

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

MBTK-2020-0003

BAKTERİ YÜZEY GÖSTERİM TEKNİĞİ İLE
REKOMBİNANT NÜKLEAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI

YUNUS DOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEF-19022 proje numarası ile desteklenmiştir ve Rekombinant DNA ve Rekombinant Protein (REDPROM) Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Yunus DOĞAN tarafından hazırlanan “Bakteri Yüzey Gösterim Tekniği İle Rekombinant Nükleaz Enziminin Saflaştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/08/2020

Üye (T.D.) : Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL Aydın Adnan

Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN Aydın Adnan

Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN Akdeniz Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. SÜLEYMAN AYPAK

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın amaçları doğrultusunda sürdürülmesini sağlayan, çalışmamın her aşamasıyla yakından ilgilenen, bilgi birikimini, deneyimlerini, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Gamze BAŞBÜLBÜL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca ilgisini, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a görüş ve tavsiyelerinden dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin değerlendirilmesi sürecinde bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren ve destek olan Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a görüş ve tavsiyelerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Yüksek lisansım süresince tüm akademik çalışmalarımda gerek araştırmacılığıyla gerek arkadaşlığıyla bana yol gösteren her zaman yanımda hissettiğim, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen hocam Dr. Erman ORYAŞIN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde FEF-19022 no.'lu proje ile çalışmamızı destekleyen ADÜ BAP Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansıma başladığım günden itibaren benimle güzel dostluğunu ve bilgilerini paylaşan, daha iyi olmam için sürekli çabalayan değerli arkadaşım yüksek lisans öğrencisi Hanife SALİH'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamımda her zaman yanımda olan, başarımlarım için maddi ve manevi hiçbir şeyi esirgemeyen, her konuda sonsuz özverileriyle beni minnettar kılan annem Teslime DOĞAN'a babam Ali DOĞAN'a abim Yasin DOĞAN'a ve kardeşim Meryem Merve DOĞAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	1
2.1. Gösterim Tekniği.....	1
2.2. Bakteriyel Gösterimin Kullanım Alanları	5
2.3. Gösterim Vektöründe Kullanılacak Proteinler	7
2.3.1. Lipoprotein	7
2.3.2. Dış Membran Proteini A (OmpA).....	7
2.3.3. Streptodornaz	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. Gereç.....	11
3.1.1. Bakteri Suşları.....	11
3.1.2. Kullanılan Plazmidler.....	12
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri Ve Çözeltiler.....	12
3.2. Yöntem	14
3.2.1. Primer Tasarımı.....	14
3.2.2. <i>Lpp</i> , <i>OmpA</i> ve <i>Spd1</i> Gen Dizilerinin PCR ile çoğaltılması	17
3.2.3. <i>Lpp-OmpA</i> Gen Dizilerinin Füzyonu ve Gösterim Vektörünün Oluşturulması	18
3.2.4. Gösterim Vektörünün Transformasyonu.....	20
3.2.5. <i>Spd1</i> Gen Dizisinin Gösterim Vektörüne Klonlanması	20
3.2.6. <i>Spd1</i> Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi	21
3.2.7. <i>Spd1</i> Enziminin Hasadı.....	21
4. BULGULAR.....	23

5. TARTIŞMA.....	31
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	34
KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ.....	39

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
AXI	ampisilin, X-gal, IPTG
EDTA	Etildiamin Tetraasetikası
g	Gram
HCl	Hidroklorik Asit
IPTG	İzopropil β-d-1-tiyogalaktopiranosid
MCS	Multiple Cloning Site
ml	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
OE-PCR	Overlap-extension PCR
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	Revolution per minute
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β-D-Galactopyranoside

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Farklı gösterim tekniklerine ait görseller.).....	2
Şekil 2. Bakteriyel gösterim teknikleri.....	5
Şekil 3. Bakteri hücre yüzey gösterim tekniğinin kullanım alanları	6
Şekil 4. E. coli dış membran yapısı	7
Şekil 5. OmpA proteininin üç boyutlu yapısı (a) ve şematik gösterimi (b)	8
Şekil 6. NETs yapısı.	10
Şekil 7. Lipoprotein gen dizisi	15
Şekil 8. Dış membran proteini A (OmpA) gen dizisi.....	16
Şekil 9. Streptodornaz gen dizisi	17
Şekil 10. Spd1 içeren gösterim vektörünün sanal ortamda hazırlanmış hali.....	26

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. PCR sonucu oluşan ampliconlar.....	23
Resim 2. Koloni PCR sonuçları	24
Resim 3. DNaz aktivitesi ölçümü.....	25
Resim 4. Plazmid insert gösterimi	28
Resim 5. DNaz agar ile Spd1 anlatım miktarı karşılaştırması	29
Resim 6. Hücre proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü.....	30

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. SDS-PAGE reaksiyon bileşenleri	14
Tablo 2. PCR’da kullanılacak primerler	17
Tablo 3. PCR karışımındaki reaktifler ve PCR şartları.....	18
Tablo 4. OE-PCR karışımındaki reaktifler ve PCR Şartları.	19
Tablo 5. OE-PCR reaksiyon şartları	19
Tablo 6. Gram negatif bakterilerdeki gösterim tekniği ile yapılmış çalışmalar.	32

ÖZET

BAKTERİ YÜZEY GÖSTERİM TEKNİĞİ İLE REKOMBİNANT NÜKLEAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Doğan Y. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Disiplinlerarası), Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020.

Proteinlerin üretimini kolaylaştırmak ve verimini artırmak için rekombinant teknoloji sürekli geliştirilmektedir. Böylece düşük miktarda üretilen proteinlerin üretimleri artırılabilir ve bunun sonucu olarak maliyetleri düşer. Günümüzde rekombinant protein üretimi için sıklıkla kullanılan tekniklerden biri de gösterim tekniğidir. Gösterim tekniği ile füzyon proteinler hedeflenebilir ve hücre veya bakteriofajın dış yüzey proteinlerine eklenir. Gösterim tekniği yeni protein tasarlamada oldukça kullanışlıdır.

Hücre içeriğindeki çeşitli proteinler arasından hedeflenen proteini izole etmek karmaşık bir işlemdir. Bu çalışmada gösterim tekniği, sentezlenen hedef protein streptodornazı saflaştırmada kullanılmıştır. Bu amaçla *lpp*, *ompA* ve *spd1* genleri için primerler dizayn edilmiş, çoğaltılıp birleştirilen bu genler plazmide aktarılmış ve füzyon protein halinde *E. coli*'de sentezi sağlanmıştır. Ardından *E. coli* membranı izole edilmiş ve enterokinaz kesimi ile Spd1 enzimi membrandan ayrılmıştır. Membran proteinleri santrifüjle uzaklaştırıldıktan sonra Spd1 enziminin saflaştırıldığı SDS-PAGE yöntemiyle doğrulanmıştır.

Sonuç olarak klinikte kullanım alanı bulunan streptodornaz enziminin bakteri gösterim tekniği ile saflaştırılması ve bu amaçla rekombinant olarak üretilmesi, diğer klasik saflaştırma prosedürlerine kıyasla oldukça hızlı ve düşük maliyette gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmamız kapsamında laboratuvarımızda geliştirilen bu yöntem, diğer pek çok hidrofilik, rekombinant protein için de kullanışlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler; Bakteri gösterimi, Lpp-OmpA, streptodornaz

ABSTRACT

NUCLEASE ENZYME PURIFICATION BY BACTERIAL SURFACE DISPLAY TECHNIQUE

**Doğan Y. Aydın Adnan Menderes Aydın Adnan Menderes University Health Sciences
Institute of Molecular Biotechnology (Interdisciplinary), Master's Thesis, Aydın, 2020.**

Recombinant protein technology is constantly being developed to facilitate the production of proteins and their efficiency. Thus, amount of produced protein can be increased by this technique, and as a result, their costs decrease. One of the techniques frequently used to design recombinant protein is display technique. Fusion proteins can be targeted by the display technique and bind to the outer surface proteins of the cell or bacteriophage. The display technique is very useful in designing new proteins.

Targeted protein isolation from any cell is a complex process because cells have many functionally or structurally different proteins. In this study, the display technique is used to purify the target protein which is synthesized by a recombinant *E. coli*. For this purpose, primers have been designed for *lpp*, *ompA* and *spd1* genes. These genes were amplified and combined, then transferred in a plasmid and cloned into *E. coli* as a fusion protein. After that, *E. coli* membrane was isolated and the Spd1 enzyme was cleaved by enterokinase. Then membrane proteins were removed by centrifugation, the purified Spd1 enzyme was visualized on SDS-PAGE gel.

As a result, the purification of the streptodornase enzyme, which is used clinically, with bacterial display technique. By this way, it was produced recombinantly with a very fast way and low cost compared to other classical purification techniques. This method, developed in our laboratory within the scope of our thesis, will be useful for many other hydrophilic, recombinant proteins.

Keyword: Bacterial Display, Lpp-OmpA, streptodornase

1. GİRİŞ

Enzimler ve diğer proteinler endüstri ve sağlık alanında oldukça büyük öneme sahiptir. Önceden ihtiyaç duyulan proteinler, o proteini üretebilen canlılardan izole edilerek sağlanıyordu. Bu durum protein maliyetlerini büyük ölçüde artırmaktaydı. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte ihtiyaç duyulan proteinler rekombinant olarak üreilmeye başlandı. Oldukça hızlı üreyebilen mikroorganizmalar kullanılarak hedef proteinin büyük miktarlarda üretilmesi sağlandı (Cho, 2005). Ayrıca rekombinant proteinler tasarlanabildiği için modifikasyonlarla doğal proteinlere göre daha avantajlı olanların üretilmesi mümkün hale gelmiştir. Rekombinant protein üretmede kullanılan tekniklerden biri de gösterim tekniğidir (Kumar ve ark, 2019).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gösterim Tekniği

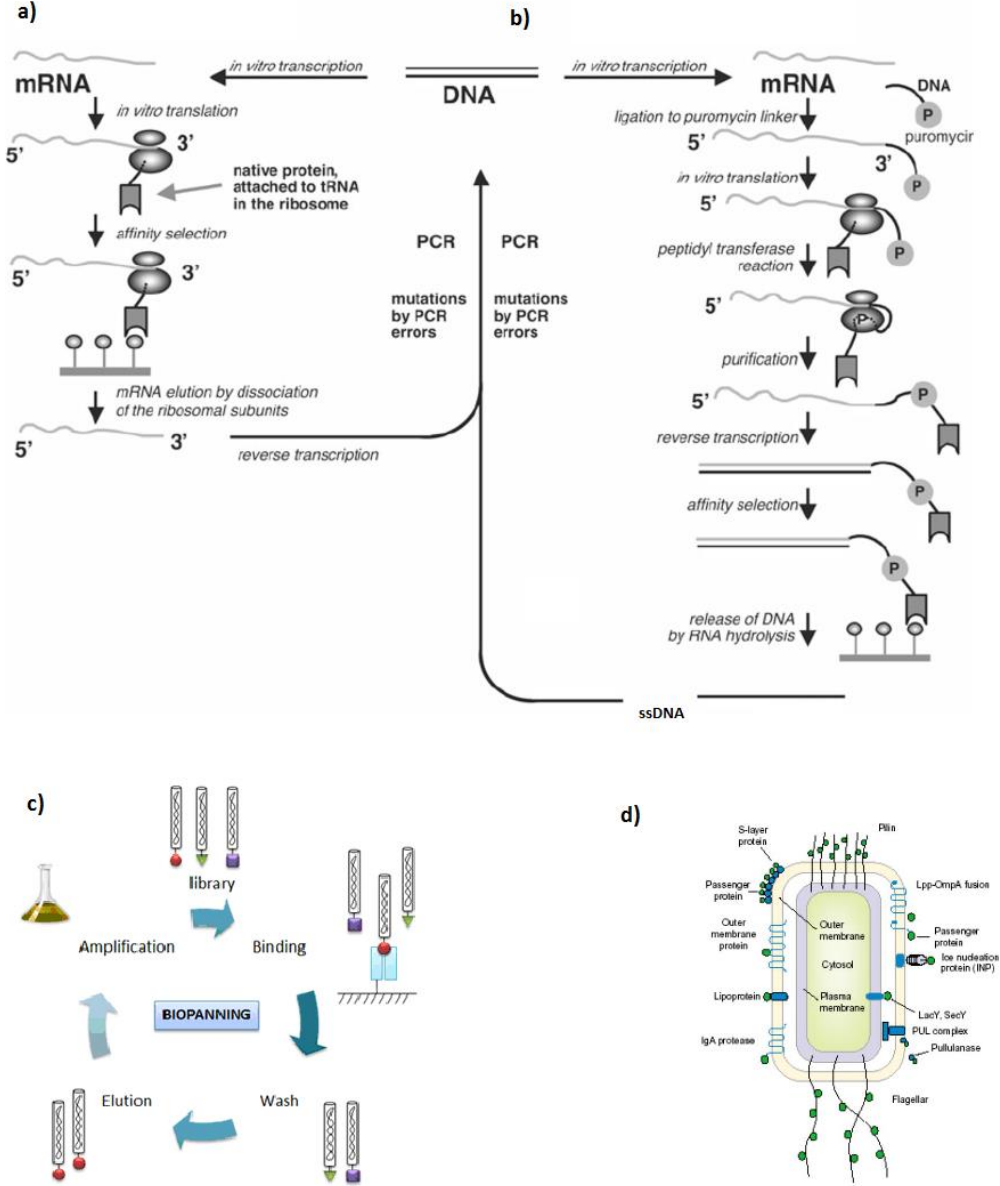
Gösterim tekniği proteinlerin rekombinant üretimi için yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin faydalarından birisi de sentezlenen proteinden, onu kodlayan gen dizisini bulmayı mümkün kılabilmesidir. Bu amaçla hedef proteinin onu kodlayan mRNA'dan veya hücreden ayrılmaması sağlanır. Hedef protein antikor ile yakalandığında onu sentezleyen hücre/mRNA'da yakalanmış olur. Gösterim tekniği dört farklı şekilde uygulanabilir (Nakanishi ve ark., 2008);

a- Ribozom Gösterimi; protein sentezinde, polipeptid sentezi tamamlanınca mRNA, ribozomdan ayrılarak parçalanır. mRNA dizisinin 5' ve 3' uçlarına "steemloop" dizileri eklenerek mRNA'nın parçalanması engellenir (Şekil 1a). Ayrıca protein sentezinin bitiminde mRNA'nın ribozomdan ayrılmasını engellemek için, ilgili gendeki "stop kodonu" diziden çıkarılır. Böylece sentez tamamlandığında mRNA ribozomdan ayrılamaz ve protein-mRNA-ribozom kompleksi oluşur (Plückthun, 2012).

b- mRNA Gösterimi; mRNA dizisinin 3' ucuna puromisin bağlanır. Puromisin, tyrozil-tRNA yerine geçerek sentezlenen peptide bağlanır. Böylece protein-mRNA füzyonu oluşturulmuş olur (Şekil 1b). Antikor kaplı bir yüzey sayesinde protein yakalanır ve mRNA dizisine ulaşılır (Plückthun, 2012).

c- Faj Gösterimi; faj kapsid veya kuyruk proteinlerinin gen dizilerine hedeflenen gen dizisi de eklenir. Böylece faj üretildiğinde dış yüzeyine hedeflenen protein eklenmiş olur (Şekil 1c). Bu proteine uygun antikor sayesinde bu proteini kodlayan faja ve faj nükleik asidine eklenmiş hedef proteini kodlayan gene ulaşılır (Bazan ve ark., 2012).

d- Hücre Yüzey Gösterimi; proteini kodlayan gen biliniyorsa ökaryot veya prokaryot hücrelerin membran proteinlerini kodlayan gen dizilerine sentezlenmek istenen proteinin gen dizisi eklenebilir (Stahl ve Uhlen, 1997; Uchanski ve ark., 2019). Böylece hedef protein, hücre membranının ekstraselüler yüzeyinde membran proteinin uzantısı şeklinde gösterilir. Bu yöntem ile sentezlenen proteinler ortam ile etkileşimde daha başarılıdır. Çünkü etkileşime geçecekleri bileşenleri hücre içine almadan doğrudan etkileşim sağlanır (Şekil 1d).



