

**İNSAN BÜYÜME HORMONU SALGILATMA
SİNYAL DİZİSİNİN *Tetrahymena thermophila*
TARAFINDAN REKOMBİNANT PROTEİN
ÜRETİMİNDE KULLANIMI**

Yüksek Lisans Tezi

Serkan DERELİ

Eskişehir, 2017

İNSAN BÜYÜME HORMONU SALGILATMA SİNYAL DİZİSİNİN *Tetrahymena thermophila* TARAFINDAN REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE KULLANIMI

Serkan DERELİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Mayıs, 2017**

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 1504F170 no'lu proje (BAP) kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Serkan DERELİ'nin "İnsan Büyüme Hormonu Salgılatma Sinyal Dizisinin *Tetrahymena thermophila* tarafından Rekombinant Protein Üretiminde Kullanımı" başlıklı tezi 29/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç.Dr. Muhittin ARSLANYOLU

.....

Üye : Doç.Dr. Gürler AKPINAR

.....

Üye : Yrd.Doç.Dr. Yonca Yüzügüllü KARAKUŞ

.....

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

İNSAN BÜYÜME HORMONU SALGILATMA SİNYAL DİZİSİNİN *Tetrahymena thermophila* TARAFINDAN REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE KULLANIMI

Serkan DERELİ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2017

Danışman: Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Tetrahymena thermophila ökaryotik, silli ve tek hücreli bir organizma olup, kısa bölünme süresi ve kolay kültürizasyona sahip bir model organizmadır. Organizmanın rekombinant kapasitesi, insan DNazI enzimi ile insan alkalın fosfataz proteinlerinin rekombinant üretim çalışmaları ile tanımlanmıştır. Günümüzde ilaç sektöründe ihtiyaç duyulan terapötik proteinlerden biri olan ve büyüme bozukluğu olan bireylerin tedavisinde kullanılan insan büyüme hormonunun üretimi maya, *E. coli* ve insan kücre kültüründe gerçekleştirilmektedir. Daha önce bu proteinin üretiminde kullanılmamış *T. thermophila*'nın insan büyüme hormonunun E.R sinyal dizisini tanıyarak işleyebileceği ve rekombinant proteini dışarıya salgılayarak üretebileceği çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, E.R sinyal dizisi ile birlikte hGH geni dizisinin kodonları organizmaya uyumlu hale getirilerek sentetik olarak ürettirilmiştir. Oluşturulan hGH üretim gen kasetleri, 45 kopyalı genom entegrasyonunu sağlayan pNeo4 ve 10.000 kopyalı ekstrakromozomal dairesel pIGF vektörlerine klonlanarak, biyolistik silah ile konjugatif/vejetatif *T. thermophila* hücrelerine transforme edilmiştir. Pozitif transformantlar ısı şoku veya CdCl₂ ile indüklendikten sonra hücre içi ve hücre dışı ortamdan saflaştırılan proteinlerin iki bağımsız SDS-PAGE ve Western Blot analizi, hücre içi ve hücre dışı ortamda yaklaşık 23 kDa'lık sinyali kesilmiş bir proteinin varlığını göstermiştir. Sonuç olarak; *T. thermophila*'nın insan hGH'nin E.R. sinyal dizi bölgesini tanıyıp kullandıktan sonra kesip uzaklaştırdığı ve rekombinant proteini hücre dışına salgılayabildiği görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: İnsan Büyüme Hormonu, Sinyal Peptid, Rekombinant Üretim, *Tetrahymena thermophila*

ABSTRACT

USE OF HUMAN GROWTH HORMONE SECRETORY SIGNAL SEQUENCE IN RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION BY *Tetrahymena thermophila*

Serkan DERELİ

Department of Advanced Technologies

Anadolu University, Graduate School of Science, May 2017

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Tetrahymena thermophila is a eukaryotic, ciliated, single-celled model organism with short division time and easy cultivation features. The recombinant capacity of the organism demonstrated by recombinant production studies of human DNaseI and human alkaline phosphatase proteins. The production of human growth hormone, which is one of the therapeutic proteins needed in the pharmaceutical sector and used to treat individuals with the growth disorder, is carried out in yeast, *E. coli*, and the human cell culture. It is hypothesized that *T. thermophila*, which is not used to produce this protein before, can recognize the E.R signal sequence of human growth hormone and secrete the recombinant protein outside of the cell. For this purpose, the codon sequence of the hGH gene with hGH E.R signal sequence was adapted to the organism and produced synthetically. The generated hGH gene cassettes were cloned into pNeo4 vectors providing genome integration over 45 copies and extrachromosomal pIGF circular vectors containing origin with 10.000 copy number, were transformed into conjugative/vegetative *T. thermophila* cells by biolistic particle gun. After inducing positive transformants by heat shock or CdCl₂, two independent SDS-PAGE and Western Blot analyses of purified proteins from the cells showed recombinant protein has approximately 23 kDa molecular mass and the signal sequence was processed. As a result; it is understood that *T. thermophila* recognizes human hGH E.R signal sequence, uses the signal sequence, cuts it away and secretes the recombinant protein outside the cell.

Keywords: Human Growth Hormone, Signal Peptide, Recombinant Production, *Tetrahymena thermophila*,

ÖNSÖZ

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca akademik, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu tez çalışmasını gerçekleştirmeme olanak sağlayan sayın hocam Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na,

Laboratuvarda tecrübelerini benimle paylaşan ve her aşamada sayısız yardım ve desteklerini gördüğüm Ayça Fulya ÜSTÜNTANIR DEDE, Murat KAYA, Nurçin KÜÇÜKOĞLU, Erhan ASLAN, Handan Açelya KAPKAÇ ve Gürkan YILMAZ 'a,

Hayatım boyunca desteklerini hissettiğim ve bugünlere ulaşmamda büyük emekleri olan Aileme,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yükseköğretim bursu ile maddi/manevi olarak beni destekleyen Türk Eğitim Vakfı'na,

Bu çalışmanın ortaya çıkış ve tamamlanma sürecinde yanımda olan ismini buraya sığdıramayacağım tüm güzel insanlara ve hayatından değerli saatlerini laboratuvarlara adayan bütün araştırmacılara, en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Serkan DERELİ

Mayıs 2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

29/05/2017

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Serkan DERELİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç	4
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	5
2.1. Çalışmada Kullanılan Irklar ve Kültürizasyon Aşamaları	5
2.2. Büyüme Hormonu Rekombinant Üretim Dizisi Tasarımı ve Vektörlerin Oluşturulması	5
2.2.1. Sentetik hGH dizisinin tasarımı ve kodon uyumu	5
2.2.2. hGH rekombinant üretim DNA dizisinin oluşturulması.....	6
2.2.3. Genom entegrasyon vektörlerinin yapılandırılması.....	6
2.2.4. Konjugatif rekombinant üretim sistemi için rekombinant dizilerin yapılandırılması.....	10
2.3. Rekombinant Vektörlerin <i>T. thermophila</i> Hücrelerine Transformasyonu ve Pozitif Transformantların Seçilimi	11
2.4. Transformant Hücrelerin İndüklenme Aşamaları	12
2.5. Transformant Hücrelerde Genomik DNA Analizleri	12
2.6. İndüklenmiş Transformantlarda cDNA Analizleri.....	13
2.7. Pozitif Transformantlarda Protein Analizleri	13

3. BULGULAR	16
3.1. hGH Dizisinin Protein Üretimi İçin <i>T. thermophila</i>' ya Kodon Uyumu.....	16
3.2. Kodon Uyumlu hGH Dizisinin Transformasyonda Kullanılacak Vektörlere Klonlanması	17
3.3. <i>T. thermophila</i> Vejetatif ve Konjugatif Transformasyon Bulguları .	24
3.4. Transformantlarda Genomik DNA Analizleri	25
3.5. İndüklenen Transformantlarda RNA Seviyesinde Gen İfade Analizleri.....	27
3.6. İndüklenen Transformantlarda Protein Seviyesinde Gen İfade Analizleri.....	29
3.6.1. <i>T. thermophila</i> CU428 pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT / B10 kodlu klonunun protein ifade analizi bulguları	29
3.6.2. <i>T. thermophila</i> CU428 pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT / H3 kodlu klonunun protein ifade analizi bulguları	34
3.6.3. <i>T. thermophila</i> CU428 pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT / D kodlu klonunun protein ifade analizi bulguları.....	34
3.6.4. Ekstrakromozomal pIGF vektörlü <i>T. thermophila</i> konjugatif transformantlarında protein ifade analizi.....	34
4. TARTIŞMA.....	38
5. SONUÇ	41
KAYNAKÇA.....	42
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1.	Büyüme Hormonu hGH'nin <i>T. thermophila</i> 'da Rekombinant Üretimi ve Hipotezin Sınanması için Oluşturulan Diziler ve Vektörler	24
-------------------	--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1.	İnsan Büyüme Hormonu Moleküler Yapısı	3
Şekil 2.1.	Modifiye pNeo4-MTT-Hsp70.2 Genom Entegrasyon Vektörü	8
Şekil 2.2.	MTT1 Genomik DNA Lokusunda Homolog Rekombinasyon Yoluyla Genom Entegrasyonunun Sağlanması	9
Şekil 2.3.	pIGF Vektörünün Yapısı ve Klonlama Bölgeleri	10
Şekil 3.1.	Büyüme Hormonunun Protein Kodlayıcı DNA Dizisinin <i>T. thermophila</i> Kodon Sözlüğüne Göre Optimize Edilmesi	17
Şekil 3.2.	hGH1 Sentetik Üretim DNA Parçasının Teyidi ve pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT Genom Entegrasyon Vektörüne Klonlanması ...	18
Şekil 3.3.	Kodon Optimize Sentetik Dizi Modifikasyonları ve Rekombinant hGH Dizisinin Elde Edilmesi	19
Şekil 3.4.	Rekombinant hGH (E.R Sinyalli) Üretim Dizisinin Oluşturulması ve pNeo4-MTT Vektörüne Klonlanması	20
Şekil 3.5.	Rekombinant pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT Vektörünün Kontrolü ...	21
Şekil 3.6.	İnsan Büyüme Hormonunun E.R. Sinyal Dizisinin Test Vektörleri	22
Şekil 3.7.	pIGF Vektörlerine Klonlanacak Parçaların Oluşturulması ve Teyidi	23
Şekil 3.8.	Transformantların Genom Entegrasyon ve Ekstrakromozomal Vektör Varlığının Genomik DNA Kullanılarak PZR Analizleri	26
Şekil 3.9.	Transformant Hücre Gruplarında Promotor İndüksiyona Bağlı mRNA ifadesinin cDNA-PZR ile Analizi	28
Şekil 3.10.	<i>T. thermophila</i> CU428 pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT/B10 klonundan SDS-PAGE ve Western Blot Analizi	30
Şekil 3.11.	<i>T. thermophila</i> CU428 pNeo4-HSP70.2(minus)-hGH-MTT/B10 Toplam Protein Örneklerinin Afinite Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılmasından Elde Edilen Kromatogram Verisi	31
Şekil 3.12.	Kolon Kromatografisinden Elde Edilen Fraksiyonların SDS-PAGE ve Western Blot Analizi. A. SDS-PAGE Analizi	32

Şekil 3.13.	<i>T. thermophila</i> B10 Klonunun Toplam Çözünür Proteinlerinin Ni-NTA ile Afinitik Saflaştırılan ve Konsantre Edilen Elüsyonlarının SDS-PAGE ve Western Blot Analizi	33
Şekil 3.14.	<i>T. thermophila</i> pIGF-PLA1-HGH-6xHistidin Vektörlü Transformantlarda CdCl ₂ İndüksiyonu Sonrası Protein Üretim Analizi .	36
Şekil 3.15.	<i>T. thermophila</i> pIGF-ERSinyal-HGH-6xHistidin Vektörlü Transformantlarda CdCl ₂ İndüksiyonu Sonrası Protein Üretim Analizi .	37
Şekil 4.1.	<i>T. thermophila</i> ' da Sinyal Dizisi İşleme Kapasitesine Dair Literatürdeki Çalışmalar	38
Şekil 4.2.	<i>T. thermophila</i> PLA1 Sinyali (22 A.A Sinyal + 14 A.A Spacer) ve İnsan Büyüme Hormonu Proteini Sinyal Dizisi (26 A.A) Arasında Korunmuşluk Analizi	39

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

T. thermophila: *Tetrahymena thermophila*

hGH: İnsan Büyüme Hormonu (Human Growth Hormone)

kDa: Kilodalton

HSP70.2: *T. thermophila* 70 kDa Isı Şoku Proteini -II (Heat Shock – 70 kDa)

E.R: Endoplazmik Retikulum

PLA1: *T. thermophila* Fosfolipaz-1 Proteini

bç: Baz Çifti (Base Pair-bp)

rDNA: Ribozomal DNA

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

T.P: Toplam Protein (Çözünür)

UTR: Translasyona Girmeyen Kısım (Untranslated Region)

Bulk Transformant: Tek Hücre İzolasyonuna Alınmayan Toplam Transformant Havuzu

E.R Sinyal: Büyüme Hormonu Proteini E. R 'a Yönlendirme Sinyal Peptid Dizisi

Cut Öf: Moleküler Büyüklük Sınır Değeri (Filtrasyon Kolonu için)

Ni-NTA: Nikel-Nitrilotriasetik asit

1. GİRİŞ

Model organizma olan *Tetrahymena thermophila*, ortalama 50 µm x 20 µm boyutlara sahip 18-40°C gibi çok geniş bir sıcaklık aralığında tatlı sularda yaşayan ökaryotik bir organizmadır [1]. Basit ve ucuz kültürizasyonu, 2-4 saat süreli kısa bölünme zamanı, tamamlanmış makroçekirdek DNA dizi bilgisi ile transkriptom bilgisi günümüzde *T. thermophila*'yı biyolojik ve biyoteknolojik araştırmalarda yaygın kullanılan bir model organizmaya dönüştürmüştür [2-4]. *Tetrahymena*'nın sitoplazmasında metabolik (somatik) görevleri üstlenmiş bir makroçekirdek ile eşeysel üreme esnasında kalıtsal materyali sağlama görevine sahip bir de mikroçekirdek bulunmaktadır. Makroçekirdek 10.000 kopya sayısına ulaşan rDNA ile 45 kopya sayılı somatik sentromersiz mini kromozomlardan oluşurken, mikroçekirdek telomer ve sentromerli 2n=10 adet tek kopyalı kromozomlardan meydana gelmektedir [5]. Bilim dünyasında ilk defa, *T. thermophila* kullanılarak telomer [6, 7], telomeraz, [8] ribozimler [9], dinein motor proteinleri [10] ve histon asetiltransferazın transkripsiyondaki rolünün keşfi [11] gerçekleştirilerek organizmanın önemi ortaya çıkmıştır.

