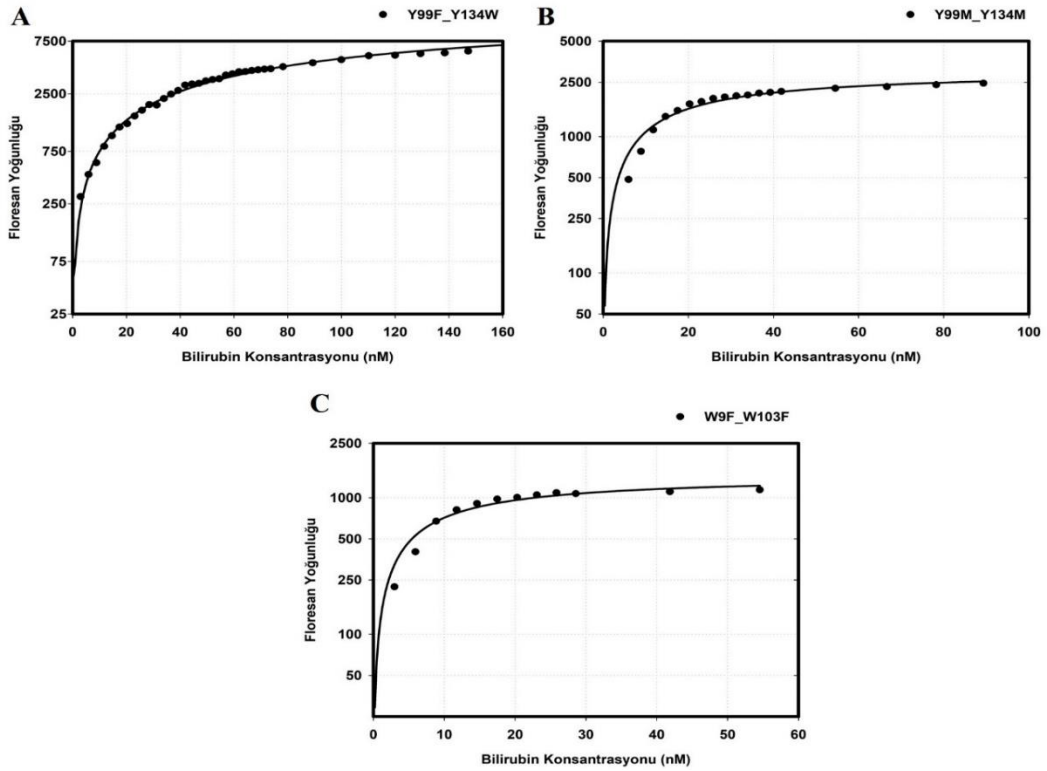
Ek-G 1. Yabancı tip UnaG proteinine ait bilirubin lineer doygunluk eğrisi