Şekil 1. Farklı gösterim tekniklerine ait görseller. a) ribozom gösterimi; hedef genden stop kodunu çıkarılarak mRNA'nın ribozomdan ayrılması engellenir. Sentezlenen hedef gen, ribozom ve mRNA bir kompleks oluşturur. Hedef proteine afinite gösteren bir yüzey ile bu kompleks bağlanır ve mRNA dizisi elde edilir (Plückthun, 2012). b) mRNA gösterimi; hedef geni kodlayan mRNA'nın 3' ucuna tirozil tRNA analogu olan puromisin antibiyotiği bağlanır. Protein sentezi sırasında puromisin, tirozilin bağlanacağı yere bağlanarak gen anlatımını durdurur ve mRNA'yı polipeptide bağlar. Ribozomun uzaklaşması ile mRNA-protein kompleksi oluşur. Hedef proteine afinite gösteren yüzey ile mRNA elde edilir (Plückthun, 2012). c) faj gösterimi; hedef protein gen dizisi faj yüzey proteinlerinden biriyle birleştirilir. Faj üretilirken yüzey proteini ile birlikte hedef protein de üretilir. Hedef proteine afinite gösteren yüzey ile fajlar yakalanır ve gen dizisine ulaşılır (Bazan ve ark., 2012). d) hücre yüzey

gösterimi; hücre yüzeyinde bulunan farklı proteinler gösterim için seçilebilir. N terminal, C terminal ya da insersiyon gösterimi için farklı yüzey proteinleri kullanılabilir. Hedef proteine ait gen dizisi yüzey proteinine ait gen dizisi ile birleştirilir ve birlikte anlatım yapmaları sağlanır (Lee ve ark., 2003).

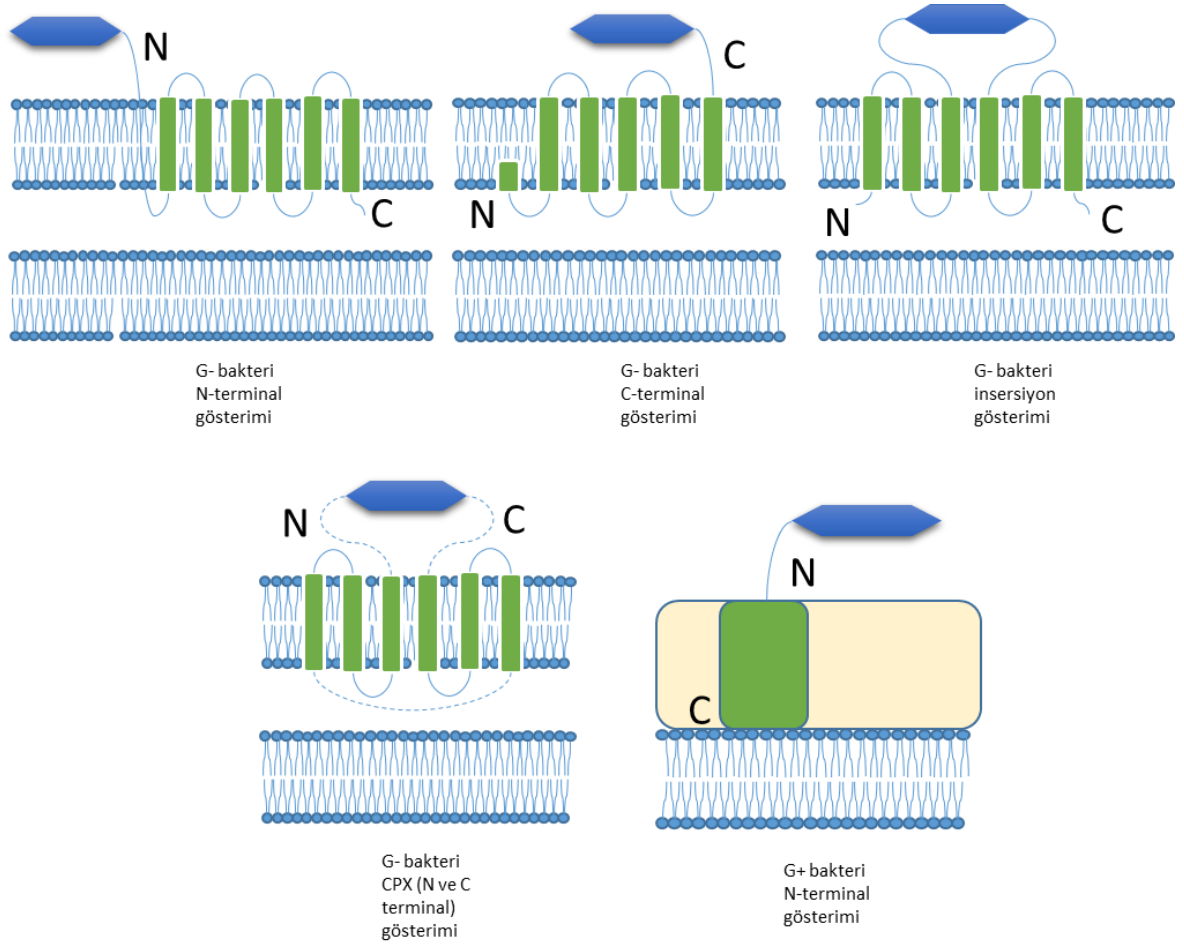
Protein üretiminde yaygın kullanılan iki teknik vardır (Gupta ve ark., 2019). Bunlardan biri sentezlenen proteini hücre dışına salgılatmaktır. Besiyerine salgılanan proteini elde etmek için, besiyerindeki proteinlerin çöktürülmesi gerekmektedir. Bu işlem de maliyeti artırmaktadır. Diğer yöntemde ise sentezlenen protein hücre içine hapsedilir. Fakat hücre içinde sentezlenen protein, hücre için zararlı olabilir. Bu da sentezin belirli düzeyde kalmasına sebep olur. Ayrıca hücre içeriğini açığa çıkarmak, istenmeyen protein etkileşimlerine sebep olabilir. Bu yüzden protein üretmede alternatif olarak gösterim tekniği kullanılabilir.

Gösterim tekniği ile üretilen protein hücre membranında sabitlenir ve basit bir santifrüj işlemi ile membran eldesi sağlanır. Böylece proteinin eldesi daha hızlı ve kolay olarak sağlanır. Hücrelerin membran yüzeylerinde sentezlenen proteinlerin çeşitli fonksiyonları vardır (Koebnik ve ark., 2000). Bu proteinler, diğer hücrelerle etkileşimini sağlama, hücre sinyalizasyonu ve konak hücreyi tanıma gibi fonksiyonları yerine getirir. Örneğin; *E. coli*'de imninin proteini konak hücreye bağlanmayı sağlarken OmpA proteini hücre membranının bütünlüğünü korumada görevlidir. Bu proteinler sentezlendikten sonra hücre sitoplazmasını geçerek hücre membranına ulaşmalı ve ardından membrandan geçerek membranın dış yüzeyine tutunmalıdır. Bu aşamalar Gram negatif bakterilerde dış membran tercih edildiği için Gram pozitif bakterilere göre daha zordur. Sentezlenmek istenen proteinin iki membranı da geçebilmesi gerekir.

Bakteri gösterim tekniğinde fimbri, flagella, OmpX, CPX (Rekombinant OmpX), OmpA ve Lpp-OmpA proteinleri kullanılabilir. Sentezlenmek istenen proteinin boyutuna göre bu proteinlerden uygun olanlar seçilebilir (Daugherty, 2007).

Gösterim tekniği ilk olarak 1985 yılında, faj gösterim tekniği olarak kullanılmıştır. Fakat faj gösteriminde çok büyük proteinlerin gösterilmesi mümkün değildir. Bu eksikliği kapatmak için 1986 yılında bakteri gösterim tekniği ortaya çıkmıştır. Freudl ve ark. OmpA proteinini, Charbit ve ark. ise LamB proteinini gösterim tekniğinde kullanmışlardır. Freudl ve ark. (1986), OmpA proteinine bir bağlayıcı (linker) yardımı ile bir peptid eklemiş ve bu eklenen peptid ile OmpA proteini Proteinaz K ile kesilebilir hale gelmiştir. Bu kesim de OmpA proteininin başka bir peptid ile füzyon edildiğini göstermiştir. Charbit ve ark. (1986), LamB proteininin gösterim tekniğine oldukça uygun olduğunu keşfetti. Bakteri yüzey gösterim tekniğinin bakteriyel aşı geliştirmede kullanılabileceğini gösterdi. Bu çalışma gösterimi yapılan proteinin hücre fonksiyonunu bozmadığına ilk kanıtı.

Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde gösterim için kullanılan yüzey proteinleri Şekil 2’de verilmiştir. Gram negatif bakterilerde gösterimi yapılacak proteinin, hücre yüzey proteinine üç farklı şekilde füzyonu gerçekleştirilebilir. Hücre yüzey proteinin N terminaline, C terminaline ve proteinin ortasında bir yerine gösterimi yapılacak protein eklenebilir. OmpA, OmpX, FhuA, FliTrx, FimH proteinleri “insersiyon” denilen protein dizisinin orta bir kısmına peptid eklenmesi ile gösterim tekniğinde kullanılmaktadır. OmpA için genelde hücre dışı yüzeyindeki 4 dönüştürülen birinde insersiyon yapılır. Fakat boyut olarak çok büyük proteinlerin gösterimine uygun değildir. OmpX proteininin N ve C terminalleri periplazmaya bakmaktadır. Fakat protein sentezinin başlangıç ve bitiş noktalarının yeri değiştirilerek OmpX’in N ve C terminal gösterimi için uygun hale getirilmiş bir versiyonu geliştirilmiş ve CPX olarak adlandırılmıştır. CPX’in N ve C terminalleri hücre dışı yüzeyine baktığı için N ve C terminal gösterimine uygundur. Bu özelliği daha büyük proteinlerin gösterimini mümkün kılmıştır. N terminal gösterimi için EstA, AIDA-I ve IgA protease gibi yüzey proteinleri de uygundur. C terminal gösteriminde ise invasin proteini ve Lpp-OmpA füzyon proteini kullanılmaktadır. OmpA proteininin C ve N terminalleri periplazmaya baktığı için terminal gösterimine uygun değildir. Fakat OmpA’nın bir bölümü yeniden sentezlenerek C terminalin hücre dışı yüzeye bakması sağlanmıştır. Gram pozitif bakterilerde ise gösterimi yapılacak proteinin peptidoglikana kovalent olarak bağlanabilen bir proteinle füzyonu yapılır. Böylece hedef protein hücre peptidoglikanına tutunmuş olur (Daugherty, 2007).



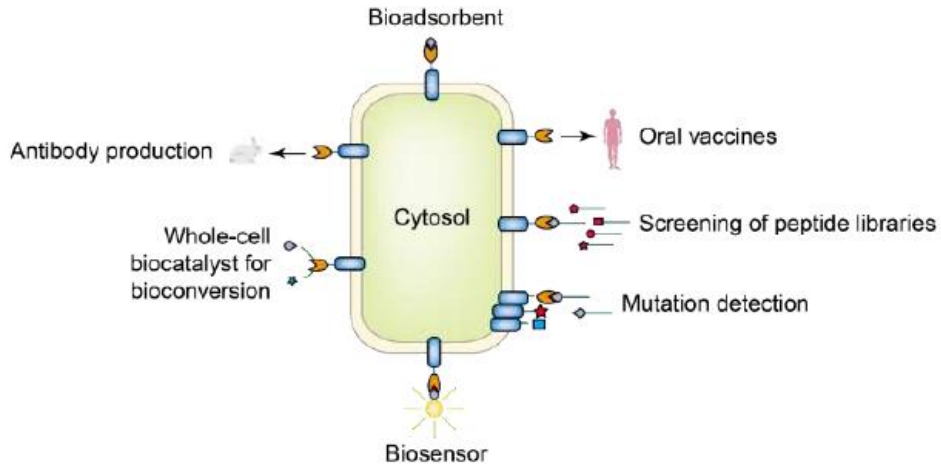
Şekil 2. Bakteriyel gösterim teknikleri; insersiyon, C terminal ve N terminal gösterimlerinde kullanılabilecek membran proteinleri. Yeşil renkli kısımlar gösterim vektörü proteinini, mavi renkli kısımlar gösterimi yapılan proteini temsil etmektedir. Sarı renkli kısım peptidoglikanı temsil etmektedir.

2.2. Bakteriyel Gösterimin Kullanım Alanları

Bakteriyel gösterim birçok alanda kullanılabilir (Lee ve ark., 2003). Bunlar (Şekil 3);

- Afinite temelli görüntüleme; gösterimi yapılan proteine bağlanma yeteneği olan işaretli moleküller kullanılır.
- Antikor epitop haritalaması; antikor spesifikliğini tespit etmede kullanılan bir yöntemdir. Hücre yüzeyinde gösterimi yapılan epitoplara, işaretlenmiş antikorların bağlanma miktarları ölçülür.