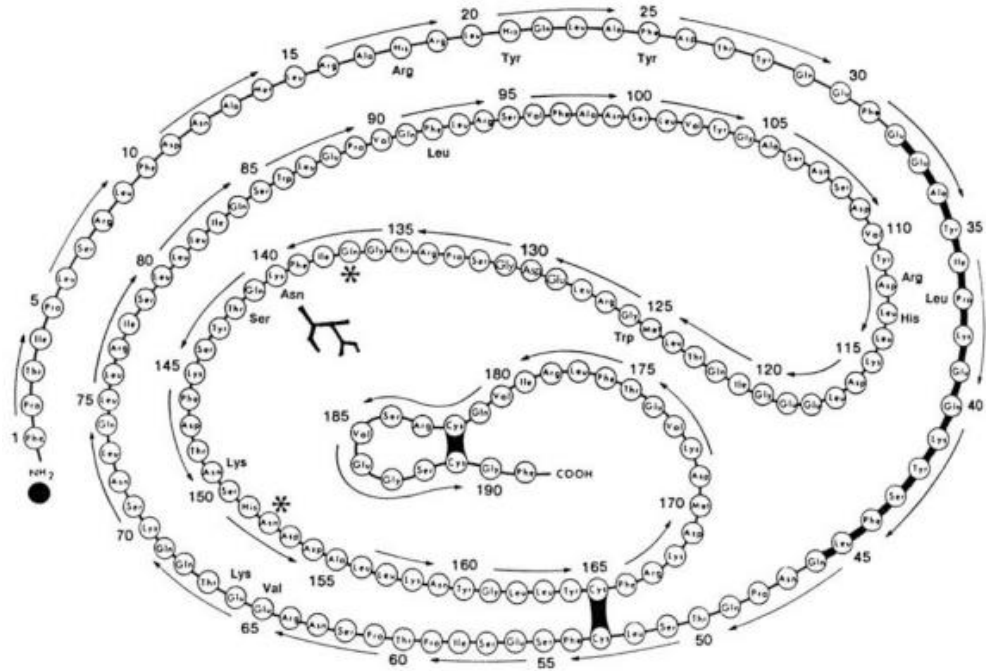
T. thermophila'nın rekombinant proteinlerin üretiminde konakçı olarak kullanılabileceği, 1999 yılında silli bir parazit olan *Ichthyophthirius multifiliis* organizmasının i-antijen proteini ile 2002 yılında filogenetik olarak yakın türlerinden biri olan Malarya paraziti *Plasmodium falciparum*' un sirkumsporozoit (CS) proteinlerinin üretimi yoluyla ilk defa gösterilmiştir [12-14]. Bu organizmada, farklı rekombinant proteinlerin üretiminin gerçekleştirilmesi, insan proteinlerinin de *Tetrahymena*' da üretilbileceği fikrini oluşturmuş ve 2006 yılında ilk kez bir insan proteini olan DNazI enzimi *T. thermophila* PLA1 (Fosfolipaz A1) hücre dışı salgılama sinyal dizisi ile aktif formda üretilerek, hücre dışına salgılatılması gerçekleştirilmiştir [15]. 2011 yılında ise, insan alkalik fosfatase enzimi rDNA orijinli bir vektör olan pH4T2 kullanılarak *Tetrahymena* 'da rekombinant üretilmiştir [16]. Bu üretim sırasında İnsan alkalik fosfatase enziminin sinyal dizisi, *T. thermophila* tarafından tanınmış ve transle edilmekte olan protein endoplazmik retikuluma yönlendirilip translasyonu gerçekleştirilerek sinyal peptidi kesilmiş ve proteine ait GPI çapa dizisi ile rekombinant protein hücre yüzeyine glikolizasyonlu yapıda lokalize edilmiştir. Bu çalışmalar, *T. thermophila*'nın insan proteinine ait sinyal dizilerini tanıyıp işleyebilme ve olgun proteini hücre dışına sentezleyebilme kapasitesini ilk defa ortaya koymuştur. *T. thermophila*'nın hücre içinde ve dışında protein kesimleri yapabilen birçok proteaz/peptidaz enzim bulundurması [17],

organizmanın farklı insan proteinlerine ait sinyal dizilerini tanıyıp işleme özelliğine de sahip olduğunu göstermektedir.

Rekombinant üretim konakçısı olan *T. thermophila* 'da üretime aday olabilecek birçok insan proteini literatürde bulunmakta olup öne çıkan gruplardan birisi büyüme hormonu gibi üyelere sahip peptid hormon terapötikleridir. 1930 yılında keşfedilmiş insan büyüme hormonu (hGH, Somatropin) 17. Kromozomunun 24.2 pozisyonunda yer almaktadır [19, 20]. Yapısal olarak tek zincirli bir 191 aminoasitten oluşan polipeptid molekülü olup 22 kDa moleküler ağırlığa sahiptir. İnsanda hipofizin bezinin ön lobunda Somatrop adı verilen hücrelerden salgılanmaktadır [21, 22]. İnsan büyüme hormonunun görevleri; vücutta somatik büyümeyi, hücrelerin büyümesini ile uzamasını, eşeysel özelliklerin kontrolünü, IGF-1'in üretimini, nitrojen alımını ve bağışıklık sisteminin uyarılmasını, sodyum alımını, yağ yıkımını, aminoasit sentezinin artışı, kaslara aminoasit taşınmasını sağlama ve kemik-kan metabolizması ile deri elastikliği gibi olayların düzenlenmesi olarak sıralanmaktadır [20, 23]. Büyüme hormonu, belirtilen bu etkileri direk yolla büyüme hormonu reseptörlerine bağlanarak veya dolaylı yolla insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi moleküller ile etkileşerek gerçekleştirmektedir [22]. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) veri tabanına göre insanda 25 adet kalıtsal büyüme hormonu kaynaklı hastalık bulunmakta olup özellikle TiplA, TiplB, Kowarski Sendromu gibi hastalıklarda dışardan büyüme hormonu takviyesi alınması gerekmektedir. Ayrıca, gelişim bozukluğu olan çocuklarda gelişim düzenleyicisi, Turner Sendromu ve böbrek yetmezliği yaşayan kişilerde destekleyici ve AIDS hastalarında ise direnç artırıcı olarak dışarıdan rekombinant büyüme hormonu takviyesi yapılmaktadır [23-25].

İnsan büyüme hormonuna ait protein dizisi Uniprot veri tabanında P01241.1 protein erişim numarası ile bulunmaktadır. Protein toplamda 217 aminoasitten oluşmakta olup 3 boyutlu yapısında 4 adet heliks katlanma bölgesi yer almaktadır [26]. Bir adet hGH molekülü ise 2 adet büyüme hormonu reseptör molekülüne aynı anda bağlanmaktadır. Bir salgı proteini olan bu hormonun aktif yapısının oluşturulması ve reseptörüne bağlanabilmesi için hücre içerisinde post-translasyonel modifikasyonlarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Özellikle, glikolizasyon, fosforilasyon ve deaminidasyona uğramış varyantların insanda dolaşıma katıldığı ve bu modifikasyonların proteinin etkileşimini sağlaması için gerekli olduğu bildirilmiştir [27]. Bu modifikasyonlar içerisinde N-terminalde meydana gelen glikolizasyonun, proteinin kararlı halde kalmasını sağlayarak, dolaşımdaki yarı ömrünü doğrudan etkilediği bildirilmiştir [28, 29]. Post-translasyonel modifikasyonların sağlanabilmesi için proteinin

hücre içerisinde E. R'lere yönlendirilmesi gerekmektedir. Bundan dolayı proteinin aminoasit dizisinde ilk 26 aminoasitlik kısmı (dizi: MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSA) endoplazmik retikuluma özgü sinyal dizisi olup protein E. R'a yönlendirildikten sonra Ala-X-Ala motifi üzerinden sinyal peptidaz-I enzim kompleksi ile tanınarak kesilip uzaklaştırılmaktadır [30]. Geriye kalan 191 aminoasitlik dizi, tek zincirli büyüme hormonu proteinini meydana getirmektedir [31]. Büyüme hormonunun moleküler yapısında katlanmayı sağlayan 2 disülfid bağı, Cys-53 ile Cys-165 ve Cys-182 ile Cys-189 pozisyonundaki sistein aminoasitleri arasında oluşturulmaktadır (Şekil 1.1) [33]. Bu iki disülfid bağından özellikle C-terminaldeki disülfid bağının oluşturulamadığı durumda molekülün kararlılığı ve reseptöre bağlanma ilgisinin azaldığı bildirilmiştir [32].



Şekil 1.1. İnsan Büyüme Hormonu Moleküler Yapısı [21]

Büyüme hormonunun üretiminde kullanılan bakteriyel üretim konakçılarının disülfid bağı oluşturmama ile glikolizasyonu gerçekleştirilememesi sorunu bulunmakta olup maya ekspresyon sistemlerinin ise disülfid bağı oluşturabilmelerine karşılık, aşırı-glikolizasyon yapımlarından dolayı rekombinant protein üretimi açısından problemler ortaya çıkmaktadır. *T. thermophila* bu iki tek hücreli organizmaya göre disülfid bağlarını oluşturabilme ve insanda görülen glikolizasyon profillerine yakın bir glikolizasyon çatalı eklemesiyle, insan proteinlerinin rekombinant üretimi için avantajlı bir konumdadır [15, 32]. Bunlara ilave olarak, *T. thermophila*'nın insana ait proteinlerin E.R yönlendirme

sinyal dizilerini tanıyabilme-işlemeyebilme olasılığı, olgun proteini hücre dışına salgılayabilme kapasitesi [16], hücre içinde ve dışında protein kesimleri yapabilen proteaz/peptidaz enzimlerine sahip olması [17], *T. thermophila*'nın rekombinant insan proteinlerinin üretimi için uygun bir konakçı olduğunu göstermektedir.

Belirtilen literatür bilgisinden yola çıkarak, bu tez çalışmasının hipotezini *T. thermophila*'nın insan büyüme hormonunun (hGH) translasyonu esnasında E.R sinyali dizisini tanıyıp translasyon kompleksini E.R.' a yönlendirebileceği ve proteinin translasyonu sonrası proteini hücre dışına salgılayabileceği oluşturmaktadır.

1.1. Amaç

Tez çalışmasının amacı, *Tetrahymena thermophila*'nın protein üretme ve salgılatma sisteminin insan terapötik proteini olan büyüme hormonunun (Somatropin, hGH) E.R sinyali peptid dizisini tanıması, E.R.' a yönlendirilmesi ile rekombinant protein üretimi sonrası dışarı salgılanma kapasitesinin araştırılmasıdır. Bu amaca ulaşılması durumunda *T. thermophila*'nın terapötik protein üretim kapasitesi insan büyüme hormonu açısından tanımlanmış olacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan İrklar ve Kültürizasyon Aşamaları

Rekombinant protein üretim deneyleri için, Cornell Üniversitesi Tetrahymena Stok merkezinden temin edilen CU428 (Vejetatif transformasyon ve protein üretim çalışmalarında) ve CU427 (CU427 x CU428 ırklarının çaprazlamasıyla konjugatif transformasyon ve protein üretim çalışmalarında) kodlu ırkları kullanılmıştır. Kültür işlemleri, antibiyotik takviyesi yapılmış modifiye NEFF' s ve SPP besiyerlerinde yoğunluğa göre 24-48 saat süre ile 30 °C sıcaklıkta çalkalamalı flask/petri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (60-80 x 10⁴ ml/hücre, stok kültürün canlılık durumuna göre gece boyu inkübasyon sonrası yeterli sayıya ulaşılmaktadır) (EK-1) [1].