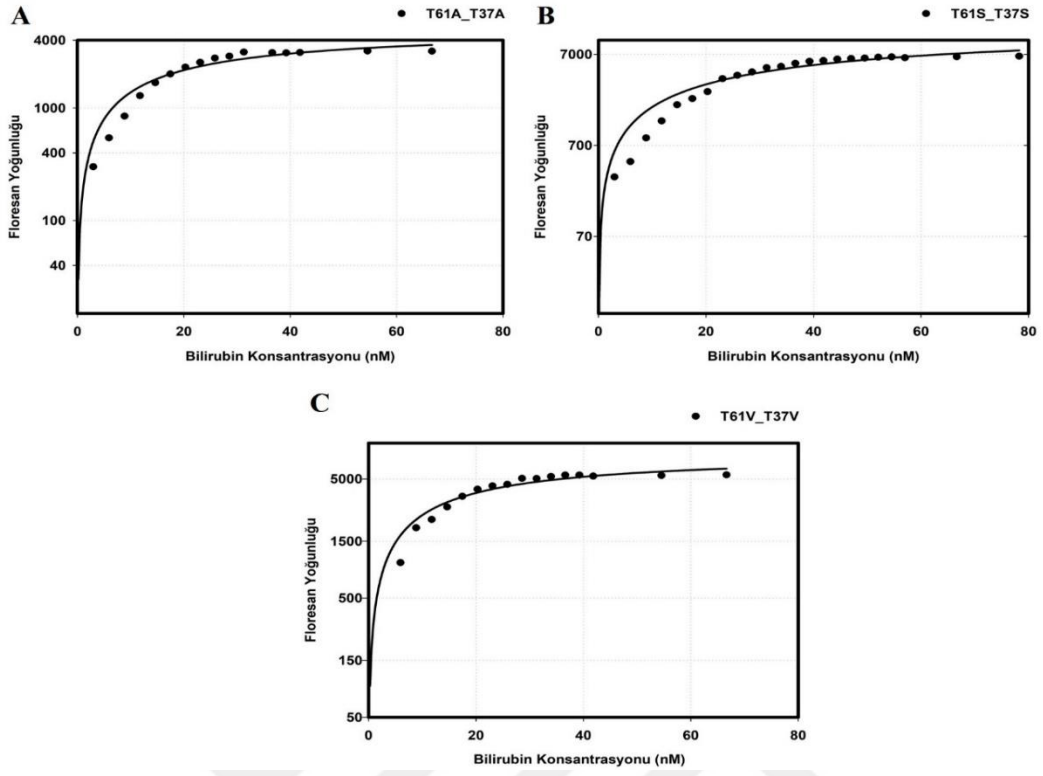
Ek-G 2. Polar amino asit gruplarının bilirubin bağlanma bölgesine ilavesiyle elde edilen mutasyonlara ait bilirubin lineer doygunluk eğrileri (A. N57D, B. N57E, C. N57R)



Ek-G 3. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesiyle elde edilen mutasyonlara ait bilirubin lineer doygunluk eğrileri (A. F17M, B. F17Y, C. L41F)



Ek-G 4. Bilirubin bağlanma bölgesindeki aromatik rezidülerin değiştirilmesiyle elde edilen mutasyonlara ait bilirubin lineer doygunluk eğrileri (A. Y99F_Y134W, B. Y99M_Y134M, C. W9F_W103F)



Ek-G 5. Floresan ligandın çevresinin değiştirilmesiyle elde edilen bilirubin lineer doygunluk eğrileri (A. T61A_T37A, B. T61S_T37S, C. T61V_T37V)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı: Numan ECZACIOĞLU
E-posta: numanezczacioglu@gmail.com

Eğitim:

Lise: Tokat Atatürk Lisesi, 2002-2006
Lisans: Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, 2007-2012
Yüksek Lisans: Gazi Osman Paşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, 2012-2015

Yabancı Dil ve Düzeyi: İngilizce- İyi

İş Deneyimi: Araştırma Görevlisi-Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Tezden Üretilmiş Proje: Newcastle Üniversitesi ve Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi ikili iş birliği ile TÜBİTAK (Proje No: 215Z700) & British Council (Proje No: RES / 0120 / 7785) Newton Kâtip Çelebi Fonu

Tezden Üretilmiş Yayınlar:

1. Ezczacioglu, N., Yilmaz, B., Ulusu, Y., & Bayrakci, M. (2020). Recovery and Reusability of ApoUnaG Fluorescence Protein from the Unconjugated Bilirubin Complex Structure. Journal of Fluorescence, 1-7.
2. Ezczacıoğlu N., ve Ulusu Y. "Generation, Expression, Purification and Biophysical Characterization of First Ligand Dependent Fluorescence Protein UnaG Mutants" (Basımda)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ile Katıldığı Toplantılar:

1. Ezczacıoğlu N., Ulusu Y., Gökçe İ. ve Lakey J. H., "The Single Point Mutation on UnaG Fluorescence Protein", Sr Congress, 8-10 Şubat, Alanya-Türkiye (Sözlü Sunum)
2. Ulusu Y., Ezczacıoğlu N., Gökçe İ. ve Lakey J. H., "Generation and Characterization of Some UnaG Mutant", International Conference on Biotechnology, Biomarkers & Systems Biology, 4-5 Mart, Amsterdam-Hollanda (Sözlü Sunum)