- c. Enzim substratının tanımlanması; enzimler için en iyi substratın belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Birim zamanda tüketilen substrat miktarı ölçülerek en verimli substrat belirlenir.
- d. Aşılama; bakteri yüzeyinde hedef antijen gösterilir. Tek tip ya da birden fazla antijen aynı bakteride gösterilebilir. Antijen membran yüzeyinde olduğu için immün cevap daha hızlı oluşturulur. Aynı zamanda bakteri hücresi kendisi bir uyarıcı olduğu için ilave adjuvan verilmesine gerek kalmaz.



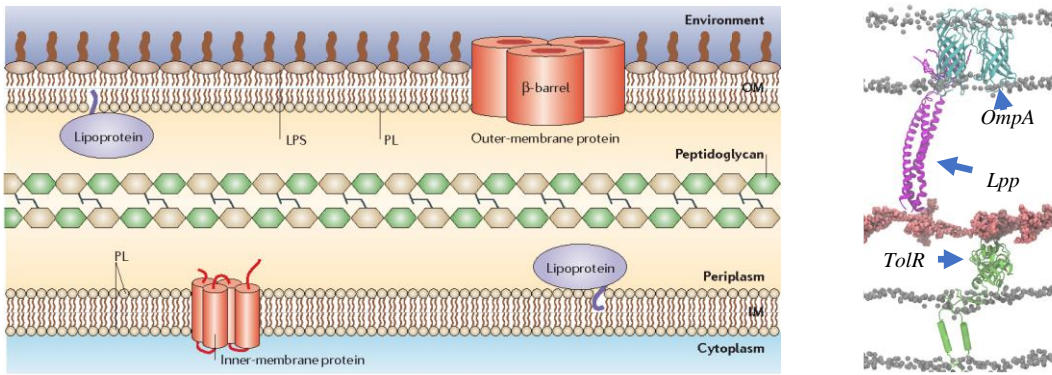
Şekil 3. Bakteri hücre yüzey gösterim tekniğinin kullanım alanları (Lee ve ark., 2003). Bakteriyel gösterimin oldukça geniş kullanım alanları vardır. Bu esnekliği gösterim tekniğini oldukça kullanışlı kılmıştır.

Tez çalışmamızda bakteri yüzey gösterim tekniği yukarıda bahsedilen kullanım alanlarının dışında rekombinant enzim saflaştırılması için denenmiştir. Bu amaçla Lpp-OmpA füzyon proteini ile oluşturulacak gösterim vektörü kullanılmıştır. *E. coli* membran proteinleri olan lipoprotein ve dış membran proteini A (OmpA) ile oluşturulan füzyon protein, gösterimi yapılmak istenen proteini hücre dış membranında sabitlemek için kullanılmıştır.

2.3. Gösterim Vektöründe Kullanılacak Proteinler

2.3.1. Lipoprotein

Lipoprotein (Lpp), *E. coli* dış membranında bulunan, peptidoglikana bağlı ya da serbest şekilde bulunan bir proteindir. Protein N terminali ile dış membrana tutunurken C terminali ile peptidoglikana tutunur (Hantke ve Braun, 1973). N terminalinde 20 aminoasitlik sinyal peptidi içeren 78 amino asitten oluşur. 7,2 kDa boyutunda olan bu protein hücre membranı boyunca üçlü gruplar halinde bulunmaktadır (Şekil 4). Membranda yaklaşık 250 000 kopyası bulunmaktadır (Babu ve ark., 2006). Dış membranın peptidoglikana tutunmasını sağlar. Böylece dış membran hücreden ayrılmaz ve hücre stabilitesini artırmış olur. Ayrıca hücre bölünmesi ve büyümesinde yaşamsal rolleri vardır (Nakayama, 2012).

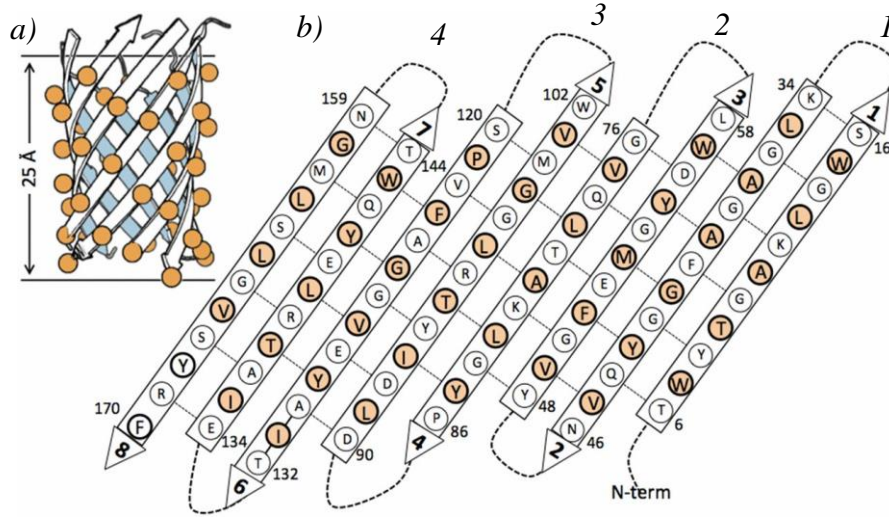


Şekil 4. *E. coli* dış membran yapısı. Lipoprotein, dış membranın periplazmaya bakan yüzeyinde çapalanmış şekilde duran bir proteindir (Solda). Üç lipoprotein biraraya gelerek dış membranı peptidoglikana bağlar (Sağda, Boags ve ark., 2019).

2.3.2. Dış Membran Proteinini A (OmpA)

Dış membran proteinleri (Omp'ler) bakteriyel gösterim tekniğinde sıkça kullanılan membran proteinleridir. Bu proteinlerden biri de OmpA proteindir. OmpA için kodlanan gen (*tolG*) *E. coli*'de 1974 yılında tanımlanmış ve ilgili proteinin 1977 yılında dış membranın ana bileşenlerinden olduğu anlaşılmıştır (Chai ve Foulds, 1977). β -Barrel yapıda bulunan OmpA iyon taşımada görevlidir. Yaklaşık 35 kDa boyutundadır. N terminalinde bulunan 171 aminoasit transmembran görevi görür ve membranı 8 defa geçer (Gophna ve ark., 2004). C terminalindeki 155 aminoasit ise periplazmik boşluğa bakacak şekilde birikmiştir. Böylece hem C terminal

hem N terminal periplazmaya bakmaktadır. Bu yapının oluşması için protein, membranın periplazma kısmında 3 dönüş yaparken membranın hücre dışı kısmında 4 dönüş yapmıştır (Şekil 5). Dış yüzeyde bulunan 1. ve 2. dönüşler endotel hücrelerine bağlanmada etkilidir.



Şekil 5. OmpA proteininin üç boyutlu yapısı (a) ve şematik gösterimi (b). OmpA proteini N terminal ve C terminali periplazmaya bakacak şekilde yerleşmiştir. Ekstraselüler yüzeyde 4 dönüş yaparak dış membranı 8 defa geçer. Ekstraselüler dönüşler numaralandırılmıştır. 1. ve 2. dönüşler endotel hücrelerine bağlanmada önemlidir. Sarı ile işaretlenmiş küreler lipidleri, şematik gösterimdeki sarı renkle boyanmış aminoasitler ise lipidlerle etkileşime geçen aminoasitleri temsil etmektedir. (Stapleton ve ark., 2015)

OmpA'nın hücrede bulunduğu yer düşünüldüğünde birçok fonksiyona sahip olması beklenir. Ancak bu fonksiyonlar her zaman bakteriye avantaj sağlamaz. Bu dezavantajlardan biri de fajların bu proteini tanıyarak bakteriyi enfekte etmesidir. Bu enfeksiyona karşı bir direnç mekanizması olarak bakteriler *OmpA* geninin iki allelini oluşturmuştur; *OmpA1* ve *OmpA2*. Bu alleldeki baz dizisi farklılıkları 2. ve 3. dönüşlerde aminoasit dizisi farklılıklarına sebep olur. *OmpA2* proteinine sahip bakterilerin 24 farklı bakteriofaja karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (Power ve ark., 2006). Ayrıca, F plazmidinin sentezlediği dış membran proteini TraN, OmpA ile etkileşime girer. 4. dönüşteki bir aminoasitin değişmesi (G154D) bakterinin konjugasyon yeteneğinin düşmesine sebep olur (Klimke ve ark., 2005).

E. coli K1 suşunun, yenidoğanlarda sepsis ve menenjitte sebep olduğu bulunmuştur. Menenjitin oluşması için bakterinin kan beyin bariyerini geçmesi gerekmektedir. OmpA mutan suşlar bu bariyeri geçmede yabani tip bakterilere göre 50-60 kat daha başarısız

olmuştur. Ayrıca OmpA'nın 1. ve 2. dönüşlerindeki peptidler yenidoğana verilince bu bakterilerin kan beyin bariyerini aşması engellenmiştir (Kim, 2000; Kim 2002).

2.3.3. Streptodornaz

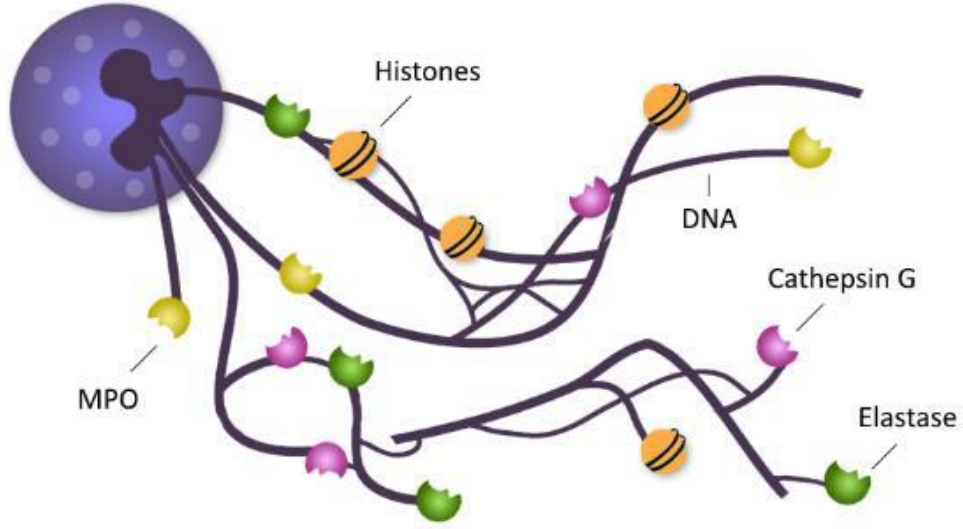
Nükleazlar, nükleik asitleri daha küçük parçalara veya monomerlerine ayırmada kullanılan enzimlerdir. İki tipi vardır; ekzonükleazlar ve endonükleazlar. Ekzonükleazlar halkasal olmayan nükleik asitlerin uçlarından nükleotidleri teker teker ayırarak nükleik asidi monomerlerine ayırır. Endonükleazlar ise; uzun nükleik asitleri ortaldan keserek daha küçük nükleik asit dizileri oluşturur. İki tipi vardır; spesifik nükleazlar ve spesifik olmayan nükleazlar. Spesifik endonükleazlar nükleik asit dizilerini belirli nükleotid dizilerinden tanırlar ve keserler. Gen mühendisliğinde sıklıkla kullanılırlar (Nishino ve Morikawa, 2002). Spesifik olmayan endonükleazlar ise 2-6 nükleotid aralıklarla nükleik asidi rastgele keserler. Streptodornaz da spesifik olmayan bir endonükleazdır.

Streptodornaz (eskiden mitojenik faktör 2, MF2, olarak bilinirdi, Spd1); *Streptococcus pyogenes* 'te bulunan DNA ve RNA parçalayabilen bir endonükleazdır. *S. pyogenes* bu nükleazı hücre dışına salgılayabilir. Sf230.1 profajının indüklenmesi ile sentezi gerçekleşir. 28 kDa büyüklüğündedir ve N terminalinde 29 aminoasitlik bir sinyal peptidi bulundurur (Canchaya ve ark., 2002). His121, Glu164 ve Asn145 numaralı aminoasitler nükleaz aktivitesini gösterebilmesi için önemlidir (Justyna ve ark., 2012).

Rastgele kesen nükleazlar geniş biyolojik rollere sahiptir. Bu rollere; hücre bölünmesi için gerekli olan nükleotidleri elde etmek, DNA onarımı ve rekombinasyon, apoptozda DNA'yı parçalama, enfeksiyona sebep olma ve enfeksiyona karşı savunma örnek olarak verilebilir (Miyata ve Fan, 2012).

Nötrofiller insanlarda bulunan immun sistemin elemanlarından biridir ve enfeksiyon anında patojenlere ilk saldıranlardandır. Nötrofillerin üç fonksiyonu vardır. Bunlar; patojeni fagosite etme, antimikrobiyal bileşikler sentezleme ve patojenleri yakalamak için DNA'larını patojenlere doğru yaymasıdır. Nötrofillerin kendilerini patlatarak DNA'larını yaymasıyla oluşan yapıya nötrofil ekstraselüler tuzaklar (NETs) denir (Şekil 6). NETs'ler DNA'ya bağlanmış antimikrobiyal peptidler ve proteazlardan oluşur. Patojenler DNA ile yakalanır ve DNA'ya tutunan bu proteinler yardımıyla etkisiz hale getirilirler (Storisteanu ve ark., 2017).

S. pyogenes ekstraselüler endonükleazları yardımı ile bu NETs'lerdeki DNA'ları parçalar ve etkisiz hale getirilmeleri zorlaştırır.



Şekil 6. NETs yapısı. Nötrofiller patojenleri yakalamak için kendilerini patlatarak DNA'larını ağ gibi kullanırlar. Bu DNA enfeksiyon ajanlarının ilerlemesini durdurur ve üzerinde taşıdığı antimikrobiyal peptidler ve proteazlar enfeksiyon ajanını ortadan kaldırır. (Pieterse, 2017).

Spd1 enzimi potansiyel olarak yabancı nükleik asitleri uzaklaştırmak için araştırma amaçlı olarak veya tedavi amaçlı Dornaz alfa'ya alternatif olarak da klinikte kullanılabilir. Dornaz alfa kistik fibrosizde mukus viskozitesini düşürmek için kullanılmaktadır (Wagener ve Kupfer, 2012). Ayrıca son günlerde ortaya çıkan Covid-19 pandemisinde de dornaz alfa ilacı gündeme gelmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Bakteri Suşları

3.1.1.1. *Streptococcus pyogenes* GK9 suşu

REDPROM laboratuvarımızın stoklarında bulunan *S. pyogenes* suşudur. -20 °C de %10'luk skim milkde saklanan kültür kullanılacağı zaman 37 °C de kanlı agarda ve mikroaerofilik koşullarda inkübe edilmiştir Bu suş streptodornaz genini çoğaltmak için kullanılmıştır.