Rekombinant üretim için gerekli gen ekspresyon kaseti ve DNA vektörlerinin klonlama aşamalarında; *E. coli* XL1-Blue ve *E. coli* DH5α klonlama konakçıları kullanılmıştır. Her iki kompetent ırkta transformasyon ısı şoku yöntemi (EK-2) ile gerçekleştirilmiş ve kültürizasyon işlemleri maksimum 12-16 saat süre ile 37 °C sıcaklıkta LB Broth besiyerinde çalkalamalı olarak yapılmıştır (EK-3). Transformasyon sonrası transformant seçilimi 1X Ampisilinli LB Agar tabaklarında gerçekleştirilmiştir.

2.2. Büyüme Hormonu Rekombinant Üretim Dizisi Tasarımı ve Vektörlerin Oluşturulması

2.2.1. Sentetik hGH dizisinin tasarımı ve kodon uyumu

Çalışmanın amaç kısmında belirtilen hipotezleri sınamak ve hedef proteinin rekombinant üretimini *T. thermophila*' da gerçekleştirebilmek için ilk aşama olarak İnsan Büyüme hormonunu kodlayan DNA dizisinin (Erişim numarası: CAA23779.1, Uniprot: P01241) *T. thermophila* kodon kullanım sözlüğüne adaptasyonu gerçekleştirilmiştir. *T. thermophila*'nın genom yapısının A-T zengini dizilerden oluşması, G-C zengini insan dizilerine göre stop kodonu olarak TGA'yı tercih etmesi ve kodon kullanım tablosunda translasyon açısından nadir kodonlar içermesi sebebiyle insana ait hGH DNA dizisi üzerinde optimizasyon gerçekleştirilmesi gerekmektedir [34, 35]. Buna göre, *T. thermophila* kodon kullanım tablosundan yararlanılarak aynı aminoasidi kodlayan

kodonlar içinde yüksek kullanım frekansına sahip kodonlar belirlenmiş, frekansı benzer olup tRNA kopya sayısı farklı olan kodonlarda ise yüksek kopya sayısına sahip kodonlar seçilerek DNA dizisinde değişiklikler gerçekleştirilmiştir [34]. Kodon optimizasyonu yapılan hGH gen dizisine ek olarak farklı çalışmalarda kullanılmak üzere N-terminal 10xHistidin takısı (30 bç), Enterokinaz kesim bölgesi (15 bç, Light Chain Enterokinase tanıma dizisi Asp-Asp-Asp-Asp-Lys için *T. thermophila* uyumlu kodon optimize dizi: GACGACGACGACAAA), 2xTGA stop kodonu ve klonlamada kullanılacak MscI ve FseI restriksiyon kesim bölgeleri dâhil edilerek dizi sentetik olarak ürettirilmiştir (ShineGene Biyoteknoloji, Çin).

2.2.2. hGH rekombinant üretim DNA dizisinin oluşturulması

Çalışmada kullanılacak pNeo4 [37] ve pIGF-1 [52] vektörlerine klonlanacak rekombinant dizilerin oluşturulabilmesi için sentetik dizide mutasyonlar gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT vektörüne klonlanan sentetik dizide (EK-6) yer alan ve çalışmada öngörülen hipotezin sınanmasını (hGH E.R dizisinin tanınmasını ve işlenmesini) zorlaştırabileceği düşünüldüğünden, N-terminal 10X Histidin takısı, Enterokinaz kesim bölgesi ve vektörden gelen PLA sinyal dizisinin çıkarıldıktan sonra afinitik takının hGH geninin C-terminalinde pozisyonlandırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu yolla, N-terminal yapılarının sinyal dizisinin tanınması ve işlenmesinde yaratabileceği problemlerin ve sinyal işlenmesi sonrası N-terminal 10X Histidin takısının kaybedilme ve N-terminal afinite takısı ile ilgili olası problemlerinin önüne geçilmesi hedeflenmiştir [36]. Belirtilen mutasyonları gerçekleştirebilmek için Ek-7 ve Ek-36' da yer alan primer çiftleri kullanılarak 10xHistidin, Enterokinaz ve PLA1 dizisi çıkarılmış ve RGH6xHistidin geri primeri yardımı ile 6xHistidin C-terminal takısı eklenerek insan büyüme hormonu rekombinant protein üretim DNA dizisi elde edilmiştir (EK-8, 9 ve 10).

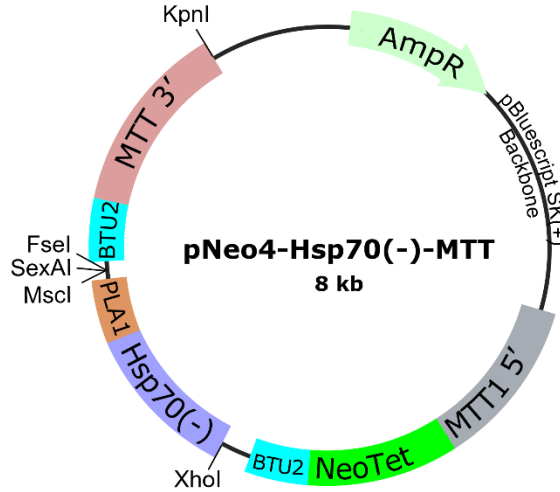
2.2.3. Genom entegrasyon vektörlerinin yapılandırılması

Örtüşen primer çiftleri ile tekrar yapılandırılan hGH rekombinant üretim dizisi, MscI ve FseI restriksiyon bölgeleri kullanılarak *T. thermophila* pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT genom entegrasyonu vektörüne klonlanmıştır (EK-35). pNeo4-Hsp70.2-MTT vektörü literatürde bilinen pNeo4 vektörü üzerine farklı elementlerin dahil edildiği bir varyantıdır

(Şekil 2.1). pNeo4 vektörü, doğal yapısında, *Tetrahymena thermophila*' da antibiyotik baskısı yoluyla fenotipik seçilim sağlayabilme ve pozitif transformant elde etmeye imkân veren ve *T. thermophila*'nın hayatta kalmasını çok güçlü olarak engelleyen antibiyotik olan Paramomisin' i parçalayan enzimi kodlayan kodon optimize Neomisin4 geni içermektedir [37]. Neomisin4 geninin transkripsiyon kontrolü ise ağır metal toksisitesi ile indüklenebilen *T. thermophila* MTT1 (Metalotionin-1) geninin promotörü ile sağlanmaktadır [38]. Vektörün diğer kısımları pBluescript omurgasını içermekte olup *E. coli* transformasyonunda gerekli Ampisilin direnç kaseti ve *E. coli* replikasyon orijini yer almaktadır.

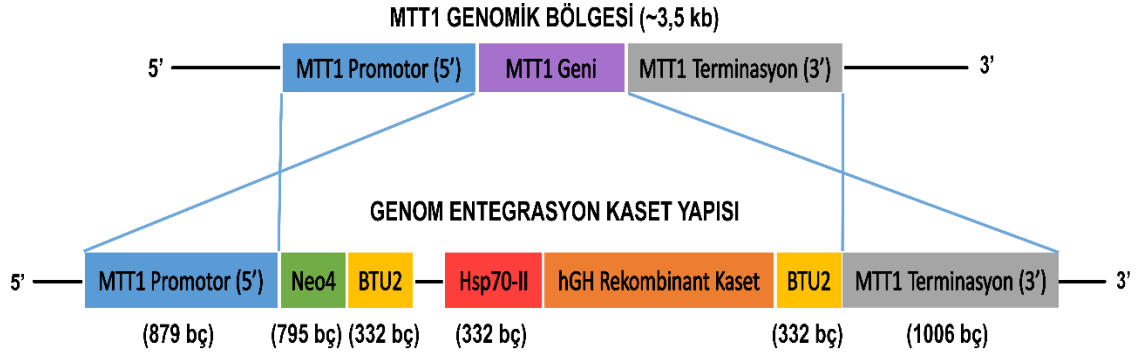
Çalışmada kullanılan pNeo4 vektörü, laboratuvar çalışmaları kapsamında sonradan eklenmiş diziler içermekte olup bu vektör modifiye pNeo4 vektörü olarak adlandırılmaktadır. Vektöre sonradan eklenmiş yapılardan ilki *T. thermophila* HSP70.2 (Heat Shock-Isı Şoku) geni promotörüdür. Bu promotör, *T. thermophila* stres gen grubuna ait 70 kDa'lık Hsp70.2 geninin (TTHERM: 00125640) promotörü olup 38 °C' de (*T. thermophila*' da stres meydana getiren sıcaklık derecesi) ısı şoku şartlarında ekspresyon seviyesi, benzer promotörler arasında (Hsp70 II, III, IV, V) en yüksek olduğu görülmüş ve ısı şoku yolu ile protein üretiminde kullanılabilirliği GFP (Yeşil Floresan Proteini) proteini üretimiyle literatürde sınanmış bir promotördür [39-40]. Promotorun DNA dizisi, promotörü literatüre kazandıran araştırmacılardan temin edilmiş olup, dizi içerisinde 820 bazlık doğal DNA promotör dizisine ek olarak ATG kodunu ile başlayan Hsp70.2 geninin 5' bölgesinden 36 bazlık kısım yer almaktadır (EK-33). Isı şoku genlerinin stres bağımlı genler olduğu göz önüne alınarak belirtilen parçanın hipotetik olarak IRES (İnternal Ribozom Entry Site – Ribozom İç Bölgesine Yönlendirme Dizisi) dizisi olarak görev aldığı düşünülmektedir [47-51]. ATG içeren bu parçanın transkripsiyon açısından açık okuma bölgesi (ORF) oluşturması sebebiyle, ATG den sonra gelen 33 nükleotidlik dizinin (Translasyon dizisi: MSGKQKAEGIGI) translasyona katılacağı düşünülerek promotör dizisinde değişiklik yapılmıştır. Buna göre, promotörün belirtilen 36 bazlık ATG'li parçanın çıkarıldığı formu oluşturularak Hsp70.2(minus)/ (-) promotörü olarak adlandırılmıştır. Doğal 820+36 bazlık promotör dizisi ise Hsp70.2(plus)/ (+) şeklinde isimlendirilmiş ve her iki promotör ayrı ayrı pNeo4 vektörlerine laboratuvarımızca entegre edilmiştir. Promotor bölgesinin ardından, vektör üzerinde farklı rekombinant proteinlerin hücre dışı salgılanma kapasitesini oluşturabilmek için *T. thermophila* Fosfolipaz-I enzimi E.R sinyal peptid dizisi (24 aminoasitlik Sinyal + 12 aminoasitlik Spacer dizi) (Erişim No: AJ508393) yer almaktadır (EK-34). PLA1 dizisi, literatürde İnsan DNaz-II enziminin *T. thermophila*' da rekombinant üretimi deneylerinde rekombinant proteinin hücre dışına salgılanmasını sağlayan E.R sinyal dizisidir [15].

PLA1 dizisi genom entegrasyon sisteminde doğrudan kullanılmayacağı için klonlama sırasında vektörden çıkarılmış olup aynı dizi konjugatif pIGF vektör sisteminde kontrol grubu E.R sinyal dizisi olarak kullanılmıştır. PLA1 sinyal dizisini takiben vektörün çoklu klonlama bölgesini oluşturan MscI, SexAI ve FseI restriksiyon kesim bölgeleri yer almaktadır. Rekombinant sistemde transkripsiyonel terminasyonu sağlamak için pNeo4 vektöründeki Neomisin direnç kasetinde de bulunan BTU2 terminasyon dizisi ise vektörün klonlama bölgesinin 3' ucuna yerleştirilmiş durumdadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Modifiye pNeo4-MTT-Hsp70.2 Genom Entegrasyon Vektörü. Hsp70.2(minus) promotörü, PLA1 sinyal Dizisi, klonlama bölgesi ve BTU2 terminasyonu içermektedir.