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Mandibular Defektlerde VEGF ve BMP-2 Salımı Gerçekleştiren Biyobozunur Doku İskelelerinin Kullanılması, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 2013-2015 (ULUSAL)
2. Mandibular Kemik Defektlerinde Sıralı VEGF165 ve BMP 2 Salımı Gerçekleştiren Gözenekli PLA PEG Kopolimer Doku İskelelerinin Üretilmesi, BAP, Araştırmacı, 2014-2015 (ULUSAL)
3. Makarnalık buğdayda (Triticum durum) kuraklık stresinin antioksidan savunma sistemi üzerine etkilerinin araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 2016-2017 (ULUSAL)

4. UnaG Proteininin Bilirubin Biyosensöründe Kullanımı için Protein Mühendisliği Teknikleriyle Üretilmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 2017-2019 (ULUSAL)

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

- Eğri S. ve Eczacıoğlu N., (2017). Sequential VEGF and BMP-2 releasing PLA-PEG-PLA scaffolds for bone tissue engineering: I. Design and in vitro tests. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(2), 321-329., Doi: 10.3109/21691401.2016.1147454 (Yayın No: 2579260)

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında bildiriler:

- Dede Z., Eczacıoğlu N., Lakey J. H., Gökçe İ., ve Ulusu Y., (2019). UnaG proteininin varyantına (R112/132Q) ait rekombinant DNA'nın geliştirilmesi. 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019), (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Ulus Y., Eczacıoğlu N., Gökçe İ. ve Lakey J. H., (2019). Generation and Characterization of Some UnaG Mutant. 23rd Edition of EuroSciCon Conference on Biotechnology Bioengineering, 5, 28-28., (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Akin S., Eczacıoğlu N., Terzi B., Ulusu Y., Ateş S. Ö., ve Sönmezoğlu S., (2017). An Insight into Genetically Modified Energy – How DNA Enhances Photoelectrochemical Solar Cells. The European Materials Research Society (E-MRS) - 2017 Fall Meeting (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Ulus Y., Eczacıoğlu N., Terzi B., ve Ateş S. Ö., (2017). Investigation of the effects of drought stress on antioxidant defense enzymes in five different wheat varieties grown in Turkey. ICONSETE '2017-3rd International Conference on Science, Ecology and Technology (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Eczacıoğlu N., Terzi B., Ateş S. Ö., ve Ulusu Y., (2017). Effect of Drought Stress on Antioxidant Enzyme Activities in Some Wheat Genotypes. 3rd International Conference on Engineering and Natural Sciences (ICENS 2017) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Ulus Y., Eczacıoğlu N., Waller H., ve Lakey J. H., (2017). Effects of Some Proteases upon *Yersinia pestis* Polymeric Protein Caf1. 3rd international conference on engineering and natural science (3rd ICENS) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Ulus Y., Eczacıoğlu N., Gökçe İ., Waller H., ve Lakey J. H., (2016). Modification of *Escherichia coli* PtoIT Expression Vector via Site Directed Mutagenesis. 18th International Conference on Bioengineering and Biomedical Engineering (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Ulus Y., Özel F., Eczacıoğlu N., Özen A., ve Açıkgöz S., (2016). Fabrication of electrospun green fluorescent protein nano fibers for biomedical application. 18th International Conference on Bioengineering and Biomedical Engineering, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
- Eğri S., Eczacıoğlu N., ve Özkan N., (2015). In vivo application of sequentially VEGF and BMP-2 releasing biodegradable scaffolds in mandibular defects. *Nanomed 2015 and Nanobiotech 2015*, (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

Eczacıoğlu N. ve Eğri S., (2014). PLLA-PEG Kopolimerlerinden Gözenekli Doku İskelelerin Hazırlanması. V. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi, 151 (/Sözlü Sunum)