3.1.1.2. *Escherichia coli* DH10B suşu

-20 °C de saklanan stok kültürden 37 °C de TSA (Merck, Almanya) ortamında gecelik inkübasyonla aktiveleştirilmiştir. Gösterim vektöründe kullanılacak Lpp ve OmpA proteinlerine ait gen bölgelerinin çoğaltılması için ihtiyaç duyulmuştur.

3.1.1.3. *Escherichia coli* BL21 suşu

Klonlama denemelerinde kullanılmıştır. *E. coli* BL21(DE3) suşu T7 RNA polimeraz geni içeren bir suştur. Aynı zamanda proteaz negatif bir suştur. Ürün eldesinde konak olarak seçilme sebebi proteaz negatif bir suş olması ve bu sayede sentezlenen proteinlerin parçalanmasını engellemek içindir.

3.1.2. Kullanılan Plazmidler

3.1.2.1. pUC19 plazmidi

pUC19 (<https://www.addgene.org/50005/>) bir klonlama vektörüdür. Hücre içi kopya sayıları yaklaşık 500-700'dür. Çoklu klonlama bölgesi (MCS)'nin akışyukarısında *lac* promoteri bulunur. Bu çalışmada gösterim vektörünün hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2. pBlueScript SK plazmidi

Çalışmada pBlueScript SK (+) plazmidi de kullanılmıştır (<https://www.addgene.org/vector-database/1951/>). Bir klonlama vektörü olmasına karşın pUC19'dan farklı olarak çoklu klonlama bölgesi (MCS)'nin hem akışyukarısında hem akışaşağısında promoter bulundurulur. Akışyukarısında *lac* ve *T3* promoteri, akışaşağısında *T7* promoteri bulunur.

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri Ve Çözeltiler

3.1.3.1. Tryptic soy agar (TSA)

11,1 g hazır besiyeri 300 ml distile suda çözülmüştür. Otoklavda (Hirayama HV-50L, Japonya) 121 °C'de 15 dakika steril edilen besiyeri steril petrilere dökülür. Bakterilerin aktifleştirilmesinde ve klonlama çalışmalarında kullanılmıştır.

3.1.3.2. AXI besiyeri

Önceden hazırlanmış TSA (Merck, Almanya) besiyeri 50 °C'ye kadar soğutulur. İçerisine, ampisilin (0,1 mM), IPTG (Thermo Scientific, ABD, 1 mM), X-Gal (Thermo Scientific, ABD, 50 µg/ml) eklenir. İyiçe karıştırılarak steril petrilere dökülür. Mavi-beyaz koloniler için seçici besiyeri olarak kullanılmıştır.

3.1.3.3. Tryptic soy broth (TSB)

7,2 g TSB (Merck, Almanya) besiyeri 300 ml distile suda çözülmüştür. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilen besiyeri steril tüplere dökülür. Çalışmada kompetan hücreleri hazırlamada kullanılmıştır.

3.1.3.4. Kanlı agar

11,1 g TSA besiyeri 300 ml distile suda çözülmüştür. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilen besiyeri yaklaşık 50 °C’ye soğutulmuştur. İçine %5 insan kanı eklenerek steril petrilere dökülmüştür. Çalışmada *S. pyogenes*’in üretilmesinde kullanılmıştır.

3.1.3.5. DNaz agar

Ticari olarak alınan DNaz agardan (Merck, Almanya) 4,2 g tartılarak üzerine 100 ml distile su eklenir. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilerek yaklaşık 50 °C’ye soğutulur. DNaz aktivitesini göstermede kullanılmıştır.

3.1.3.6. Phosphate buffered saline (PBS)

1 tablet PBS (BioShop, Kanada) 100 ml suyla karıştırılır. Otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilir. 0,01 M PBS çözeltisine karşılık gelmektedir. Çalışmada hücreleri yıkamak için ve lizat çıkarma aşamalarında kullanılmıştır.

3.1.3.7. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jeli hazırlamak için; Tris (BioShop, Kanada, 45 mM), Borik asit(BioShop, Kanada, 45 mM), EDTA (Merck, Almanya, 1 mM) solüsyonu (0,5x TBE) içine %2 agaroz (GeneDirex, ABD) eklenip mikrodalgada (Beko, Türkiye) ısıtılmıştır. Yaklaşık 50 °C’ye soğutulularak içine “SafeView” (ABM, ABD) eklenip jel kasetine dökülür. Katılaştıran jel içinde

0,5x TBE olan elektroforez tankına (Thermo Scientific EC300XL, ABD) yerleştirilir. Amplikonlar 100 Volt, 100 mA akımda 30 dakika yürütülmüştür.

3.1.3.8. SDS-PAGE jel içerikleri

SDS-PAGE, reaksiyon bileşenleri tablo 1’de verildiği şekilde karıştırılmış ve jel kasetine önce “ayırma jeli” dökülüp üstü %96’lık etanol ile kaplanmıştır. Jel donduktan sonra etanol uzaklaştırılmış ve “yoğunlaştırma jeli” dökülmüş ve yükleme kuyuları oluşması için tarak takılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. SDS-PAGE reaksiyon bileşenleri

Kimyasallar	Ayrırma jeli	Yoğunlaştırma jeli
	10 ml	4 ml
%30 Bis-Akrilamid (ml)	4	0,5
Reaksiyon tamponları (ml)	1.25	1
%10 SDS (ml)	0,1	0,4
%1,5 Amonyum Persülfat (ml)	0,5	0,2
ddH ₂ O (ml)	4	2,25
TEMED (µl)	5	3

3.2. Yöntem

3.2.1. Primer Tasarımı

Rekombinant olarak sentezlenmesini istediğimiz protein bir füzyon proteindir ve Lpp, OmpA ve Spd1 proteinlerinden oluşturulmuştur. Bu üç farklı protein, ilk basamak olarak PCR da ayrı ayrı çoğaltılmıştır. Amplifikasyonda kullanılan primerlerin dizaynları ve dizileri aşağıda verilmiştir.

3.2.1.1. *E. coli* Lipoprotein geni için primer dizaynı

Lipoprotein geni için GenBank'tan X68953.1 numaralı *E. coli* lipoprotein gen dizisi alınmıştır. Primerler, aşağıdaki dizide altı çizili olan ve lipoprotein ilk 27 aminoasidine karşılık gelen 87 bazlık gen dizisini çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır.

```
ATGAAAGCTACTAAACTGGTACTGGGCGCGGTAATCCTGGGTTCTACTCTGCTGGCAGGTTG  
CTCCAGCAACGCTAAAATCGATCAGCTGTCTTCTGACGTTTCAGACTCTGAACGCTAAAGTTG  
ACCAGCTGAGCAACGACGTGAACGCAATGCGTTCCGACGTTTCAGGCTGCTAAAGATGACGCA  
GCTCGTGCTAACCAGCGTCTGGACAACATGGCTACTAAATACCGCAAGTAA
```

Şekil 7. Lipoprotein gen dizisi. GenBank X68953.1 kodlu *E. coli* lipoprotein gen dizisidir. Altı çizili kısım tasarlanan primerler ile çoğaltılacak kısmı belirtmektedir.

Ayrıca Lpp'nin forward primerinin (FLpp-HindIII) 5' ucuna 10 bazlık RBS (altı çizili kısım) dizisi ve klonlamada kullanılmak üzere HindIII (kalın yazılı kısım) restriksiyon enzimi tanıma bölgesi eklenmiştir (Tablo 2). Eklenen 10 bazlık RBS bölgesi aynı zamanda çerçeve kaymasının önüne geçmiştir.

Reverse primerine (RLpp) ise; OE-PCR'da eşleşmesi için bu çalışmada kullanılacak olan *OmpA* gen dizisinin ilk 15 baz dizisi (altı çizili kısım) reverse komplement olacak şekilde primerin 5' ucuna eklenmiştir (Tablo 2).

3.2.1.2. *E. coli* OmpA (Outer Membrane Protein A) primer dizaynı

OmpA geni için GenBank'tan AF234269 numaralı *E. coli* dış membran proteini A'nın gen dizisi alınmıştır. Altı çizili kısmı PCR ile çoğaltmak için OmpA'nın 46-159. aminoasitlerine karşılık gelen 136-480. bazları arasını sentezleyecek şekilde primerler dizayn edilmiştir. Forward primerine (FOmpA) herhangi bir kuyruk eklenmemiştir. 2 adet reverse primeri (ROmpA-EK ve ROmpA-KpnI) tasarlanmıştır (Tablo 2). OmpA sentezi için kullanılacak olan ROmpA-EK primeri kuyruk olarak 5' ucuna 15 bazlık enterokinaz enzimi tanıma bölgesini (altı çizili olarak gösterilmiştir) içermektedir. Klonlamada kullanılacak olan ROmpA-KpnI primerinde ise enterokinaz tanıma bölgesi dizisinin 5' ucuna KpnI (kalın yazılı kısım) restriksiyon enzimi tanıma bölgesi eklenmiştir (Tablo 2).

ATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTTCGCTACCGTAGCGCAGGC
CGCTCCGAAAGATAACACCTGGTACACTGGTGCTAAACTGGGCTGGTCCCAGTACCATGACA
CTGGTTTTCATCAACAACAATGGTCCGACCCATGAAAACCAACTGGGCGCTGGTGCTTTTTGGT
GGTTACCAGGTTAACCCGTATGTTGGCTTTGAAATGGGTTATGACTGGTTAGGTCGTATGCC
ATACAAAGGCAGCGTTGAAAACGGTGCATATAAAGCTCAGGGCGTTCAGCTGACCGCTAAAC
TGGGTTACCCAATCACTGACGATCTGGACGTATACTCGTCTGGGTGGTATGGTATGGCGT
GCAGACACTAAATCCAACGTTTATGGTAAAAACCACGACACCGGCGTTTTCTCCGGTCTTCGC
TGGCGGTGTTGAGTATGCGATCACTCCTGAAATCGCTACCCGTCTGGAATACCAGTGGACCA
ACAACATCGGTGACGCACACACCATCGGCACTCGTCCGGACAACGGCATGCTGAGCCTGGGT
GTTTCTACCGTTTCGGTCAGGGCGAAGCAGCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGCTCCGGC
ACCGGAAGTACAGACCAAGCACTTCACTCTGAAGTCTGACGTTCTGTTACCTTCAACAAAG
CAACCCTGAAACCGGAAGGTCAGGCTGCTCTGGATCAGCTGTACAGCCAGCTGAGCAACCTG
GATCCGAAAGACGGTTCGGTAGTTGTTCTGGGTACACTGACCGCATCGGTTCTGACGCTTA
TAACCAGGCTCTGTCCGAGCGTCGTGCTCAGTCCGTTGTTGATTACCTGATCTCTAAAGGTA
TCCCGGCAGACAAAATCTCCGCACGTGGTATGGGCGAATCCAACCCGGTTACTGGCAACACC
TGTGACAACGTGAAACAGCGTGCTGCACTGATCGATTGCCTGGCTCCGGATCGTCGCGTAGA
GATCGAAGTTAAAGGCATCAAAGACGTTGTAACCTCAGCCGCAGGCTTAA

Şekil 8. Dış membran proteini A (OmpA) gen dizisi. GenBank AF234269 kodlu *E. coli* OmpA gen dizisi. Altı çizili kısım tasarlanan primerler ile çoğaltılacak kısmı belirtmektedir.

3.2.1.3. *S. pyogenes* streptodornaz (*Spd1*) primer dizaynı

Streptodornaz 1 geni için GenBank'tan CP000056.2 numaralı streptodornaz 1 proteini gen dizisi alınmıştır. Spd1 proteininde daha sonradan kesilen sinyal peptidi olduğu için, sinyal peptidini içermeyecek şekilde primer tasarımı yapılmıştır. Bunun için ilk 29 aminoaside karşılık gelen 87 bazlık bölge dışarıda bırakılarak primerler tasarlanmıştır. Forward primerinin (FSpd1-KpnI) 5' ucuna KpnI (kalın yazılı kısım) restriksiyon tanıma bölgesi eklenmiştir. Reverse primerine (RSpd1-EcoRI) ise 5' ucuna EcoRI (kalın yazılı kısım) restriksiyon enzimi kesim bölgesi eklenmiştir (Tablo 2).

ATGAAATTATCTAAACAAAAGGCAAGTTTGCTTACCGCTGTTTTACTGTTACTTTCTCTTTC
 TATAACGACAATAACTGTTGACGCAGCTAAGGTACGAACTTATCCGAATGTATCCCATGCAA
 ACACACATTATAAAAATACTGCTTCTAGTAAGCTCTTACCTTTTACTGCTAATTATCAGTTA
 CAACTTGGTGAGTTGGATAACCTTAACCGCGCTACCTTTTACATATCCAAGTATGCAAGATAG
 ACACGAACTAAAGATGTACGCCTAAAATAAATTATGACCCTGTGGGATGGCATAACTATC
 AATTTCCATACGGAGATGGCTCAAATCTTCATGGGTAATGAATCGTGGGCATCTAGTCGGA
 TATCAATTTTGTGGATTAAACGATGAACCAAGAAATTTAGTGACAATGACAGCCTGGCTAAA
 CACAGGTGCTTATTCAGGAGCAAATGACAGCAATCCTGAAGGGATGTTATACTATGAAAACC
 GTTTAGATTCTTGGCTTGCACCTCACCTGACTTTTGGCTAGATTATAAAGTCACTCCTATA
 TATAGTGGCAATGAAGTAGTGCCTCGACAAATTGAATTACAGTATGTTGGAATTGATTCATC
 TGGTGAGTTGCTTACTATAAGGCTAAATAGTAATAAAGAAAGTATTGATGAAAATGGTGTTA
 CTACAGTAATCTTAGAAAACCTCTGCTCCAAATATCAACCTTGACTATTTAAATGGAACCTGCC
 ACTCCTAAAACTAA

Şekil 9. Streptodornaz gen dizisi. GenBank CP000056.2 kodlu *S. pyogenes* Spd1 gen dizisi. Altı çizili kısım tasarlanan primerler ile çoğaltılacak kısmı belirtmektedir.