Lineer formdaki pNeo4 vektörünün *T. thermophila*' ya biyolistik silah yöntemi ile transformasyonunda, rekombinant kasetin entegre olacağı genom bölgesi olarak makro çekirdekte 45 kopya halinde yer alan MTT1 gen bölgesi seçilmiştir [38]. Belirtilen MTT1 lokusunun 5' ve 3' UTR (Translasyona katılmayan bölge) kısımlarında rekombinant kaset ve genomik bölge arasında benzerliği sağlayarak homolog rekombinasyonla genom entegrasyonu gerçekleştirebilmek için, MTT1 geninin 5' promotor dizisi ve 3' MTT1 Transkripsiyon Terminasyon bölgesinin (UTR) yaklaşık 1000' er bazlık parçalarının vektör üzerinde yer alması gerekmektedir [37, 38] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. MTT1 Genomik DNA Lokusunda Homolog Rekombinasyon Yoluyla Genom Entegrasyonunun Sağlanması

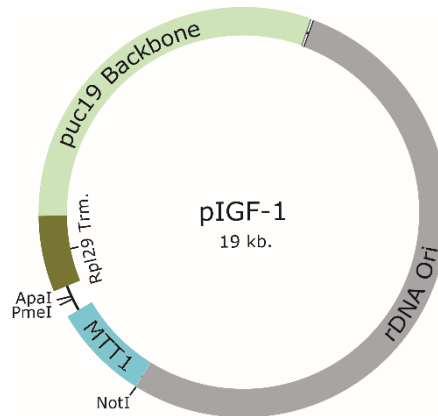
Belirtilen homoloji kollar için, 5' UTR kısmı olarak MTT1 promotor bölgesi seçilmiş olup promotor pNeo4 vektörünün Neo4 kasetinde 768 bazlık MTT1 promotoru şeklinde yer almaktadır (768 bazlık dizi homoloji için yeterli gelmektedir). 3' bölgesi için, MTT1 geninin terminasyon dizisine ait 1000 bazlık dizi, 3' UTR homoloji kolu olarak laboratuvarımızca vektör omurgasına yerleştirilip teyit edilmiştir.

Modifiye pNeo4-MTT-Hsp70.2(minus/plus) vektörlerinin oluşturulması aşamasında, vektörün doğal yapısı üzerinde bulunmayan MTT1 3' terminasyon (homoloji) dizisi, Hsp70.2(-) promotor dizisi, PLA1 dizisi, çoklu klonlama bölgesi ve BTU2 terminasyon dizilerinin eklenmesi ve teyit aşamaları, laboratuvarımız Doktora öğrencileri A. Fulya ÜSTÜNTANIR DEDE ve Murat KAYA tarafından gerçekleştirilmiştir. Hsp70.2(minus) promotorundan çıkarılan IRES dizisinin promotora geri eklenerek pNeo4-MTT-Hsp70.2(+) vektörünün oluşturulma aşamaları Doktora Öğrencisi Nurçin Küçükoglu tarafından tamamlanmıştır. Her iki vektör, MTT1 lokusunda gerçekleşen homolog rekombinasyonla rekombinant kasetin makroçekirdek genomuna entegrasyonunu sağlamak üzere doğrusal formda *T. thermophila* biyolistik transformasyonunda kullanılmıştır.

6xHistidin takısı içeren rekombinant üretim dizisi pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT vektörüne XhoI/FseI enzimleri ile, pNeo4-Hsp70.2(plus)-MTT vektörüne MscI FseI restriksiyon enzim bölgeleri ile yönlendirilmiş klonlama yoluyla yerleştirilmiştir. Transforme edilen genom entegrasyon vektörlerindeki antibiyotik direnç kaseti (Neomisin4) üzerinden fenotipik seçim (Fenotipic Assorment) yoluyla *T. thermophila* makro çekirdeğinde yer alan 45 kopya MTT1 lokusunun rekombinant hGH ifade kasetiyle yer değiştirmesi sağlanmıştır [41-43].

2.2.4. Konjugatif rekombinant üretim sistemi için rekombinant dizilerin yapılandırılması

Vejetatif transformasyona alternatif olarak, yüksek kopya sayılı vektör sistemi üzerinden hGH rekombinant üretiminin sınanması amacıyla *T. thermophila* konjugatif vektör sistemi (pIGF-1 vektörü) çalışmaya dahil edilmiştir. *T. thermophila*' da konjugatif üretim için yaygın olarak rDNA orjinli vektörler kullanılmaktadır. Bu vektörlerin kullanıldığı transformasyon aşaması *T. thermophila*'nın stres biyolojisine özgü ortaya çıkan ve 2 farklı hücre tipi arasında gerçekleşen konjugasyon evresinin yeni MAC oluşum zaman diliminde (7.5' inci saatten itibaren) biyolistik silah veya elektroporasyon yöntemi ile gerçekleştirilmektedir [44]. Bu biyolojiye özgü olarak vektör üzerindeki rDNA orijini yaklaşık 10.000 kopyaya ulaşmakta ve rekombinant proteinin genom entegrasyon sistemine göre daha güçlü üretimi mümkün olmaktadır [52]. Bu çalışma temelinde 45 kopyalı sisteme alternatif olarak rDNA orjinli vektör olan pIGF vektörü tercih edilmiştir. Bu vektör üzerindeki *T. thermophila* 17s rDNA geni hücrelere doğal yolla Paramomisin direnci kazandıran bir mutasyona sahiptir [45]. Normal şartlarda Paramomisin' e dayanıksız olan CU427 & CU428 gibi *T. thermophila* ırkları, transformasyon sonrası vektör üzerindeki mutasyonlu orijin yardımıyla antibiyotiğe dayanıklı hale gelmekte ve Paramomisin baskısında pozitif transformantların seçilimi sağlanmaktadır [37]. Vektör üzerinde rekombinant üretim için indüklenebilir promotor olarak MTT promotoru bulunmakta ve pNeo4 vektöründeki Neomisin direnç kasetinde olduğu gibi Kadmiyum gibi ağır metaller ile indüklenebilmektedir. Vektörde çoklu klonlama bölgesinde PmeI ve ApaI restriksiyon kesim dizileri yer almaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. pIGF Vektörünün Yapısı ve Klonlama Bölgeleri. MTT1 promotoru önünde PmeI/ApaI klonlama bölgesi yer almaktadır.

rDNA orjinli pIGF-1 vektörlerine PmeI/ApaI klonlaması ile yerleştirilecek rekombinant diziler için; rekombinant hGH üretim dizisinin Hsp70.2 promotoru olmaksızın pIGF' ye ait MTT1 promotorunun önüne yerleştirilmesi için FSinyal-PmeI ve RHGH-ApaI primerleri (EK-36) yardımıyla PmeI-ApaI restriksiyon dizileri eklenmiş ve ER Sinyal-HGH-6xHistidin dizisi klonlamaya hazır hale getirilmiştir. Alternatif olarak, hGH E.R sinyal dizisi yerine PLA1 dizisi kullanabilmek için, FpIGF-PLA1, RHGH-ApaI primerleri ve örtüşen primer çifti RPLA1+hGH ile FPLA1+hGH (EK-36) yardımıyla hGH sinyal dizisi çıkarılmış ve yerine PLA1 dizisi eklenerek aynı PmeI-ApaI restriksiyon bölgeleri içeren PLA1-hGH-6xHistidin dizisi oluşturulmuştur (EK-12). Elde edilen her iki rekombinant üretim dizisinin PmeI-ApaI klonlaması ile pIGF-1 vektörlerine ligasyonları tamamlanarak pIGF-ERSinyal-hGH ve pIGF-PLA-hGH vektörleri oluşturulmuş ve konjugatif transformasyona hazır hale getirilmiştir.

2.3. Rekombinant Vektörlerin *T. thermophila* Hücrelerine Transformasyonu ve Pozitif Transformantların Seçilimi

İnsan büyüme hormonu E.R Sinyal-HGH-6xHistidin dizisini içeren pNeo4-Hsp70.2(minus ve plus)-hGH-MTT genom entegrasyonu vektörleri, vejetatif evredeki CU428 hücrelerine toplam 2µg olacak şekilde biyolistik silah kullanılarak transforme edilmiştir (EK-16). Transformasyon sonrası, toplam transformant hücre grubuna (Bulk), 1/10 dilüsyon uygulanmıştır. Elde edilen her bir transformant grubu 1' er gün ara ile taze besiyerine aktararak 100-300-600 ve 1000 µg/ml' ye ulaşacak şekilde Paramomisin antibiyotiği ile baskılanmış ve pozitif transformantların seçilimi sağlanmıştır. Pozitif transformantların Paramomisin baskısına dayanabilmesi için gerekli olan Neomisin geninin ifadesi için, pNeo4 vektörü üzerindeki MTT promotoru 1 µg/ml final konsantrasyonda CdCl₂ ile indüklenmiştir.

hGH E.R Sinyal-HGH-6xHistidin / PLA1-HGH-6xHistidin kasetlerini içeren rDNA orjinli konjugatif pIGF vektörlerinin transformasyonu CU427 – CU428 ırklarının birlikte konjugasyona başladığı zamanın ilk 7.5 'inci saatinden itibaren konjugatif transformasyon protokolü esas alınarak biyolistik silah yardımı ile gerçekleştirilmiş ve her bir konjugatif vektörden toplam 2 µg aktarılmıştır (EK-17) [44, 46]. Elde edilen transformantlardan tek hücre grubu seçilmeksizin tüm hücreler (Bulk) 300 µg/ml' ye kadar Paramomisin antibiyotik baskısında tutulmuş ve 4.günün sonunda canlı kalan hücreler pozitif transformant olarak belirlenmiştir. Vejetatif ve konjugatif

transformasyonlardan sonra antibiyotik stresinde hayatta kalan gruplar protein deneylerinde kullanılmak üzere cam tüp besiyeri ortamına alınarak 200 µg/ml sabit Paramomisin baskısında periyodik olarak pasajlanarak canlı şekilde muhafaza edilmiş ve hücrelerden sıvı nitrojen stoğu yapılmıştır [1].

2.4. Transformant Hücrelerin İndüklenme Aşamaları

Vejetatif hücrelere transforme edilen pNeo4 vektörlerindeki Hsp70.2 promotorlarının (plus/minus) indüklenmesi için hücreler Hsp70.2 promotorunun ekspresyon seviyesinin maksimuma ulaştığı 38 °C' de tutularak ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Isı şokunu sağlayabilmek için normal inkübasyon sıcaklığındaki transformant hücreler santrifüjlendikten sonra 38 °C' de ısıtılmış besiyeri üzerlerine ilave edilerek çalkalamasız olarak inkübe edilmiş ve Hsp70.2 promotorunun indüklenmesi sağlanmıştır (EK-18). İndükleme zamanı ve örnek alma deneye bağlı olarak 0, 3, 6 ve 12 saat sürelerinde gerçekleştirilmiştir. Hsp70.2(minus ve plus) promotorlu transformantlarda IRES bağımlılığını minimize etmek için aynı ısı şoku ile indüklenme aşamasından sonra hücreler normal inkübasyon sıcaklığına alınıp 6 saat süreyle çalkalamalı olarak inkübasyona devam edilmiş ve hücre takibi ve örnek alımı gerçekleştirilmiştir [40] (EK-19).

Rekombinant hGH üretim dizilerini içeren pIGF vektörlerinde yer alan MTT1 promotorunun indüklenmesi için hücre besiyeri ortamına 2 µg/ml final konsantrasyonda CdCl₂ (Kadmiyum Klorür) eklenmiş ve deneye bağlı olarak 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle indüklenme gerçekleştirilmiştir (EK-20). İndüklemeyi takiben RNA, DNA ve Protein çalışmalarında kullanılmak üzere her bir indüklenmiş transformant hücre grubundan deneysel saatlere karşılık (6, 12, 24 ve 48 saat) hücre örnekleri toplanmıştır.

2.5. Transformant Hücrelerde Genomik DNA Analizleri

İnsan büyüme hormonu üretim dizili vektörlerin transforme edildiği her bir transformant grubunda transformasyonun başarılı olup olmadığını teyit etmek, hGH rekombinant dizi içeren pNeo4 vektörlerinin genom entegrasyonunu sınamak ve pIGF rDNA orjinli halkasal vektörlerin hücre içerisinde var olup olmadığını kontrol etmek için, transformant hücrelerde toplam genomik DNA üzerinden PZR analizleri

gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu yapılan her bir transformant hücre grubundan (200 µl inokülasyon / 50 ml, 200 µg Paramomisin ile birlikte gece boyu inkübasyon) 2' şer ml hücre alınarak Genomik DNA İzolasyon Kiti (Wizard A1120 kit, Promega) kullanılarak toplam genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (EK-21). Elde edilen genomik DNA havuzu üzerinden spesifik primerler (pNeo4'lü transformantlarda FNeomisin/ RGHkontrol, pIGF'li Transformantlarda ise klonlama primerleri olan FGHsinyal-PmeI ve RHGH-ApaI ile FPLA-pIGF ile RHGH-ApaI) kullanılarak ile rekombinant DNA'nın transformant hücrelerdeki varlığı PZR temelli kontrol edilmiştir (EK-36).

2.6. İndüklenmiş Transformantlarda cDNA Analizleri

Seçilimi tamamlanmış transformant hücrelerde hedef proteinin üretilmesi için gerçekleştirilen indüklemeye aşamasına bağlı olarak, promotor kontrolündeki rekombinant kaset üzerinden hedef rekombinant proteine ait mRNA'nın ifadesini PZR temelli sınavabilmek için, rekombinant pNeo4 ve pIGF vektörlerini içeren indüklenmiş transformantlar ve transforme edilmemiş negatif kontrol hücrelerinden (CU427 & CU428) ticari RNA izolasyon kiti (Macherey Nagel – 740955) yardımıyla toplam RNA izole edilmiştir (EK-22). Elde edilen bu toplam RNA havuzundan dT18 primerleri ve ticari Reverse Transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA havuzu oluşturulmuş (RevertAid cDNA Kit- K1621) (EK-23) ve bu cDNA havuzu üzerinden spesifik gen primerleri (EK-36) kullanılarak PZR temelli mRNA analizleri ile indüklemeye bağlı transkripsiyonel ifade kontrol edilmiştir.