Tablo 2. PCR’da kullanılacak primerler (Altı çizili kısımlar overlap bölgeleri; koyu renkli kısımlar restriksiyon enzimi bölgeleri; italik kısım ribozom bağlanma bölgesi)

Primer İsimleri	Primer Dizileri
FLpp-HindIII	GACT AAGCTT <i>GGAGGTCATTATGAAAGCTACTAAACTGGTA</i>
RLpp	<i>CGGACCATTGTTGTTCTGATCGATTTTAGCG</i>
FOmpA	AACAACAATGGTCCGAC
ROmpA-EK	<i>CTTGTCGTCGTCGTCACGGGTAGCGATTTTC</i>
ROmpA-KpnI	ACT GGTACC CTTGTCGTCGTCGTCACGGGTA
FSpd1-KpnI	GCAG GGTACC GCTAAGGTACGAACTTATC
RSpd1-EcoRI	CAGT GAATTC TTAGTTTTTAGGAGTGGCAGT

3.2.2. *Lpp*, *OmpA* ve *Spd1* Gen Dizilerinin PCR ile Çoğaltılması

Füzyon proteinin oluşması için gerekli olan gen dizileri PCR ile çoğaltılmıştır. *Lpp* ve *OmpA* gen dizileri için *E. coli* DH10B suşu DNA’sı; Spd1 gen dizisi için klinik *S. pyogenes* GK9 suşu DNA’sı kullanılmıştır. Genomik DNA’lar kit (GeneMark Total DNA Isolation Kit,

ABD) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda izole edilmiştir. PCR’da Lpp için FLpp-HindIII ve RLpp primerleri; OmpA için FOmpA ve ROmpA-EK primerleri; Spd1 için ise FSpd1-KpnI ve RSpd1-EcoRI primerleri kullanılmıştır (Tablo 3). PCR sonucu oluşan ampliconlar kit (Geneaid PCR Clean-up Kit, Tayvan) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda temizlenerek füzyon proteini oluşturmada kullanılmıştır.

Tablo 3. PCR karışımındaki reaktifler ve PCR şartları

PCR Karışım İçeriği (Son konsantrasyon)		PCR Şartları	
Primer1	25 µM	95°C – 2 dakika	1x
Primer2	25 µM	95°C – 20 saniye	
10x buffer	1x	48°C – 15 saniye	35x
dNTP	0,2 mM	72°C – 30 saniye	
Taq Polimeraz	5U	72°C – 2 dakika	1x
Su	50 µl’ye kadar		

3.2.3. *Lpp-OmpA* Gen Dizilerinin Füzyonu ve Gösterim Vektörünün Oluşturulması

Lpp ve OmpA ampliconları ile OE-PCR kurulmuştur (Higuchi, 1988; Tablo 4 ve Tablo 5). RLpp primerinde bulunan ortak dizi iki ampliconun birleşmesini ve buradan sentezin gerçekleşmesini sağlayacaktır. OE-PCR kurulurken ilk 15 döngüde PCR miksinde (Thermo Scientific, ABD) herhangi bir primer eklenmemiş ve sentezin eşleşen bölgeden olması sağlanmıştır (Tablo 4). 15. döngü sonunda PCR miksinde FLpp ve ROmpA-EK primerleri eklenmiş ve PCR 15 döngü daha devam ettirilmiştir (Tablo 4). OE-PCR sonunda oluşan ampliconlar agaroz jelde yürütülmüştür. İstenen boyuttaki bant agaroz jelden kesilerek kit (Geneaid Gel Extraction Kit, Tayvan) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda elde edilmiştir. Plazmide yerleştirmede kolaylık olması ve oluşturulacak olan vektörde çerçeve kaymasının önüne geçmek için FLpp ve ROmpA-KpnI primerleri ile tekrar aynı koşullarda PCR kurulmuştur.

Tablo 4. OE-PCR karışımındaki reaktifler ve PCR Şartları.

1. Aşama		2. Aşama	
Lpp Amplikonu	1 µl	1.aşama ürünü	49 µl
OmpA Amplikonu	1 µl		
10x Buffer	1x	FLpp-HindIII primeri	25 µM
dNTP	0,2 mM		
Taq Polimeraz	5U	ROmpA-EK primeri	25 µM
Su	49 µl'ye kadar		

Tablo 5. OE-PCR reaksiyon şartları

1. Aşama		2. Aşama	
95 °C – 2 dakika	1x	95 °C – 2 dakika	1x
95 °C – 20 saniye		95 °C – 20 saniye	
48 °C – 15 saniye	15x	60 °C – 15 saniye	15x
72 °C – 30 saniye		72 °C – 30 saniye	
72 °C – 2 dakika	1x	72 °C – 2 dakika	1x

Elde edilen Lpp-OmpA amplikonu ve pUC19 plazmidi; KpnI ve HindIII (Thermo Scientific, ABD) restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Bunun için iki ayrı tüpe amplikon ve plazmidten 16 µl alınmış, içlerine 2'şer µl 10x FD Buffer ve 1'er µl KpnI ve HindIII enzimlerinden koyularak 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Kit (Geneaid PCR Clean-up Kit, Tayvan) ile temizlenen DNA'lar ligasyonda kullanılmıştır. Ligasyon işlemi için; kesilmiş amplikon ve pUC19 3:1 (v/v) oranında alınarak tek tüpte birleştirilmiştir. İçlerine 1 µl T4 DNA Ligase enzimi, 2 µl 10x reaksiyon tamponu eklenmiş ve saf H₂O ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. 22 °C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sonucu oluşturulan plazmid "gösterim vektörü" olarak adlandırılacaktır.

3.2.4. Gösterim Vektörünün Transformasyonu

Gösterim vektörü *E. coli* DH10B kompetan suşuna kimyasal transformasyon yöntemi ile transforme edilmiştir (Sambrook ve ark., 1989). Bunun için DH10B kompetanı TSA besiyerine ekilmiş ve gecelik 37°C'de inkübe edilmiştir. Büyüyen kolonilerden bir tanesi TSB besiyerine alınarak 600 nm'de 1,0 OD olana kadar 37 °C'de inkübe edilmiştir. Yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerden 1 ml alınarak 50 ml TSB içeren falkon tüpüne aktarılmış ve log fazına (600 nm'de 0,5 OD) gelesiyeye kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra falkon tüpü soğutulmuş ve 4°C'de 10 dakika 5000 rpm'de santifrj yapılarak hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Besiyeri uzaklaştırılmış ve pellet 2 defa su ile yıkanmış ardından % 10 gliserollü suyla çözülerek 4°C'de 10 dakika 5000 rpm'de çöktürülmüştür. Bu işlemi takiben pellet 20 mM CaCl₂ 80 mM MgCl₂ çözeltisi ile çözülüp 4°C'de 10 dakika 5000 rpm'de çöktürülmüştür. Elde edilen pellete 0,1 g/ml olacak şekilde 100 mM CaCl₂ çözeltisi eklenmiştir. 100 µl kompetan hücre çözeltisi içerisine 10 µl gösterim vektörü çözeltisi eklenip buzda 30 dakika bekletilmiştir (kontrol olarak pUC19 plazmidi kullanılmıştır). Tüpler, 42 °C'ye ısıtılmış su banyosunda 2 dakika bekletilmiş sonrasında 2 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra içlerine 900 µl TSB besiyeri eklenerek hücrelerin çoğalması için 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 100 µl alınarak AXI (2.1.4) besiyerine aktarılmış ve özeyle yayma ekimi yapılmıştır. 37 °C'de gecelik inkübasyonu sağlanmış ve ertesi gün mavi-beyaz koloni seçimi yapılmıştır. Belirlenen koloniler hazırlanan PCR mikslere içerisine bırakılmış ve PCR kurulmuştur (Tablo 3). PCR sonucu elde edilen amplikonlardan jel elektroforezinde doğru boyutta olanları sekanslatılmış ve gösterim vektörünün oluşturulduğu doğrulanmıştır. Gösterim vektörü içeren koloniden kit (Geneaid Plasmid Isolation Kit, Tayvan) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda plazmid izolasyonu yapılmıştır.

3.2.5. *Spd1* Gen Dizisinin Gösterim Vektörüne Klonlanması

Spd1 amplikonu ve gösterim vektörü, 2.2.3.'deki yönergelere göre, KpnI ve EcoRI restriksiyon enzimleri ile kesilerek ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kimyasal transformasyon ile DH10B kompetan suşuna aktarılmış ve seçilen kolonilerden koloni PCR'ı yapılmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

3.2.6. Spd1 Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Gösterim vektörü (negatif kontrol) ve Spd1 eklenmiş gösterim vektörü içeren hücreler, sırasıyla ampisilin (0,1 mg/ml) ve IPTG (0,5 mM) içeren TSB besiyerine ekilerek 37 °C'de 600 nm'de 1,0 OD olana kadar inkübe edilmiştir. 10 000 rpm'de 5 dakika santifrüj edilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Besiyerinden tamamen arındırmak için 2 defa 0,01 M PBS ile yıkanarak 10 000 rpm'de 5 dakika santifrüj yapılmıştır. Pelletteki hücreler eşit OD değerinde olacak şekilde bir miktar su ile çözülmüştür. 5 µl hücre çözeltisi, 2 µl 10x reaksiyon tamponu, 13 µl kit (GeneMark Bacterial Genomic DNA Isolation Kit, ABD) ile firmanın yönergelerine uygun şekilde izole edilmiş genomik DNA çözeltisi karıştırılarak reaksiyon miksi hazırlanmıştır. 37 °C'de 15 dakika bekletilmiş ve 15 000 rpm'de 3 dakika santifrüj yaparak hücreler çöktürülmüş ve üst sıvı alınmıştır. Üst sıvı agaroz jelde yürütülmüş ve genomik DNA görüntülenmiştir.

Belirlenen koloniden kit (Geneaid Plasmid Isolation Kit, Tayvan) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiş ve daha sonra kullanmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.7. Spd1 Enziminin Hasadı

Üretilen proteinlerin proteazlar tarafından parçalanmasını engellemek için gösterim vektörü, proteaz üretimi olmayan bir suş olan *E. coli* BL21 suşuna transforme edilmiştir. *E. coli* BL21 kompetan 2.2.3.'deki yönergelere uyularak hazırlanmıştır ve plazmid transformasyonu gerçekleştirilmiştir. DNaz aktivitesi gösteren koloni 2.2.5.'deki yönergelere göre ampisilin ve IPTG içeren TSB besiyerine ekilmiş ve 600 nm'de 1,0 OD olana kadar 37 °C'de inkübe edilmiştir. Üretilmiş hücreler, 30 dakika buzda bekletilip ardından 10 dakika 5000 rpm'de santifrüj yapılmıştır. Besiyerinden tamamen arındırmak için 2 defa 0,01 M PBS ile yıkanarak tekrar 10 dakika 5000 rpm'de santifrüj yapılarak çöktürülmüştür. Hücreler proteaz inhibitörlü 0,01 M PBS ile çözülmüştür. Sonikatör ile hücreler parçalanmış ve parçalanmayan hücreleri uzaklaştırmak için 10 dakika 5000 rpm'de santifrüj yapılmış ardından süpernatant 0,22 µ filtreden geçirilmiştir. Elde edilen süzüntü hidrofobik proteinleri çöktürmek için 1 saat 15 000 rpm'de santifrüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet, enterokinaz tamponu (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH:8) ile çözülmüştür. İçerisine 10U Enterokinaz enzimi (NEB, ABD) eklenerek çalkalayıcıda 25 °C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

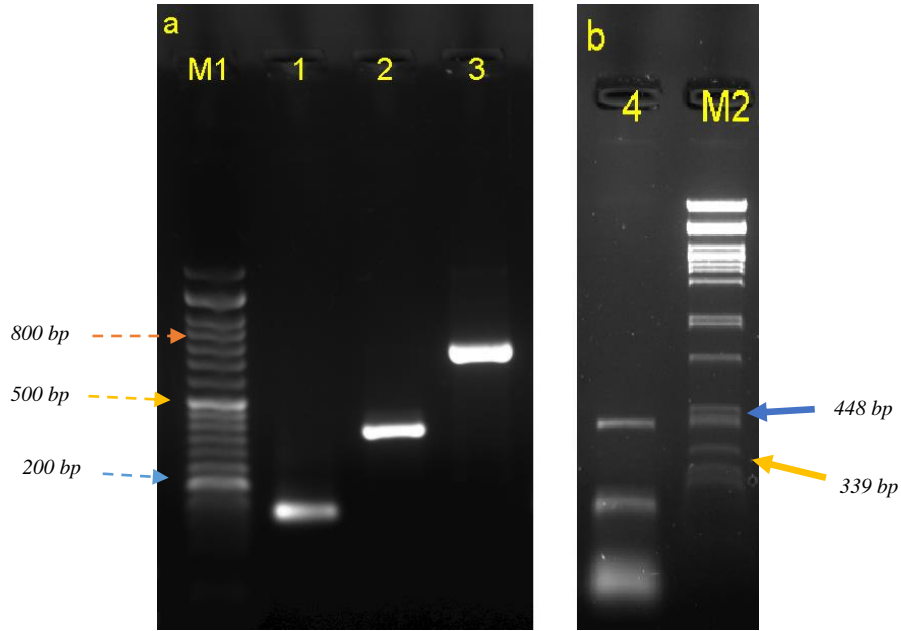
16 saat sonunda, hidrofobik proteinleri uzaklaştırmak için 15 000 rpm'de 2 saat santifrüj yapılmış ve üst sıvı ayrı bir ependorfa alınmıştır. Üst sıvının protein yoğunluğunu artırmak için, dondurularak 0,2 mbar basınç altında, -50 °C'de liyofilize edilmiş ve ardından DNaz aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için üst sıvıdan 5 µl, genomik DNA çözeltisinden 13µl ve 10X reaksiyon tamponundan 2 µl alınarak 37 °C'de 15 dakika inkübe edilmiş ve daha sonra agaroz jelde yürütölerek genomik DNA gösterilmiştir. Protein analizi için SDS-PAGE yapılmıştır (Laemmli, 1970). Liyofilize edilen örnek, membran proteinleri ve hücre lizatı örnek tamponu ile karıştırılıp denatüre etmek için 70°C de 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra jele yüklenerek 100 Volt, 100 mA akımda 2 saat yürütölmüştür.

Bu aşamada protein miktarı yetersiz bulunmuş ve gösterim proteininin gen dizisi *T7* promotere sahip olan pBlueScript SK (+) plazmidine aktarılmıştır (şekil 8). Bunun için pUC19 temelli gösterim vektörü, 2.2.3. deki yönergelere uyularak, EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilerek, aynı enzimlerle kesilmiş pBlueScript SK vektörüne ligasyonu sağlanmıştır. Daha sonrasında *E. coli* BL21 kompetan hücrelerine kimyasal transformasyonu gerçekteştirilmiştir. Ampisilin içeren TSA'da üreyen kolonilerden koloni PCR kurulmuş ve doğru inserti alan koloni belirlenmiştir. Daha sonra bu koloninin DNaz aktivitesine bakılmış ve protein izolasyonu gerçekteştirilmiştir.

4. BULGULAR

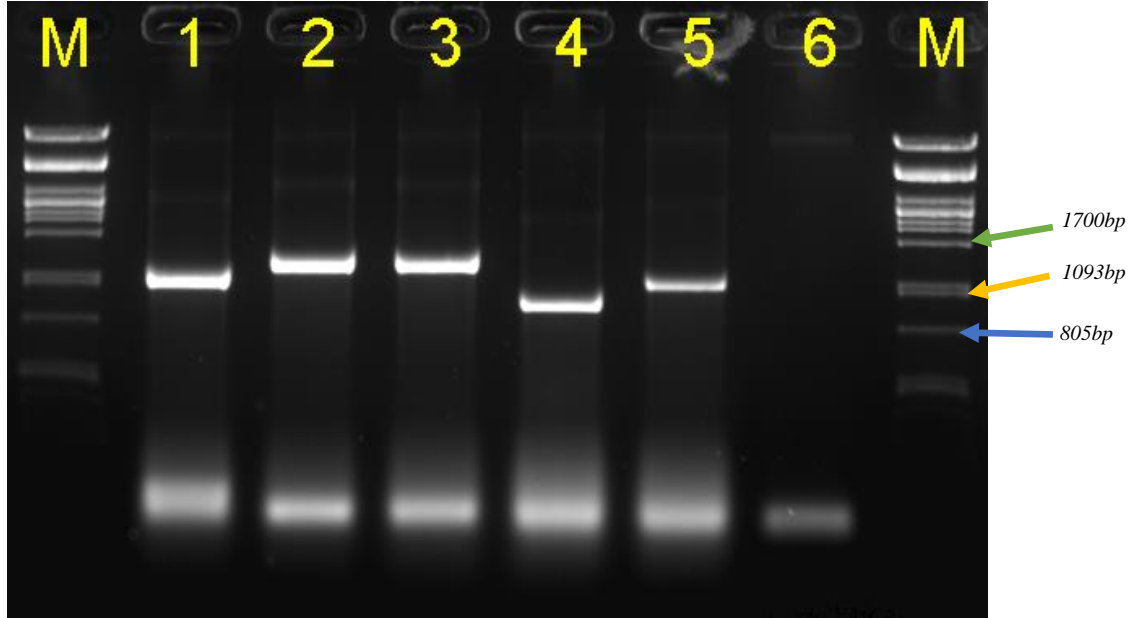
E. coli ve *S. pyogenes* genomik DNA'ları ile kurulan PCR sonucu elde edilen ampliconlar resim 1a'da gösterilmiştir. 1 numaralı kuyu FLpp ve RLpp primerleri ile kurulan PCR sonucu oluşan ampliconu; 2 numaralı kuyu FOmpA ve ROmpA-KpnI primerleri ile kurulan PCR sonucu oluşan ampliconu; 3 numaralı kuyu FSpd-KpnI ve RSpd-EcoRI primerleri ile kurulan PCR sonucu oluşan ampliconu göstermektedir. M1 numaralı kuyu 100 bp ticari DNA markıdır (ABM, Kanada).

Lpp ve OmpA ampliconları ile kurulan "overlap extention PCR" (OE-PCR) sonucu oluşan ampliconlar Resim 1b'de gösterilmiştir. M2 numaralı kuyu Lambda-PstI markıdır. 4 numaralı kuyuda görülen ~450 bp boyutuna karşılık gelen bant jel ekstraksiyon kiti ile elde edilmiştir. Elde edilen Lpp-OmpA füzyon DNA'sı HindIII ve KpnI ile kesilerek aynı enzimlerle kesilmiş pUC19 plazmidine klonlanmıştır. Bu klonlama sonucu oluşan vektör gösterim vektörü olarak adlandırılmıştır.



Resim 1. PCR sonucu oluşan ampliconlar. a: M1 ABM 100 bp Opti-DNA Marker, 1 Lpp (120 bp), 2 OmpA (350 bp), 3 Spd1 (600 bp); b: 4 Lpp-OmpA füzyonu (450 bp), M2 Lambda PstI markır

AXI içeren petrilerde büyüyen kolonilerden yapılan koloni PCR sonucu Resim 2’de gösterilmiştir. M ile gösterilen kuyular Lambda-PstI markırıdır. 1-5 numaralı örnekler petriden seçilen farklı kolonilerin M13 primerleri ile çoğaltılmış amplikonlarını göstermektedir. Yaklaşık olarak 1200 bp boyutunda bant çıkması beklenmiştir. Bu boyuta uyan koloniler daha sonra enzim aktivitesine bakılmak için ampisilin ve IPTG içeren sıvı besiyerine ekilmişlerdir. 6 numaralı örnek negatif kontrolü göstermektedir.

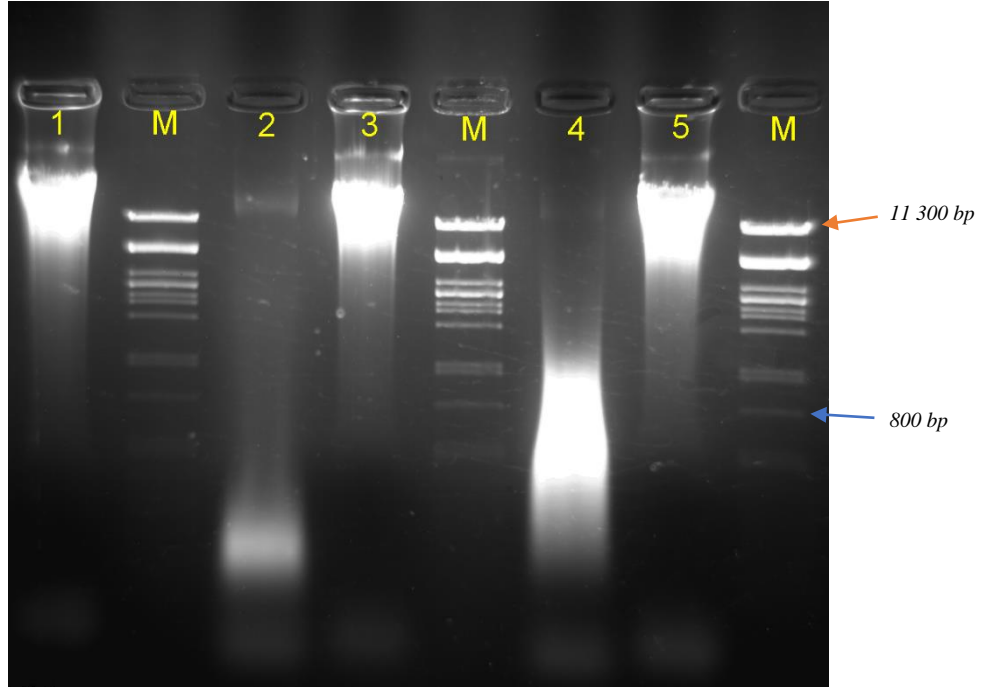


Resim 2. Koloni PCR sonuçları. M Lambda-PstI marker, 1-5 farklı kolonilerin koloni PCR sonuçları, 6 negatif kontrol

E. coli DH10B genomik DNA’sı izole edilmiş ve enzim aktivitesinin ölçülmesinde substrat olarak kullanılmıştır. Rekombinant kolonilerin enzim aktivitesine bakılmış (veri gösterilmemiştir) ve doğru şekilde ligasyonu gerçekleştiren koloni ileri çalışmalar için kullanılmıştır. Bu amaçla, seçilen koloni ve gösterim vektörü içeren (negatif kontrol) koloni ampisilin ve IPTG içeren sıvı besiyerine ekilmişlerdir. Daha sonra hücreler çöktürülerek DNaz aktivite karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda besiyeri uzaklaştırılan hücreler Enterokinaz enzimi tamponunda süspansiyon edilmiş ve enterokinaz enzimi ile reaksiyona bırakılmışlardır. Devamında hücreler uzaklaştırılmış ve üst sıvıdaki serbest DNaz’ın varlığı test edilmiştir. Resim 3’de M kuyuları Lambda-PstI markırını, 1 numaralı kuyu genomik DNA’yı göstermektedir. 2 ve 3 numaralı kuyular sırasıyla Spd1 gösterimi yapılan hücrelerin ve gösterim vektörü içeren hücrelerin enzim aktivitesini göstermektedir. 4 ve 5 numaralı kuyular ise, enterokinaz enzimi kesimi sonrası üst sıvıda serbest kalan Spd1 enziminin aktivitesini ve

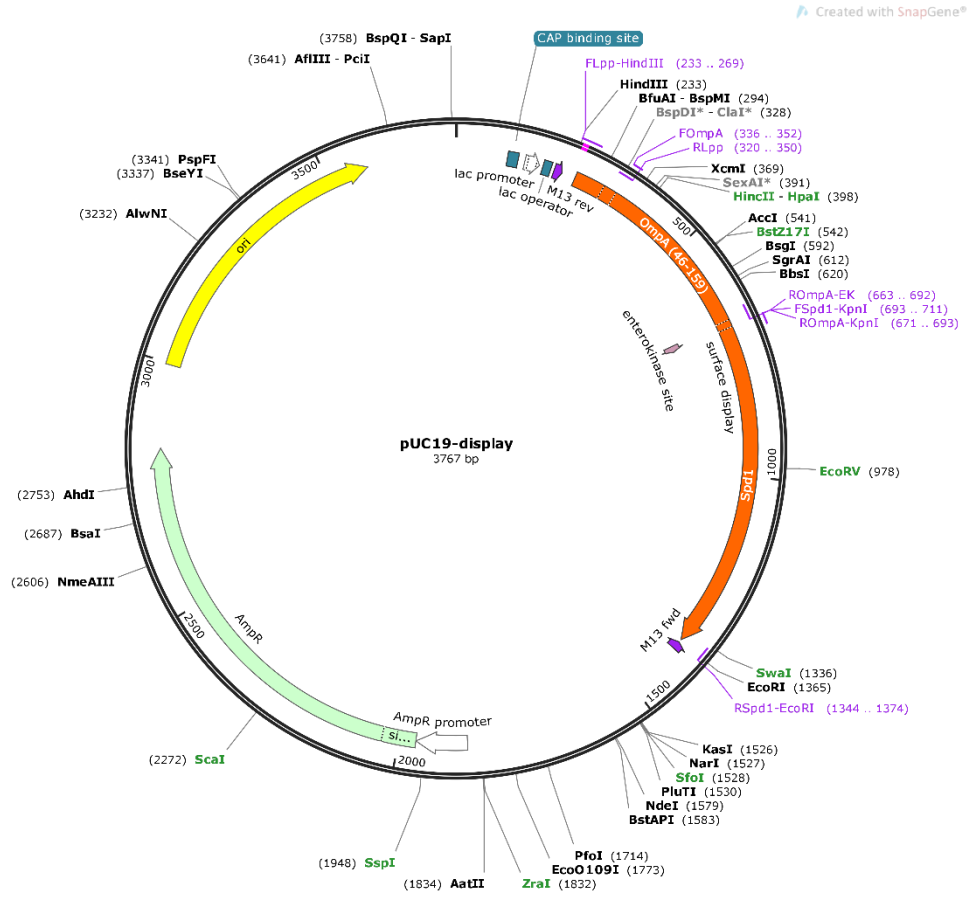
onun negatif kontrolü olan gösterim vektörü içeren hücelere ait üst sıvının enzim aktivitesini göstermektedir.

Gösterimi yapılan Spd1 endonükleazı uzun iplikli DNA'ları (Resim 3'de genomik DNA) rastgele şekilde keserek genomik DNA'yı daha küçük parçalara ayırmıştır. DNA boyutundaki bu küçülme jel elektroforezi ile gösterilebilir. DNA boyutu küçülen iplikler jelde daha uzun mesafe yürür. Böylece DNaz aktivitesi ölçülmüş olur.

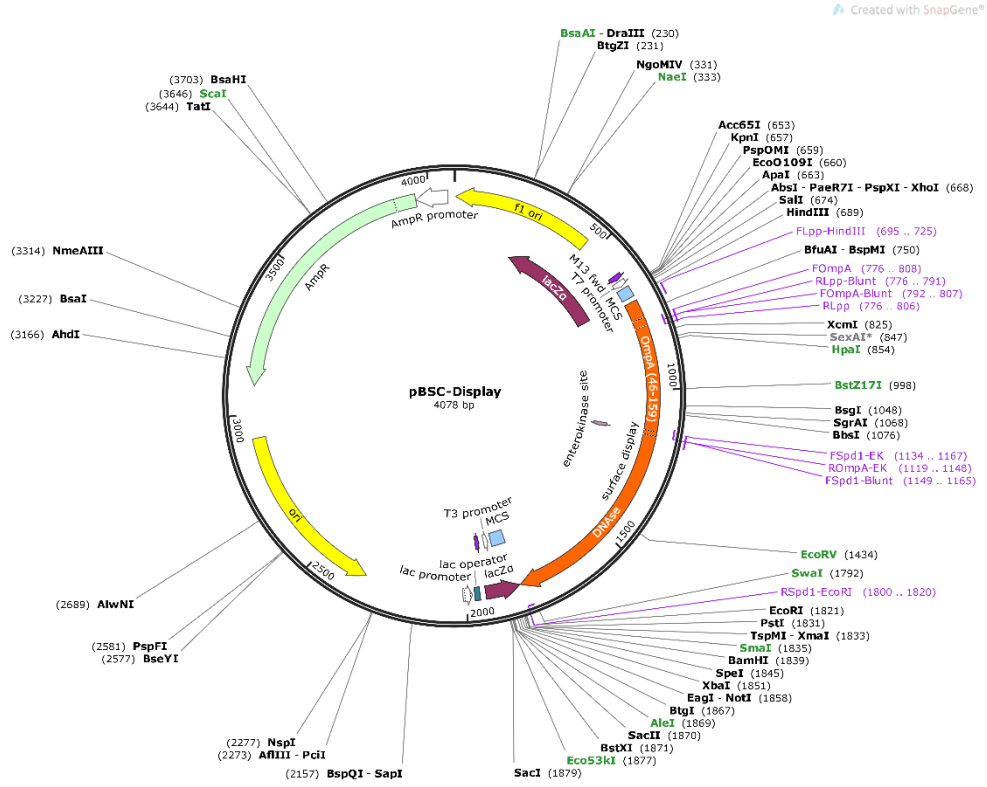


Resim 3. DNaz aktivitesi ölçümü. 1. total DNA, M Lambda PstI marker, 2. Spd1-gösterim vektörü içeren hücelerde DNaz aktivitesi, 3. gösterim vektörü içeren hücelerde DNaz aktivitesi, 4. Spd1 içeren süpernatantın enterokinaz ile kesimi sonrası DNaz aktivitesi, 5. Spd1 içermeyen süpernatantın enterokinaz kesimi sonrası DNaz aktivitesi. Negatif kontrollerde DNA parçalanması olmayıp gösterim vektörü içeren hücrede DNA parçalanması olması, gösterim vektörünün hücreye DNaz aktivitesi kazandırdığını göstermektedir. Ayrıca enterokinaz kesimi sonrası süpernatantta DNaz aktivitesinin olması Spd1'in enterokinaz ile kesilerek ayrıldığını göstermektedir.