2.7. Pozitif Transformantlarda Protein Analizleri

Rekombinant dizileri içeren pNeo4 ve pIGF vektörleriyle transforme edilmiş pozitif transformant *T. thermophila* hücre gruplarında hedef proteinin rekombinant üretimine dair protein seviyesinde analiz yapabilmek için indüklenmiş ve DNA/RNA analizleri tamamlanan hücrelerden SDS-PAGE ve Western Blot analizleri gerçekleştirilmiştir. Genom entegrasyon sistemli pNeo4 vektörlerini içeren ve ısı şoku ile indüklenen transformantlarda indüklemeye işlemi boyunca her bir hücre grubundan indüklemeye saatine göre eşit miktarda hücre peleti ve 15 ml olacak şekilde dış ortam besiyeri toplanmıştır. Elde edilen hücrelerden T100B izolasyon tamponu kullanılarak toplam

çözünür proteinler elde edilmiştir (EK-24). Elde edilen çözünür proteinlerin bir kısmına 2x SDS boyası eklendikten sonra 10 dakika kaynatılmış ve yüklemeye hazır hale getirilmiştir. Geri kalan toplam çözünür protein örneklerine Ni-NTA boncukları (EK-25) veya hazır Ni-NTA kolon sistemi kullanılarak native şartlarda afinitik saflaştırma işlemleri uygulanmıştır (EK-26). T100B tamponu ile protein izolasyonunda çözünmeyen pelet örnekleri 2x SDS yükleme boyası ile muamele edilerek kaynatıldıktan sonra aliquat edilmiş, 15 ml dış ortam örnekleri ise 10 kDa büyüklük sınırına sahip ultrafiltrasyon tüpleri (Millipore 10 kDa Ultrafiltrasyon Tüpü- UFC901024) ile konsantre edildikten sonra (EK-27), 2x SDS yükleme boyası ile karıştırılıp 95 derecede 10 dakika inkübe edilmiş ve elde edilen tüm örnekler SDS-PAGE ve Western Blot analizlerinde kullanılmıştır

rDNA orjinli pIGF vektörlerini içeren pozitif transformantlarda CdCl_2 indüklemesi sonrası her bir deney saati için (12, 24 ve 48 saat) toplanan hücreler 30.000 hücre / 10 μ l 2x SDS yükleme boyası olacak şekilde çözüldükten sonra tüm örnekler 10 dakika süreyle 95°C' de kaynatılmış ve hücre içi toplam proteinleri temsil etmek üzere protein analizlerinde kullanılmıştır. Dış ortam örnekleri EK-27' deki protokol takip edile edilerek 15 ml üzerinden konsantre edilmiş ve analizlerde kullanılmıştır.

Proteinlerin ayrımı için Bisakrilamid oranı %5 ve 12 (v/v) olan Tris-Glisin jelleri kullanılmış olup tüm örnekler farklı deneysel kompozisyonlar halinde SDS-PAGE jellerine eşit hacimde yüklenerek her bir deney için 2 eş SDS-PAGE jeli koşturulmuştur. Yürütme işlemi SDS-PAGE yürütme tamponu içeren Biorad Mini Protean cihazında 40V (paketleme) / 80V (ayırma) sabit voltaj yükü altında gerçekleştirilmiştir (EK-28). Yürütme sonrası, her grup için jelin biri Comassie Blue solüsyonu ile 1 saat boyanarak görüntülenmiş, diğeri ise blotlama aşamasına alınmıştır.

Örneklerin Western Blot analizleri için, SDS-PAGE koşturmasından sonra boyanmamış jeller transfer tamponu ile dengelemeye bırakıldıktan sonra Blotter cihazı üzerinde Whatman kağıtları, etanol ile aktive edilmiş PVDF membran (Millipore PSQ 0,45 μ m) ve jel kompozisyonunda 2+2 sandviç metoduyla Semi-Dry blotlamaya hazır hale getirilmiştir. Transfer işlemi 25V, 0,2 Amper akım ile 35 dakika olarak tamamlanmıştır. Transfer sonrası membranlar deney planına göre gece boyu +4 °C' de veya 1 saat süre ile oda sıcaklığında %5 (w/v) yağsız süt tozu (CST-Nonfat Dry Milk #9999 ve %0,1 Tween-20 (AppliChem, A4974) içeren TBS-T tamponu ile bloklamaya alınmıştır (EK-29). Bloklama sonrası deneye bağlı olarak gece boyu (+4 °C) veya 1 saat (oda sıcaklığı) olacak şekilde 1:200 ve 1:1000 oranında anti-hGH (GH-1/2 Antikoru, Santa Cruz-36787, Rabbit Poliklonal) veya 1:3000 oranında Anti-Histidin (Thermo MA1-21315, Anti-Histidin, Mouse Monoklonal) birincil antikoru ile inkübasyon

yapılmış ve yıkama sonrası 1 saat süreyle ikincil antikor (birincil antikora bağlı olarak: 1:10.000, Genescript A00098 Goat Anti-Rabbit HRP Conjugated – 1:10.000 veya Genescript A00160 Goat Anti-Mouse HRP Conjugated) ile muamele edilmiştir. Her bir inkübasyon arası membranlar %0,1 v/v Tween 20 içeren TBS-T tamponu ile 5' er kez yıkanmıştır. Son aşamada membranlar TMB solüsyonu (Sigma-T0565) ile 15 dakika süreyle inkübe edilerek görüntülenmiştir (EK-29).

3. BULGULAR

3.1. hGH Dizisinin Protein Üretimi İçin *T. thermophila*' ya Kodon Uyumu

İnsan büyüme hormonunun *T. thermophila*' da rekombinant üretimi için hGH DNA dizisinin *T. thermophila* kodon kullanım sözlüğüne göre uyumu gerçekleştirilmiş ve dizide nükleotid düzeyinde değişiklikler tamamlanmıştır (EK-30). Buna göre, ilgili genin E. R sinyaliyle birlikte 651 nükleotidlik DNA dizisi içerisindeki toplam 217 kodondan 149' unda değişiklik gerçekleştirilmiş olup (kodon değişiklik oran: %68) bu kodonların 143 tanesi 1.nükleotid, 4 tanesi 2.nükleotid, 43 tanesi ise 3.nükleotid değişikliği içermektedir (Şekil 3.1). Kodon optimizasyonu yapılan dizinin açık okuma çerçevesi ile hGH proteininin açık okuma çerçeveleri dikey hizalama ile karşılaştırılmış olup her iki dizi arasında aminoasit dizisi yönünden %100 uyum olduğu görülmüş ve mutasyon gerçekleşmediği teyit edilmiştir (EK-31).

1	M	A	T	G	S	R	T	S	A	G	C	W	G	S	A	T	S	R	D	N
	ATG	GCT	ACA	GGC	TCC	CGG	ACG	TCC	CTG	CTC	CTG	GCT	TTT	GGC	CTG	CTC	TGC	CTG	CCC	TGG
	ATG	GCT	ACT	GGT	TCT	AGA	ACT	TCT	TTA	TTA	TTA	GCT	TTC	GGT	TTA	TTA	TGC	TTA	CCT	TGG
61	L	Q	E	G	S	A	F	P	T	I	P	L	S	R	L	F	D	N	A	M
	CTT	CAA	GAG	GGC	AGT	GCC	TTC	CCA	ACC	ATT	CCC	TTA	TCC	AGG	CTT	TTT	GAC	AAC	GCT	ATG
	TTA	CAA	GAA	GGT	TCT	GCT	TTC	CCT	ACT	ATT	CCT	TTA	TCT	AGA	TTA	TTC	GAC	AAC	GCT	ATG
121	L	R	A	H	R	L	H	Q	L	A	F	D	T	Y	Q	E	F	E	E	A
	CTC	CGC	GCC	CAT	CGT	CTG	CAC	CAG	CTG	GCC	TTT	GAC	ACC	TAC	CAG	GAG	TTT	GAA	GAA	GCC
	TTA	AGA	GCT	CAC	AGA	TTA	CAC	CAA	TTA	GCT	TTC	GAC	ACT	TAC	CAA	GAA	TTC	GAA	GAA	GCT
181	Y	I	P	K	E	Q	K	Y	S	F	L	Q	N	P	Q	T	S	L	C	F
	TAT	ATC	CCA	AAG	GAA	CAG	TAT	TCA	TTC	CTG	CAG	AAC	CCC	CAG	ACC	TCC	CTC	TGC	TTC	
	TAC	ATT	CCT	GAA	GAA	CAA	AAA	TAT	TCT	TTC	TTA	CAA	AAC	CCT	CAA	ACT	TCT	TTA	TGC	TTC
241	S	E	S	I	P	T	P	S	N	R	E	E	T	Q	Q	K	S	N	L	E
	TCA	GAG	TCT	ATT	CCG	ACA	CCC	TCC	AAC	AGG	GAG	GAA	ACA	CAA	CAG	TCC	AAC	CTA	AGG	
	TCT	GAA	TCT	ATT	CCT	ACT	CCT	TCT	AAC	AGA	GAA	GAA	ACT	CAA	CAA	AAA	TCT	AAC	TTA	GAA
301	L	L	R	I	S	L	L	L	I	Q	S	W	L	E	P	V	Q	F	L	R
	CTG	CTC	CGC	ATC	TCC	CTG	CTG	CTC	ATC	CAG	TCG	TGG	CTG	GAG	CCC	GTG	CAG	TTC	CTC	AGG
	TTA	TTA	AGA	ATT	TCT	TTA	TTA	TTA	ATT	CAA	TCT	TGG	TTA	GAA	CCT	GTT	CAA	TTC	TTA	AGA
361	S	V	F	A	N	S	L	V	Y	G	A	S	D	S	N	V	Y	D	L	L
	AGT	GTC	TTC	GCC	AAC	AGC	CTG	GTG	TAC	GGC	GCC	TCT	GAC	AGC	AAC	GTC	TAT	GAC	CTC	CTA
	TCT	GTT	TTC	GCT	AAC	TCT	TTA	GTT	TAC	GGT	GCT	TCT	GAC	TCT	AAC	GTT	TAC	GAC	TTA	TTA
421	K	D	L	E	E	G	I	Q	T	L	M	G	R	L	E	D	G	S	P	R
	AAG	GAC	CTA	GAG	GAA	GGC	ATC	CAA	ACG	CTG	ATG	GGG	AGG	CTG	GAA	GAT	GGC	AGC	CCC	CGG
	AAA	GAC	TTA	GAA	GAA	GGT	ATT	CAA	ACT	TTA	ATG	GGT	AGA	TTA	GAA	GAC	GGT	TCT	CCT	AGA
481	T	G	Q	I	F	K	Q	T	Y	S	K	F	D	T	N	S	H	N	D	D
	ACT	GGG	CAG	ATC	TTC	AAG	CAG	ACC	TAC	AGC	AAG	TTC	GAC	ACA	AAC	TCA	CAC	AAC	GAT	GAC
	ACT	GGT	CAA	ATT	TTC	AAA	CAA	ACT	TAC	TCT	AAA	TTC	GAC	ACT	AAC	TCT	CAC	AAC	GAC	GAC
541	A	L	L	K	N	Y	G	L	L	Y	C	F	R	K	D	M	D	K	V	E
	GCA	CTA	CTC	AAG	AAC	TAC	GGG	CTG	CTC	TAC	TGC	TTC	AGG	AAG	GAC	ATG	GAC	AAG	GTC	GAG
	GCT	TTA	TTA	AAA	AAC	TAC	GGT	TTA	TTA	TAC	TGC	TTC	AGA	AAA	GAC	ATG	GAC	AAA	GTT	GAA
601	T	F	L	R	I	V	Q	C	R	S	V	E	G	S	C	G	F			
	ACA	TTC	CTG	CGC	ATC	GTG	CAG	TGC	CGC	TCT	GTG	GAG	GGC	AGC	TGT	GGC	TTC			
	ACT	TTC	TTA	AGA	ATT	GTT	CAA	TGC	AGA	TCT	GTT	GAA	GGT	TCT	TGC	GGT	TTC			

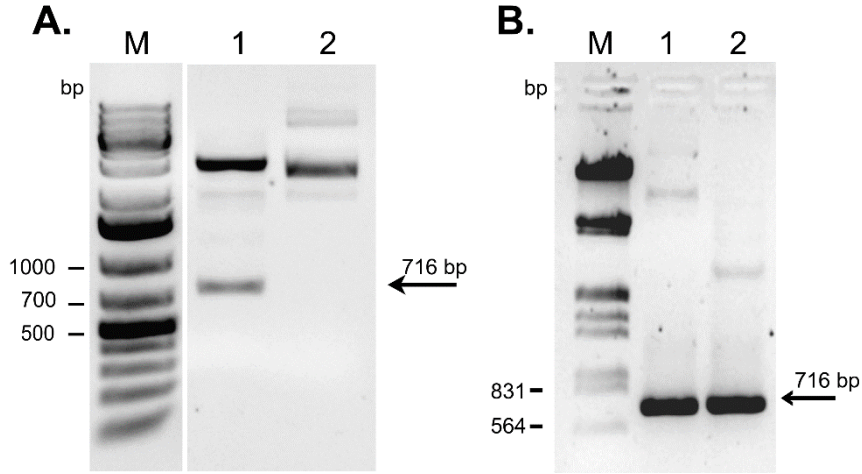
Şekil 3.1. Büyüme Hormonunun Protein Kodlayıcı DNA Dizisinin *T. thermophila* Kodon Sözlüğüne Göre Optimize Edilmesi. 1.Sıra: hGH kodonlarına karşılık gelen aminoasitler. 2.Sıra: CAA23779 İnsan büyüme hormonu geni nükleotid dizisi. 3.Sıra (Altı Çizili): İnsan büyüme hormonu geninin *T. thermophila*' ya uyumlu kodon dizisi. Kırmızı olan nükleotidler uyum için değişiklik yapılan kodonlardır.