Enzim aktivitesi gösterdiği saptanan koloniden M13 PCR yapılmış ve elde edilen ampikon dizi analizine gönderilmiştir ve dizilemesi yaptırılmıştır. Dizi analizi sonucuna göre oluşturduğumuz füzyon dizinin doğruluğu saptanmıştır (Şekil 7). Sanal olarak vektörün hazırlanması için Snapgene programından faydalanılmıştır.

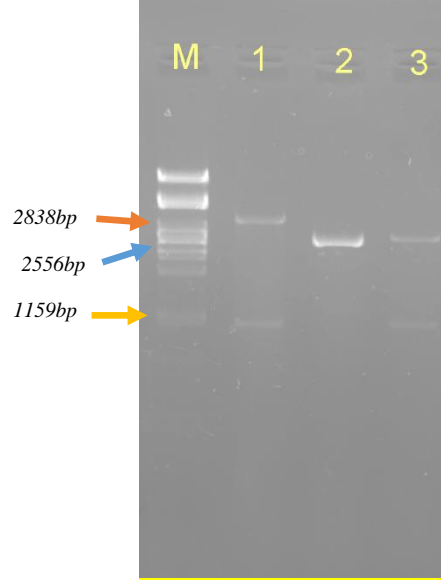


Şekil 10. Spd1 içeren gösterim vektörünün sanal ortamda hazırlanmış hali. pUC19 iskeleti üzerine HindIII ve KpnI enzimleri ile Lpp-OmpA omurgası klonlanmış ardından Spd1, KpnI ve EcoRI enzimleri ile klonlanmıştır.



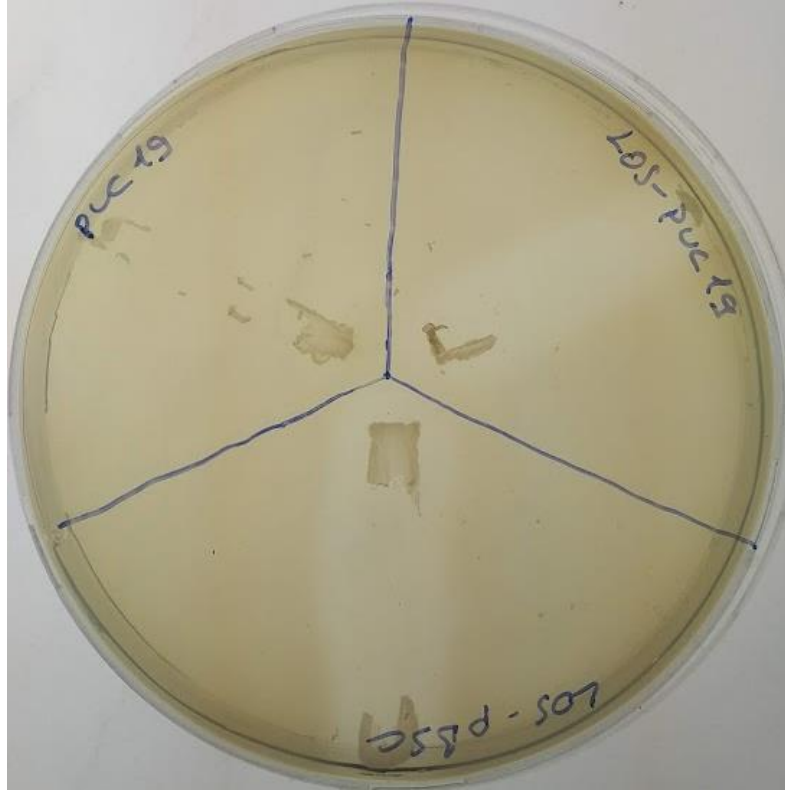
Şekil 8. pBlueScript SK(+) vektörünün gösterim vektörüne çevrilmesinin sanal ortamda hazırlanmış hali. pUC19 temelli gösterim vektöründen EcoRI ve HindIII enzimleri ile alınan gösterim proteinlerinin sekansları aynı enzimlerle kesilmiş pBlueScript SK (+) vektörüne ligasyonu gerçekleştirilmiştir. T7 promoteri, gösterim proteinlerinin dizisi ile aynı yönde olduğu için daha fazla miktarda protein sentezini mümkün kılmıştır.

Spd1 içeren gösterim vektörü plazmid izolasyonu ile izole edilmiş ve EcoRI ve HindIII enzimleri ile kesilerek oluşan bantlar gösterilmiştir (Resim 4). pBlueScript SK vektörü (1) pUC vektöründen (2 ve 3) büyük olduğu için jelde daha yukarıda kalmıştır. Lpp-OmpA-Spd1 (LOS) füzyonu jelde 1 ve 3'de aşağıda görünmektedir.



Resim 4. Plazmid insert gösterimi. M lambda PstI marker, 1 pBlueScript SK (+) LOS, 2 pUC19, 3 pUC19 LOS (EcoRI ve HindIII kesimi sonrası). İki enzim ile kesim sonrası pBlueScript SK ve pUC19 içine yerleştirilen gösterim vektörü bileşenleri 1159 bp'e karşılık gelen yerde görülmüştür. pBlueScript SK, pUC19'dan daha büyük bir vektör olduğu için daha yukarıda görülmüştür.

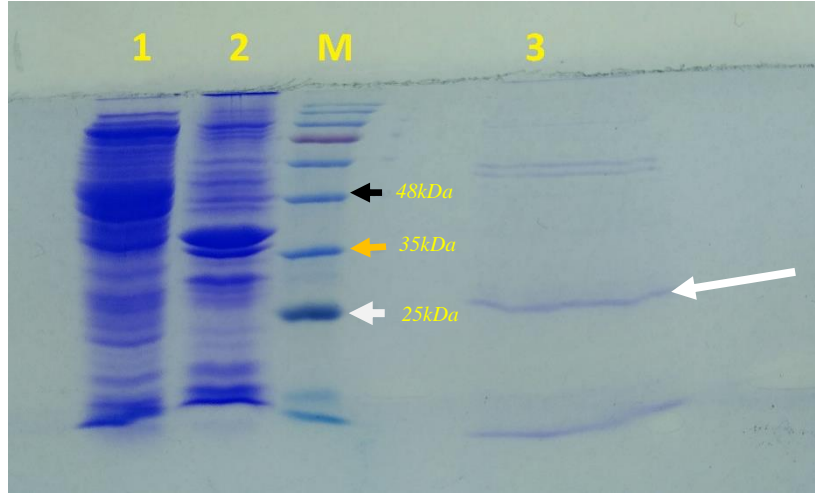
pUC19 ile elde edilen protein miktarının az olduğu düşünülmüş ve *T7* promotörüne sahip pBlueScript SK (+) ile devam edilmiştir. Bunu doğrulamak için pBlueScript ve pUC19 ile oluşturulan gösterim vektörleri DNaz agara ekilmişlerdir. 37 °C'de gecelik inkübasyon yapılmış ve petrinin yüzeyi 1 N HCl ile kaplanmıştır. HCl uzaklaştırılmış ve petride oluşan zonlar incelenmiştir. pBlueScript ile oluşturulan gösterim vektöründe oluşan zonun daha büyük olduğu gösterilmiştir (Resim 5). Küçük DNA'lar (oligonükleotid) HCl ile muamele edilince çözünürler fakat büyük DNA parçaları HCl ile muamele edilince çökelirler. Bu çökeltme de opak bir görüntü oluşturur. DNaz aktivitesine sahip bölgeler ise daha saydamdır.



Resim 5. DNaz agar ile Spd1 anlatım miktarı karşılaştırması. Petride pUC19 yazan kısım pUC19 içeren koloniyi temsil etmektedir. Negatif kontrol olarak kullanılmıştır. LOS-pUC19 yazan kısım pUC19 ile oluşturulan gösterim vektörünü temsil etmektedir. LOS-pBSC yazan kısım ise pBlueScript ile oluşturulan gösterim vektörünü temsil etmektedir.

DNaz aktivitesi gösteren koloniden protein izolasyonu yapılmıştır. Hücre sonikatörde parçalanmış ve ardından hücre proteinleri fraksiyonlarına ayrılmıştır. Hücre proteinleri fraksiyonlarına ayrılırken hidrofobik-hidrofilik özelliklerine göre ayırım yapılmıştır. Kullanılan PBS ve enterokinaz tamponları polar özelliktedir ve hidrofilik proteinler bu tamponlarda çözünür. Hidrofobik proteinler ise bu tamponlarda çözünmez ve biraraya toplanırlar. Santifrüj yardımı ile bu hidrofobik protein topluluğu çöktürülerek pellet halinde toplanır. Elde edilen proteinler SDS-PAGE jeline yüklenmiş ve bantlar gözlenmiştir (Resim 6). Hücreler patlatıldıktan sonra büyük parçalar ve patlamayan hücreler uzaklaştırılmış ve kalan hücre lizatından hidrofobik proteinler santifrüj ile çöktürülmüştür. Hidrofilik fraksiyon 1 numaralı kuyuya yüklenmiştir. Çöken hidrofobik proteinler enterokinaz tamponu içinde çözülmüş ve enterokinaz kesimi yapılmıştır. Enterokinaz kesimi ile hidrofobik Lpp-OmpA füzyon proteini ile hidrofilik Spd1 proteini birbirinden ayrılmıştır. Enterokinaz kesimi sonrası hidrofobik proteinler santifrüj ile çöktürülmüş ve 2 numaralı kuyuya yüklenmiştir. Bu uzaklaştırma sonucu üst sıvıda kalan hidrofilik proteinler 3 numaralı kuyuya yüklenmiştir. Enterokinaz kesimi

sonrası elde edilen Spd1 enzimi yaklaşık 25 kDa boyutundadır ve jel görüntüsü buna uymaktadır.



Resim 6. Hücre proteinlerinin SDS-PAGE görüntüsü. 1 numaralı bant hücre içi hidrofilik proteinler, 2 numaralı bant hücre membran proteinleri ve hidrofobik proteinler, M GeneMark Prestained Protein Markerı, 3 numaralı bant enterokinaz kesimi sonrası saflaştırılmış Spd1 enzimi. Spd1 enzime karşılık gelen bant beyaz ok ile işaretlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Gösterim tekniği ilk olarak George P. Smith tarafından 1985 yılında faj gösterimi ile tanımlanmıştır. F1 fajının kuyruk proteinine bir antijen eklenerek antikorun faja bağlanmasını sağlamıştır. Bu keşfi G.P. Smith'e 2018 yılında Kimya dalında Nobel ödülünü kazandırmıştır.

Faj gösterimi en yaygın kullanılan gösterim tekniği olmasına karşın bazı sınırlamalar sebebiyle 1986 yılında bakteriyel gösterim tekniği geliştirilmiştir (Freudl ve ark 1986; Charbit ve ark., 1986). Bakteriyel gösterim ile daha büyük proteinlerin gösterimi yapılabilir hale gelmiştir. Ayrıca faj gösteriminde mümkün olmayan, tek bir hücre yüzeyinde farklı proteinlerin gösterimini mümkün kılmıştır (Fleetwood ve ark., 2014). Tablo 6'de Gram negatif bakterilerde uygulanan bakteriyel gösterim tekniklerine örnekler verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi farklı bakteriler farklı amaçlar için gösterim tekniğinde kullanılmıştır. Bu esnekliği, gösterim tekniğinin birçok alanda kullanılmasını mümkün kılmıştır.

Shin ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında antimikrobiyal peptidler (AMP) sentezlettilererek Lpp-OmpA ile gösterimi yapılmıştır. AMP'ler Lpp-OmpA omurgasına pepsin tanıma bölgesi ile bağlanmış ve midede kesilerek ayrılması düşünülmüştür. Böylece çiftlik hayvanlarındaki mide ve bağırsak enfeksiyonlarının önlenmesi amaçlanmıştır. Pepsin düşük pH'da çalıştığı için, bizim çalışmamızda kesim enzimi olarak daha yüksek pH'da aktivite gösteren enterokinaz enzimi tercih edilmiştir.

Tablo 6. Gram negatif bakterilerdeki gösterim tekniği ile yapılmış çalışmalar.