3.2. Kodon Uyumlu hGH Dizisinin Transformasyonda Kullanılacak Vektörlere Klonlanması

Biyoinformatik olarak kodon uyumu yapılan hGH gen dizisi ile birlikte ayrıca diziye eklenen (farklı bir projede kullanım için) N-terminal 10xHistidin takısı (30 bç), Enterokinaz kesim bölgesi (15 bç, Light Chain Enterokinase kesim dizisi Asp-Asp-Asp-Asp-Lys için *T. thermophila* uyumlu kodon optimize DNA dizisi: GACGACGACGACAAA), 2xTGA stop kodonu ve klonlamada kullanılacak MscI ve FseI restriksiyon kesim bölgeleri birlikte sentetik olarak ürettirilmiş (EK-34) ve pUC57 vektörü içerisinde temin edilmiştir. Elde edilen sentetik dizinin toplam uzunluğu 716 baz çifti olup sentetik dizi (hGH1 olarak

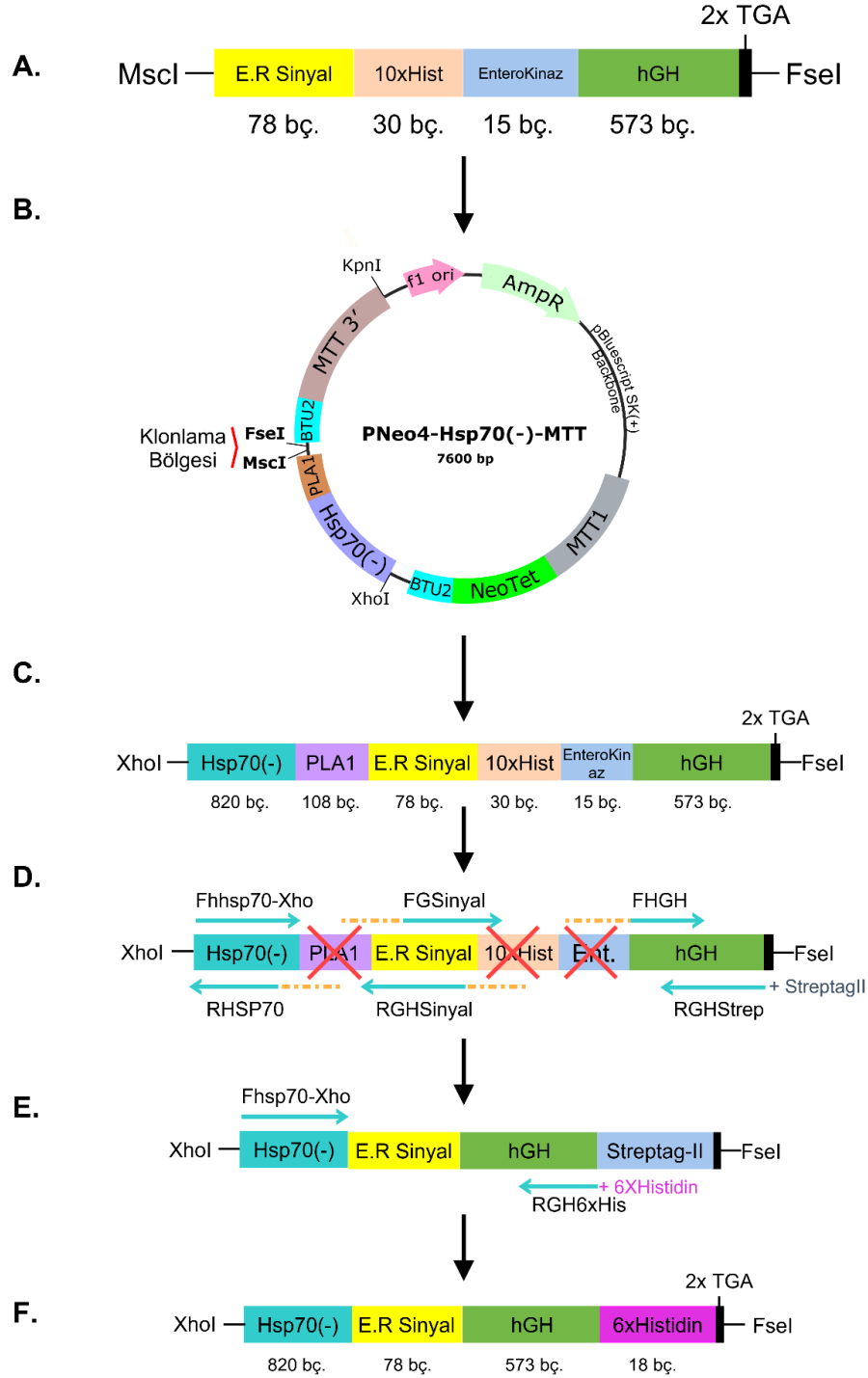
adlandırılmıştır) (Şekil 3.3-A) ve biyoinformatik dizinin dikey hizalama kontrolü yapılmış ve sentetik rekombinant DNA dizisinin tasarlandığı gibi doğru sırada olduğu teyit edilmiştir (EK-32).

hGH1 dizisi, üzerinde yer aldığı pUC57 vektöründen MscI-FseI enzimleri ile kesilip alınmış (Şekil 3.2-A) ve yine aynı enzimlerle doğrusal hale getirilmiş genom entegrasyon vektörü olan pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT' ye ligasyon ile yerleştirildikten sonra *E. coli* XL1-Blue hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. *E. coli* pozitif transformantından saflaştırılan rekombinant vektörün MscI-FseI restriksiyon çiftli kesim analizi sonucuna göre, pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH1-MTT vektörünün 716 bazlık sentetik diziye içerdiği teyit edilmiştir (Şekil 3.2-B).



Şekil 3.2. hGH1 Sentetik Üretim DNA Parçasının Teyidi ve pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT Genom Entegrasyon Vektörüne Klonlanması. **A.** pUC57-hGH Vektörü MscI-FseI Kesimi İle Sentetik Dizinin Kontrolü. 1: MscI-FseI ile elde edilen 716 bç'lik hGH1 parçası. 2: Kontrol pUC57 (kesilmemiş). M: Generuler 1kb plus (SM1331). Ok: Beklenen ürün-760 bç. **B.** pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH1-MTT Vektörünün PZR Teyidi. 1: pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH1-MTT vektöründen üretilen 716 bç'lik hGH1 dizisi. 2: Pozitif kontrol pUC57 vektöründen üretilen 716 bç'lik dizi. Ok: Beklenen ürün-716 bç. M: EcoRI-HindIII Plus (SM0191). %1 Agaroz jel, 80V-40 dk.

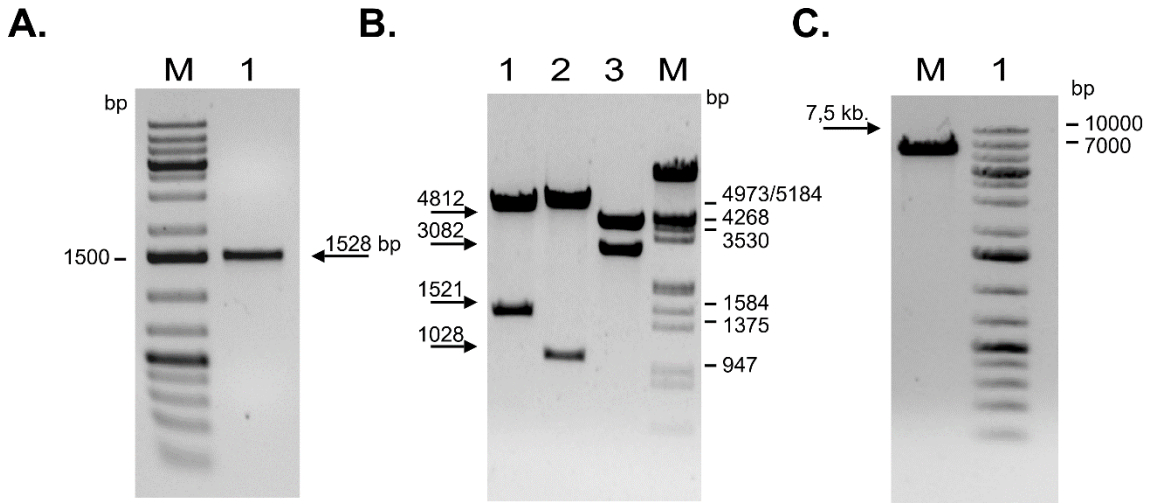
Vektöre klonlanan sentetik hGH1 protein kodlayıcı dizi bölgesinin N-terminaline yerleştirilmiş elementlerin (Histidin, Enterokinaz ve PLA1 sinyal dizisi), tezin hipotezinin sınanmasına engel teşkil ettiğinden bu elementler örtüşen primer PZR yöntemi ile çıkarılmış ve hGH E.R sinyal dizisi ile geri kalan protein kodlayıcı hGH dizisinin birleştirilmesi tamamlanmıştır (Şekil 3.3). Ayrıca, üretilen bu nativ formdaki hGH geninin C-terminal bölgesine primer kullanılarak PZR ile 6xHistidin takısı eklenmiştir. Böylece, Hsp70.2 promotörü dahil toplam 1528 bazlık rekombinant Hsp70.2(minus)-E. R Sinyal-hGH-6xHistidin dizisi başarı ile oluşturulmuştur (Şekil 3.3-F) (EK-7, 8, 9 ve 10) (EK-34).



Şekil 3.3. Kodon Optimize Sentetik Dizi Modifikasyonları ve Rekombinant hGH Dizisinin Elde Edilmesi. **A.** Sentetik dizinin yapısı. **B.** Sentetik dizinin pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT vektörüne klonlanması. **C.** Vektör üzerine entegre olan dizinin gösterimi. **D.** Sentetik diziden N-Terminal 10xHistidin/EnteroKinaz (1.aşama) ve PLA1 (2.aşama) dizilerinin çıkarılması. **E.** Dizinin C-terminal takısının 6xHistidin ile değiştirilmesi. **F.** Oluşturulan rekombinant insan büyüme hormonu üretim dizisi.

N-terminal 6xHistidin takısı eklenen dizi (Şekil 3.4-A), XhoI-FseI yönlendirilmiş klonlamasıyla pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT vektörüne eklendikten sonra elde edilen pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT vektörünün restriksiyon kesim profili ile doğru

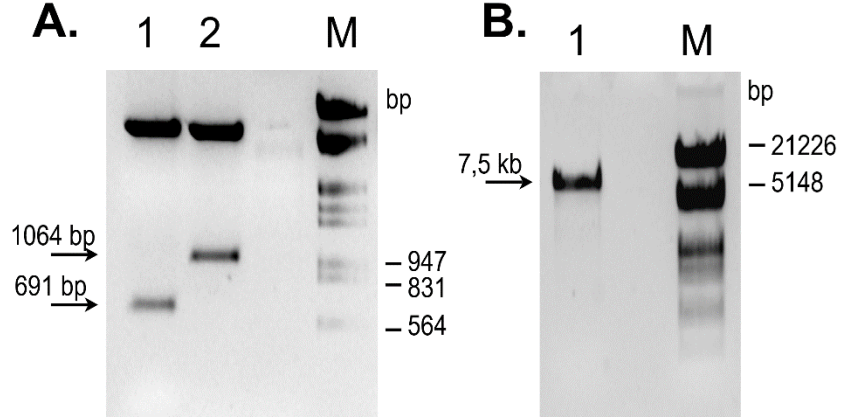
parçalardan oluştuğu teyit edilmiş (Şekil 3.4-B) ve bu vektör NGS yöntemi ile dizi analizine alınarak rekombinant kaset dizisinin doğru diziden oluştuğu görülmüştür (EK-37). Vektörün dizi analizi sonucunda biyoinformatiksel dizide olmayan toplam 8 adet nokta mutasyonu belirlenmiş olup bu mutasyonların vektörün iskeleti üzerinde rekombinant diziden farklı yerlerde olmasından dolayı transformasyon açısından bir problem yaratmayacağı anlaşılmıştır. Vektörün KpnI enzimi ile doğrusal hale geldiği agaroz jelde ayrıca teyit edilmiş (Şekil 3.4-C) ve genom entegrasyonu için gerekli doğrusal vektör yapısı elde edilmiştir.



Şekil 3.4. Rekombinant hGH (E.R. Sinyalli) Üretim Dizisinin Oluşturulması ve pNeo4-MTT Vektörüne Klonlanması. **A.** 1: 6xHistidin içeren rekombinant üretim dizisi saflaştırma ürünü (1528 bp). M: Generuler 1kb plus (SM1331). **B.** İzole edilen plazmit vektörün restriksiyon parmak izi kontrolü. 1: XhoI/FseI kesimi, (1521 bp). 2: HindIII kesimi (1028/6866 bp). 3: SacI kesimi (3082/4812 bp). M: EcoRI-HindIII Plus (SM0191). **C.** KpnI ile doğrusal hale getirilmiş pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT-6xHistidin vektörünün agaroz jeldeki görüntüsü. 1: Doğrusal vektör (7,5 kb). M: Generuler 1kb plus (SM1331). %1 Agaroz jel, 80V-40 dk.

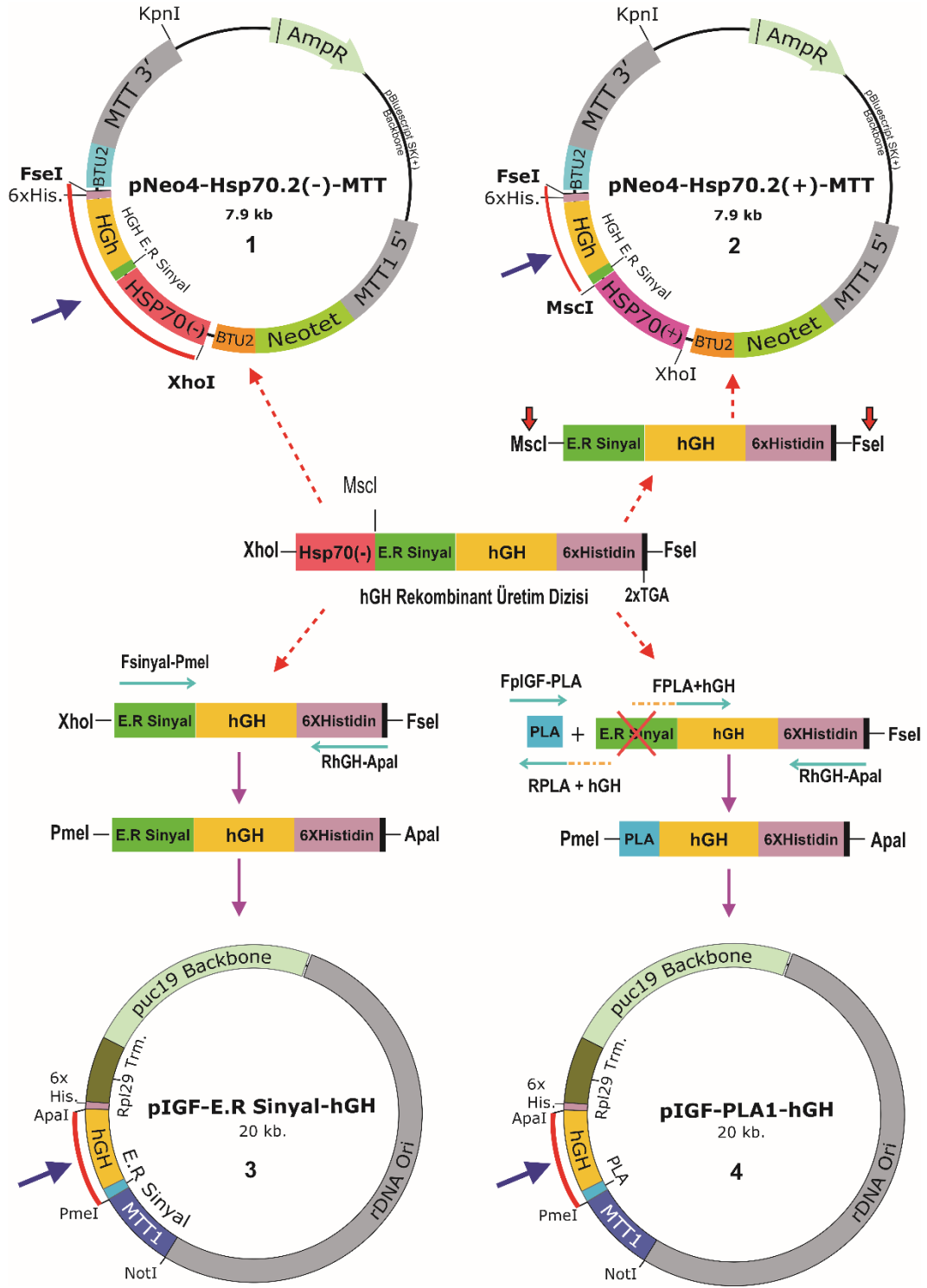
Rekombinant dizili diğer genom entegrasyon vektörü olan pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT'yi oluşturmak için, aynı hGH rekombinant üretim dizisi (Şekil 3.3-F), MscI ve FseI restriksiyon bölgelerinden kesilerek pNeo4-Hsp70.2(plus)-MTT vektörüne aynı restriksiyon kesim bölgeleri üzerinden klonlanmıştır. Belirtilen Hsp70.2(plus) promotörlü pNeo4 vektörünün yeni nesil sekanslama (N.G.S) dizi analizi ile promotora geri eklenmiş 36 bazlık ATG'li hipotetik IRES dizisinin varlığı ve çoklu klonlama bölgesinin MscI-SeXAI-FseI dizilerinden oluştuğu teyit edilmiştir (EK-38). Elde edilen pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT rekombinant vektörünün restriksiyon kesim profili analizine göre rekombinant vektörün doğru parçalardan oluştuğu teyit edilmiş (Şekil 3.5-A), KpnI kesimi ile doğrusal hale gelebildiği ve transformasyonda kullanılabileceği görülmüştür (Şekil 3.5-B).

Belirtilen klonlama aşamaları ile rekombinant hGH üretim dizisini içeren her iki pNeo4 vektörü (Hsp70.2 minus/plus promotorlu genom entegrasyon sistemi) transformasyonda kullanılmak üzere başarıyla oluşturulmuştur (Şekil 3.7) (EK-11).



Şekil 3.5. Rekombinant pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT Vektörünün Kontrolü. **A.** pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT Vektörünün Restriksiyon Profil Analizi. 1: MscI/FseI kesimi (691 bç). 2: HindIII kesimi (1064 bç). M: EcoRI-HindIII Plus (SM0191) **B:** KpnI Enzimi İle Lineer Edilen Vektörün Agaroz Jelde Kontrolü. 1: Doğrusal vektör (7,5 kb). M: EcoRI-HindIII Plus (SM0191). %1 Agaroz jel, 80V-40 dk.

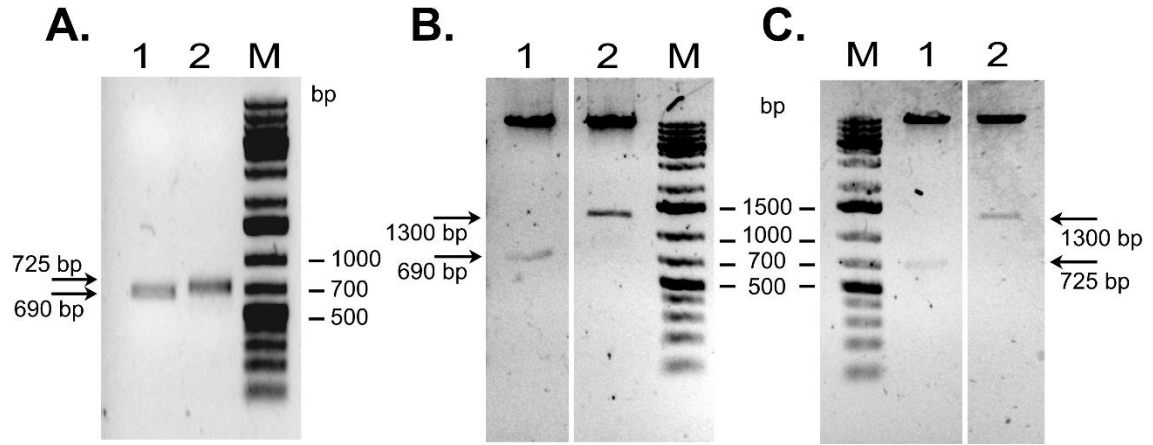
5' ucunda doğal hGH E.R yönlendirme sinyali bulunduran hGH dizisi ile kontrol olarak kullanılacak hGH'nin 5' ucu doğal hGH E.R yönlendirme sinyali kesilmiş ve yerine PLA1 E.R yönlendirme sinyali yerleştirilmiş iki farklı hGH tasarımının, rDNA orjinli pIGF vektör sistemine klonlaması, PmeI ve ApaI restriksiyon bölgeleri vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir (EK-12) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. İnsan Büyüme Hormonunun E.R. Sinyal Dizisinin Test Vektörleri. 1-2: Genom entegrasyon pNeo4 vektörleri ve içerdikleri diziler, 3-4: Konjugatif pIGF vektörleri ve içerdikleri rekombinant diziler.

Buna göre, pNeo4 vektörü üzerindeki rekombinant üretim dizisi üzerinden FSinyal-PmeI ve RHGH-ApaI primerleri ile hGH E.R sinyal dizili 735 bp'lık parça PZR ile üretilmiş ve agaroz jelde büyüklüğü teyit edilmiştir (Şekil 3.6-A) Kontrol grubu olarak kullanılacak hGH E.R sinyal dizisinin çıkarılıp yerine PLA1 dizisi eklenecek dizi versiyonu

için de, örtüşen primerler kullanılarak mutasyon aşamaları tamamlanmış ve 690 baz çifti büyüklüğünde PLA1 dizili hGH üretim parçası üretilerek her iki parçanın doğru büyüklükte olduğu görülmüştür (Şekil 3.7-A). Üretilen bu iki ayrı dizi, Apal ve Pmel klonlaması ile pIGF-1 vektörlerine klonlandıktan sonra elde edilen rekombinant dizili konjugatif vektörlerin Apal ve Pmel ile NotI ve Apal enzimleri kullanılarak restriksiyon parmak izi analizleri gerçekleştirilmiştir. PLA1 sinyalli hGH dizisini içeren pIGF-PLA1-hGH vektörünün 1300 baz çifti ve 725 baz çifti (insert) büyüklüğündeki 2 parçayı doğru büyüklükte saldıgı görülmüştür (Şekil 3.7-B). Yine, hGH E.R yönlendirme sinyalli hGH dizisi içeren pIGF-Sinyal-hGH konjugatif vektörünün 725 bazlık (insert) ve 1300 bazlık her iki parçayı doğru şekilde saldıgı görülmüş ve rekombinant dizileri içeren konjugatif vektörlerin doğru parçalardan oluştuğu teyit edilmiştir (Şekil 3.7-C).



Şekil 3.7. pIGF Vektörlerine Klonlanacak Parçaların Oluşturulması ve Teyidi. **A.** Rekombinant Üretim İçin Gerekli E.R Sinyal-hGH ve PLA1-hGH Dizilerinin Oluşturulması. 1: 690 bç'lik Sinyal-hGH dizisi. 2: 725 bç'lik PLA1-hGH dizisi. M: Generuler 1kb plus (SM1331). **B.** Rekombinant pIGF Vektörlerinin Restriksiyon Profil Analizi. 1: pIGF-PLA1-hGH vektörünün Apal/Pmel kesiminin 690 bç'lik insert ürünü. 2: pIGF-PLA1-hGH vektörünün NotI/Apal kesim kontrolünden 1300 bç'lik parça salınması. M: Generuler 1kb plus (SM1331). **C.** 1: pIGF-Sinyal-hGH vektörünün Apal/Pmel kesimi ile salınan 725 bç'lik insert ürünü. 2: pIGF-Sinyal-hGH vektörünün NotI/Apal kesim kontrolünden 1300 bç'lik parça salınması. M: Generuler 1kb plus (SM1331). %1 Agaroze jel, 80V-40 dk.