Gösterim Proteini	Gösterimi Yapılan Protein	Konak Hücre	Uygulama
N terminal füzyon			
IgA1 proteaz ve AIDA-I	CtxB (13 kDa)	<i>E. coli</i>	Aşı
Shigella VirG	PhoA (47 kDa), MalE (47 kDa),	<i>E. coli</i>	VirG salgı yolağı çalışmaları
PAL	atrazin aktikoru (25 kDa),	<i>E. coli</i>	biosensör
SpA'nın B domaini	GFP-p53 / GFP-K	<i>E. coli</i>	Amino asit değişimi analizi
C terminal füzyon			
Lpp-OmpA	OPH	<i>E. coli</i>	biobozunma
	İnsan Erb2 ve IL2-R alfa	<i>E. coli</i>	Faj antikor seçme
Pseudomonas INP	CMCaz	<i>E. coli</i>	Bütün hücre biyokatalizi
	HsbAg	<i>S. typhi</i> Ty21a	Oral aşı
	Salmobin	<i>E. coli</i>	Ökaryot protein gösterimi
<i>E. coli</i> TraT	HbsAg	<i>E. coli</i>	Aşı
Sandviç füzyon			
OmpC	Poli his. Peptidi	<i>E. coli</i>	Ağır metal uzaklaştırma
<i>V. cholerae</i>	FnBPA Epitopu	<i>E. coli</i>	Staff aşısı

Çalışmamızda, bakteri gösterimi yukarıda bahsedilen (Şekil 3) kullanım alanları dışında, rekombinant bir proteini saflaştırmak için kullanılmıştır. Bu amaçla rekombinant plazmid tasarlanırken Lpp-OmpA proteini ile Spd1 proteini arasına enterokinaz enzimi için tanıma bölgesi eklenmiştir. Ayrıca Lpp-OmpA füzyon proteinini gösterim tekniği için tercih etmemizin başka bir sebebi de vardır. OmpF temelli yapılan bir çalışmada sentezlenen rekombinant proteinin anlatım miktarını artırmak için OmpF promotöründe mutasyon oluşturulmuş ve konstitütif hale getirilmiştir (Chen ve ark., 2019). Araştırdığımızda OmpA'nın da benzer bir özelliğe sahip olduğu anlaşılmıştır. Yeterli miktarda OmpA sentezlendiğinde antisense bir RNA sentezlenir ve bu RNA OmpA anlatımını durdurur. Bu problemi aşmak için Lpp-OmpA füzyonu tercih edilmiştir. Böylece hem antisense RNA rekombinant protein sentezini baskılamamış hem de C terminal füzyonu sağlanarak daha büyük proteinlerin anlatımı

mümkün olmuştur. Protein üretimini artırmanın yanında membran izolasyonunun daha verimli yapılması saflaştırılmış protein miktarına doğrudan etkilidir.

Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerden 5 tanesi seçilmiş, M13 primerleri ile yapılan koloni PCR sonucu beklenen boyuta yakın olan farklı insertler belirlenmiştir (Resim 2). Bu 5 koloniden 2'si DNaz aktivitesi göstermiş ve ampikon boyutlarının farklı olma sebebini anlamak için dizi analizi yaptırılmıştır. Dizi analiz sonuçları incelendiğinde, klonlama sırasında araya küçük oligonukleotidlerin girdiği görülmüştür. Araya giren oligonukleotidlerin kodon kaymasına sebep olması, diğer 3 kolonide DNaz aktivitesinin oluşmamasına sebep olmuş olabilir. Ayrıca aktivite gösteren iki koloniden biri daha yüksek aktivite göstermiştir (veri gösterilmemiştir). Dizi analizleri incelendiğinde araya oligonukleotid alan klonun daha iyi aktivite gösterdiği anlaşılmıştır. Ligasyon sırasında araya giren bu oligonukleotidin üçlü kodon yapısını bozmadığı anlaşılmaktadır. Aynı zamanda Spd1 enzimini hücre membranından daha uzak tutmaya yaradığı düşünülmektedir. Böylece Spd1 enzimi substratı olan DNA'lara daha kolay ulaşmış ve daha yüksek aktivite göstermiştir. Çalışmamızda saflaştırma hedeflendiği için aktivitesinin fazla olması önemsenmemiştir. Fakat bütün hücre aktivitesinin kullanılması hedeflenirse OmpA – rekombinant protein arasına bir bağlayıcı dizi eklenerek aktivitenin artırılması mümkündür. Araya eklenen dizi rekombinant proteini hücre membranından uzaklaştırıp, substratı ile daha iyi etkileşime geçmesini sağlayabilir.

Çalışmamızın diğer bir sonucu olarak, tüm hücre ile muamele edilmiş olan genomik DNA'ların, saflaştırdığımız Spd1 ile muamele edilmiş olanlara göre daha iyi degrade olduğu gözlenmiştir (Resim 3). DNA, 2 numaralı örnekte 4 numaralı örneğe oranla çok daha iyi degrade olmuştur. Bunun iki farklı sebebi olabilir; Birincisi, bütün hücre yüzeyinde olan Spd1 miktarı saflaştırılmış Spd1 miktarına oranla oldukça fazladır. Sonikasyon işlemleri sonucu parçalanmadan kalan hücrelerin uzaklaştırılması, ayrıca enterokinaz kesimi sebebiyle membran proteinlerinden ayrılamayan Spd1'lerin kaybı da bu duruma yol açmış olabilir. Ayrıca santifrüj işleminde de çöktürme başarısı 100% değildir. Spd1'in bir kısmı bu aşamalarda kaybedilmektedir.

İkincisi; 2 numaralı örnekte, hücreler DNaz tamponunda çözülmüştür. Bu yüzden Spd1 tam aktivite gösterebilmektedir. Fakat 4 numaralı örnekte saflaştırma basamakları sonucunda ortamda enterokinaz tamponu da bulunmaktadır. Ayrıca protein yoğunluğunu artırmak için liyofilizasyon işlemi yapılmıştır. Bunun sonucunda protein ile birlikte tuz konsantrasyonu da artmıştır. Bu yoğun tuz DNaz aktivitesini olumsuz yönde etkilemiştir. Tuz yoğunluğunun fazla olması SDS-PAGE ayırımında protein bandının genişlemesine de sebep olmuştur (Resim 6).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde rekombinant DNA ve rekombinant proteinlerin dizaynı, üretilmesi ve saflaştırılması biyoteknoloji açısından oldukça önemlidir. Hastalıkların tanı ve tedavilerinde, gıda endüstrisinde, tarım ve hayvancılık alanında kullanılan enzim ve proteinler ile ilgili teknoloji her geçen gün daha da geliştirilmektedir. Proteinlerin saflaştırmasında kullanılan mevcut yöntemler ise genelde masraflı ve karmaşıktır. Tez çalışmamızda Spd1 enzimi için geliştirdiğimiz ve kullandığımız gösterim temelli bu yöntem ise basittir ve özelleşmiş cihazlara ihtiyaç duymadan uygulanabilmektedir. Bakteriyel gösterim teknikleri son yıllarda popülerleşmeye başlamıştır. 2014 ve 2019 yıllarında alınan patentler de bu fikri desteklemektedir. 2014 yılında Jose ve arkadaşları tarafından, birçok Gram negatif bakteride kullanılabilen fonksiyonel bir protein gösterimi üzerine patent alınmıştır. 2019 yılında Salverda ve arkadaşları tarafından, dış membran proteinleri ile yapılan antijen gösterimi üzerine patent alınmıştır.

Tez çalışmamız sayesinde sağlık alanında, özellikle kistik fibrozis tedavisinde kullanılan streptodornaz enzimi için basit ve düşük maliyetli bir yol geliştirilmiştir. Aynı yöntem basamakları ve mantığının diğer rekombinant proteinlerin saflaştırılması amacıyla hem laboratuvarımız bünyesinde, hem de ileride geniş ölçekli üretimlerde faydalı bir model olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Babu MM, Priya ML, Selvan AT, Madera M, Gough J, Aravind L, Sankaran K.** A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins, *Journal of Bacteriology*, 2006, 188.8: 2761-2773.
- Bazan J, Calkosiński I, Gamian A.** Phage display: A powerful technique for immunotherapy: Introduction and potential of therapeutic applications, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2012, 8.12: 1817-1828.
- Beis K, Whitfield C, Booth I, Naismith JH.** Two-step purification of outer membrane proteins, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, 39(1-3), 10-14.
- Boags AT, Samsudin F, Khalid S.** Binding From both sides: TolR and full-length OmpA bind and maintain the local structure of the *E. coli* cell Wall, *Structure*, 2019, 27(4), 713-724.
- Canchaya C, Desiere F, McShan WM, Ferretti JJ, Parkhill J, Brüssow H.** Genome analysis of an inducible prophage and prophage remnants integrated in the *Streptococcus pyogenes* strain SF370, *Virology*, 2002, 302.2: 245-258.
- Chai TJ, Foulds J.** Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 ompA mutants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 1977, 493.1: 210-215.
- Charbit A, Boulain JC, Ryter A, Hofnung M.** Probing the topology of a bacterial membrane protein by genetic insertion of a foreign epitope; expression at the cell surface, *The Embo Journal*, 1986, 5.11: 3029-3037.
- Chen T, Wang K, Chi X, Zhou L, Li J, Liu L, Zhang J.** Construction of a bacterial surface display system based on outer membrane protein F, *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1), 1-13.
- Cho S, Shin D, Ji GE, Heu S, Ryu S.** High-level recombinant protein production by overexpression of Mlc in *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology*, 2005, 119(2):197-203.

Daugherty PS. Protein engineering with bacterial display, *Current Opinion in Structural Biology*, 2007, 17(4), 474-480.

Fleetwood F, Andersson KG, Ståhl S, Löfblom J. An engineered autotransporter-based surface expression vector enables efficient display of Affibody molecules on OmpT-negative *E. coli* as well as protease-mediated secretion in OmpT-positive strains, *Microbial Cell Factories*, 2014, 13(1), 179.

Freudl R, MacIntyre S, Degen M, Henning U. Cell surface exposure of the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12, *Journal of Molecular Biology*, 1986, 188.3: 491-494.

Gophna U, Ideses D, Rosen R, Grundland A, Ron EZ. OmpA of a septicemic *Escherichia coli* O78—secretion and convergent evolution, *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294.6: 373-381.

Gupta SK, Dangi AK, Smita M, Dwivedi S, Shukla P. Effectual bioprocess development for protein production, *In Applied Microbiology and Bioengineering*, 2019, 203-227, Academic Press.

Hantke K, Braun V. Covalent Binding of Lipid to Protein: Diglyceride and Amide-Linked Fatty Acid at the N-Terminal End of the Murein-Lipoprotein of the *Escherichia coli* Outer Membrane, *European Journal of Biochemistry*, 1973, 34.2: 284-296.

Higuchi R, Krummel B, Saiki R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions, *Nucleic Acids Research*, 1988, 16(15), 7351-7367.

Justyna EK, Johan PT, Edward JT, The structural characterization of a prophage-encoded extracellular DNase from *Streptococcus pyogenes*, *Nucleic Acids Research*, Volume 40, Issue 2, 2012, Pages 928–938

Kim KS. *E. coli* invasion of brain microvascular endothelial cells as a pathogenetic basis of meningitis, *In Bacterial Invasion Into Eukaryotic Cells*, Springer, Oelschlaeger TA, Hacker JH (Eds.), Boston, MA, 2000. , p. 47-59.

Kim KS. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier, *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186, S220-S224.

- Klimke WA, Rypien CD, Klinger B, Kennedy RA, Rodriguez-Maillard JM, Frost LS.** The mating pair stabilization protein, TraN, of the F plasmid is an outer-membrane protein with two regions that are important for its function in conjugation, *Microbiology*, 2005, 151.11: 3527-3540.
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P.** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell, *Molecular Microbiology*, 2000, 37.2: 239-253.
- Kumar R, Parray HA, Shrivastava T, Sinha S, Luthra K.** Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 135, 907-918.
- Laemmli UK.** Glycine-SDS-PAGE for separation of proteins, *Nature*, 1970, 227(5).
- Lee SY, Choi JH, Xu Z.** Microbial cell-surface display, *Trends in Biotechnology*, 2003, 21.1: 45-52.
- Miyata T, Fan X.** A second hit for TMA, *Blood*, 2012, 120.6: 1152-1154.
- Nakanishi K, Sakiyama T, Kumada Y, Imamura K, Imanaka H.** Recent advances in controlled immobilization of proteins onto the surface of the solid substrate and its possible application to proteomics, *Current Proteomics*, 2008, 5.3: 161-175.
- Nakayama H, Kurokawa K, Lee BL.** Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways, *The Febs Journal*, 2012, 279.23: 4247-4268.
- Nishino T, Morikawa K.** Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors, *Oncogene*, 2002, 21, 9022–9032.
- Pautsch A, Schulz GE.** High-resolution structure of the OmpA membrane domain, *Journal of Molecular Biology*, 2000, 298.2: 273-282.
- Pieterse E.** The journey of neutrophil extracellular traps in lupus, 2017, Radboud University, (Doctoral dissertation)
- Plückthun A.** Ribosome display: a perspective. In: Ribosome display and related Technologies, *Springer*, Douthwaite JA, Jackson RH. (Eds.), New York, NY, 2012. p. 3-28.

Power ML, Ferrari BC, Littlefield-Wyer J, Gordon DM, Slade MB, Veal DA. A naturally occurring novel allele of *Escherichia coli* outer membrane protein A reduces sensitivity to bacteriophage, *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72.12: 7930-7932.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* using Calcium Chloride, *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2001, Irwin N, Janssen KA (Eds.), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Shin JR, Lim KJ, Cho JH, Kim SC. Display of multimeric antimicrobial peptides on the *Escherichia coli* cell surface and its application as whole-cell antibiotics, *Plos One*, 2013, 8(3), e58997.

Stahl S, Uhlén M. Bacterial surface display: trends and progress, *Trends in Biotechnology*, 1997, 15.5: 185-192.

Stapleton JA, Whitehead TA, Nanda V. Computational redesign of the lipid-facing surface of the outer membrane protein OmpA, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(31), 9632-9637.

Storisteanu DM, Pocock JM, Cowburn AS, Juss JK, Nadesalingam A, Nizet V, Chilvers ER. Evasion of neutrophil extracellular traps by respiratory pathogens, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2017, 56(4), 423-431.

Uchański T, Zögg T, Yin J, Yuan D, Wohlkönig A, Fischer B, Steyaert J. An improved yeast surface display platform for the screening of nanobody immune libraries, *Scientific Reports*, 2019, 9.1: 382.

Wagener JS, Kupfer O. Dornase alfa (Pulmozyme), *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2012, 18.6: 609-614.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : DOĞAN, Yunus
Uyruk : T.C.

Doğum yeri ve tarihi : Aydın / 24.03.1992
E-mail : yunus.dgn.09@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lisans	İstanbul Üniversitesi (Moleküler Biyoloji ve Genetik)	2016

BURSLAR ve ÖDÜLLER

Pseudomonas aeruginosa Suşları Üzerine Etkili Laboratuvarımızda Saflaştırılan Bakteriyofajların Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. TÜBİTAK 1001 Projesi, 218S464 (Bursiyer)

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2014-2014	İstanbul Üniversitesi DETAE Sinirbilim ABD	Stajyer

AKADEMİK YAYINLAR

1. PROJELER

Pseudomonas aeruginosa Suşları Üzerine Etkili Laboratuvarımızda Saflaştırılan Bakteriyofajların Fenotipik ve Genotipik Karakterizasyonu. TÜBİTAK 1001 Projesi, 218S464 (Bursiyer)

ÜYE OLUNAN BİLİMSEL KURULUŞLAR

TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Genç Bilim İnsanları Komisyonu (TMC-GençBil)