Çalışmanın rekombinant kısmında gerçekleştirilen tüm klonlama işlemleri sonrası ortaya çıkan rekombinant vektörler ve içerdikleri hGH üretim dizisi yapıları ise Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Büyüme Hormonu hGH'nin *T. thermophila* 'da Rekombinant Üretimi ve Hipotezin Sınanması için Oluşturulan Diziler ve Vektörler

Vejetatif Transformasyon Vektörleri		Kopya Sayısı (Bek.)	Promotor	Rekombinant Dizi
1	pNeo4-Hsp70.2(Minus)-hGH-MTT	45	Hsp70.2 (Minus)	<u>hGH E.R Sinyal</u> + hGH Gen + 6x Histidin + 2xTGA
2	pNeo4-Hsp70.2(Plus)-hGH-MTT	45	Hsp70.2 (Plus)	
Konjugatif Transformasyon Vektörleri		Kopya Sayısı (Bek.)	Promotor	Rekombinant Kaset Dizisi
3	pIGF- Sinyal – hGH	~10.000	MTT1	<u>hGH E.R Sinyal</u> + hGH Gen+ 6x Histidin + 2xTGA
4	pIGF – PLA1 – hGH	~10.000	MTT1	<u>PLA1 Sinyal</u> + hGH Gen + 6x Histidin + 2xTGA

3.3. *T. thermophila* Vejetatif ve Konjugatif Transformasyon Bulguları

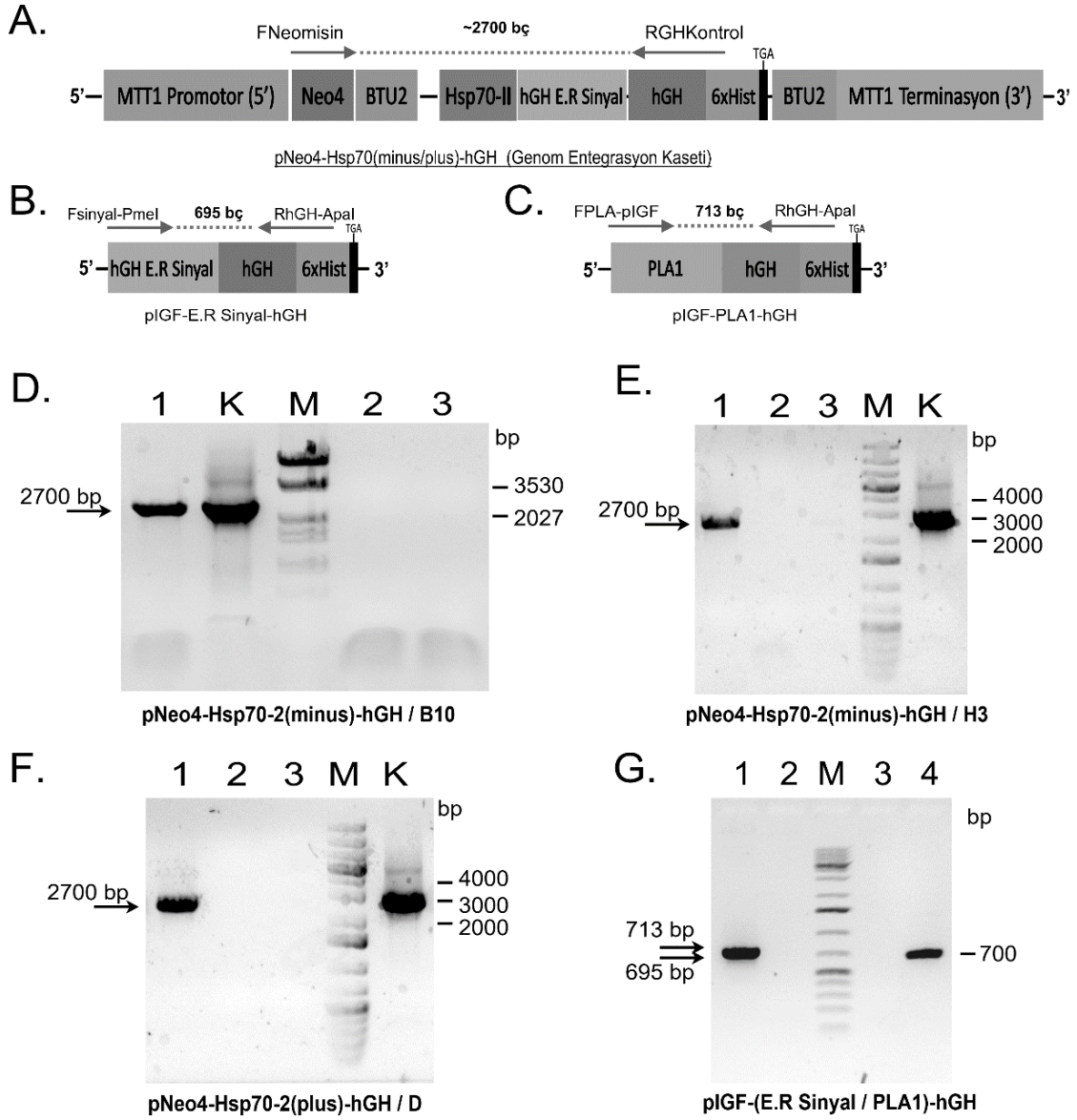
Çalışmada ilk olarak *T. thermophila* CU428 ırkına pNeo4 genom entegrasyon vektörleri (1. ve 2. vektör) (Tablo 3.1) ayrı ayrı vejetatif biyolistik transformasyon protokolü takip edilerek transforme edilmiştir (EK-16). Buna göre, pNeo4-Hsp70.2(Minus)-hGH-MTT transformasyon hücrelerinin 1/10 dilüsyonundan B10, B11, D1, H1 ve H3 kodlu 5 farklı koloni elde edilmiş ve rekombinant protein üretim analizi için B10 ve H3 kodlu klonlar (B10 ve H3 kodlu olarak sıvı azotta dondurularak stoklanmıştır) kullanılmıştır. Plus dizisi içeren Hsp70.2 promotorlu pNeo4-Hsp70.2(Minus)-hGH-MTT vektörünün transformasyonundan sonra 1/10 dilüsyon uygulanan transformantlardan 2 adet koloni elde edilmiş olup çalışmada D olarak kodlanan transformant kolonisi kullanılmıştır. Tüm genom entegrasyonlu transformant kolonilerinin 1000 µg/ml Paramomisin baskısına dayanabildiği görülmüş ve hücrelerin canlılıklarının normal olduğu gözlenmiştir.

Rekombinant üretim dizilerini içeren rDNA pIGF vektörlerinin (3. ve 4. vektör) (Tablo 3.1) konjugatif transformasyonla transforme edildiği CU427 & CU428

konjugasyon hücrelerinden elde edilen transformantlardan, tek hücre izolasyonu yapılmaksızın 300 µg/ml Paramomisin baskısına dayanan toplam hücreler (Bulk) toplanmış ve her iki transformant grubu hücrelerinin 300 µg/ml Paramomisin baskısında canlı ve hücre morfolojilerinin sağlıklı oldukları gözlenmiştir.

3.4. Transformantlarda Genomik DNA Analizleri

Vejetatif ve konjugatif transformasyon sonrası antibiyotik baskısı ile seçilimi tamamlanmış klonlardan izole edilen genomik DNA'larda gerçekleştirilen PZR analizleri ile rekombinant kasetlerin genomdaki varlığı ve konjugatif vektörlerin hücredeki stabilizasyon durumları kontrol edilmiştir. pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT vektörü içeren B10/H3 klonlarından izole edilen genomik DNA'ların, FNeomisin (5'ATGATTGAACAAGATGGTTTACAC3') ve RGHKontrol (5'GAAACCGCAAGAACCTTCAACAG3') primerleri (Şekil 3.8-A) ile PZR analizine göre, her iki klonun rekombinant kasete ait 2700 bp'lik parçaları üretebildikleri görülmüştür (Şekil 3.8-D ve E). Aynı primer çifti ile (Şekil 3.8-A) analiz edilen pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT vektörlü D klonunun, yine genomik DNA üzerinden rekombinant kasete ait 2700 bp'lik parçayı üretebildiği teyit edilmiştir (Şekil 3.8-F). Ekstrakromozomal pIGF vektörlerini içeren E.R Sinyal-hGH-ve PLA1-hGH klonlarından elde edilen genomik DNA'larının gen spesifik primerler FPLA-pIGF ve RHGH-ApaI (Şekil 3.8-B) ile Fsinyal-PmeI ve RHGH-ApaI (Şekil 3.8-C) (EK-36) çiftleri ile PZR analizlerine göre, vektörde yer alan 695 bp ve 700 bp'lik parçalar üretilebilmiş ve vektörlerde yer alan her iki sinyal dizili (hGH E.R Sinyal dizili kaset ve PLA1 sinyal dizili kaset) bölgelerin genomdaki varlığı ispatlanmıştır (Şekil 3.8-G).

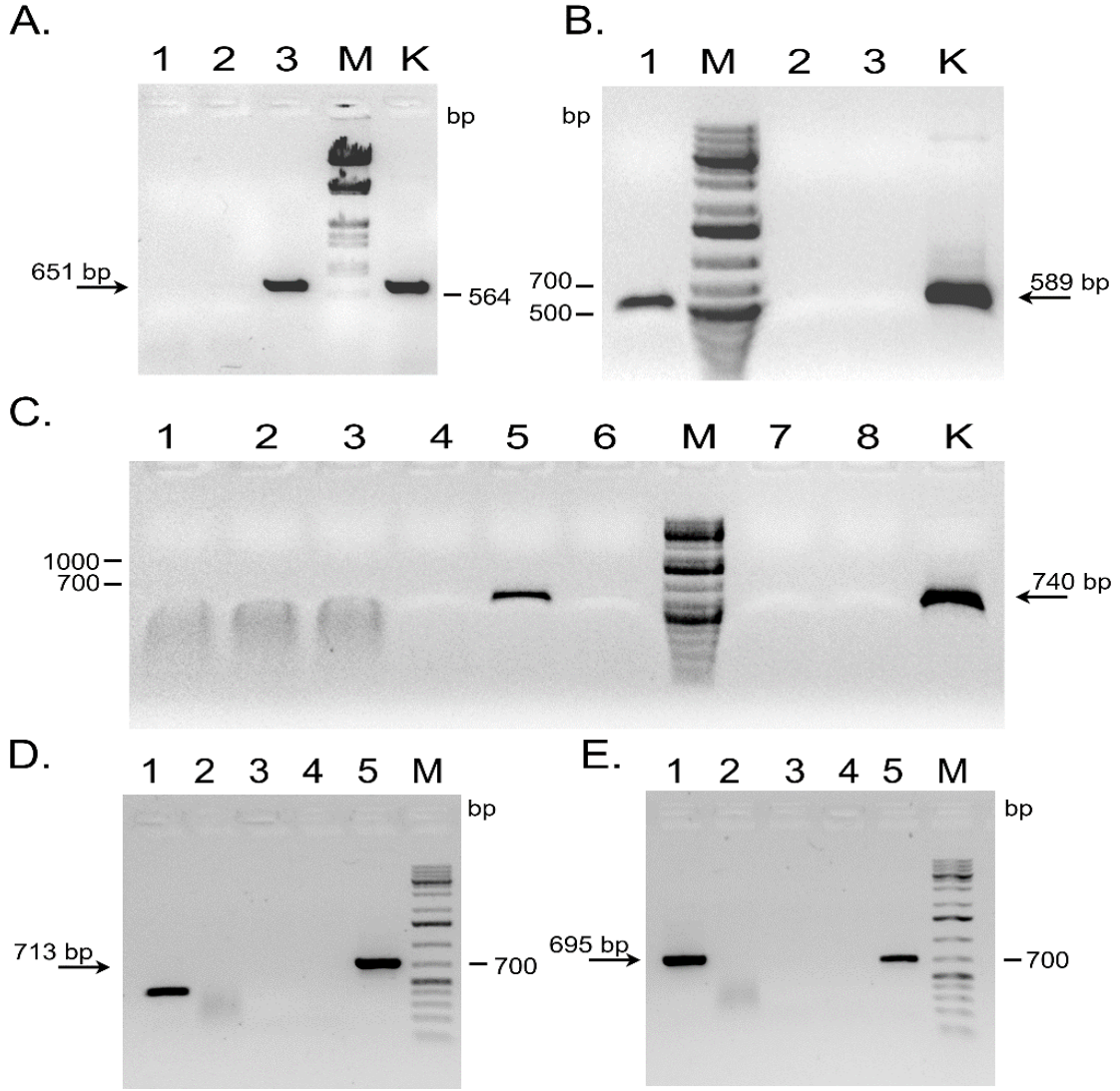


Şekil 3.8. Transformantların Genom Entegrasyon ve Ekstrakromozomal Vektör Varlığının Genomik DNA Kullanılarak PZR Analizleri. **A.** Kimerik Primer Çifti FNeomisin – RGHKontrol ve Çoğalttıkları Dizi Bölgesi (2700 bç). **B.** FSinyal-PmeI ve RHGH-ApaI Primerlerinin Dizide Çoğalttığı Bölge (695 bç). **C.** FPLA-pIGF ve RHGH-ApaI Primerlerinin Dizide Çoğalttığı Bölge (713 bç). **D.** pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH B10 Transformant Hücrelerinin Genomik DNA Analizi. 1: B10 klonu 2700 bç'lik genomik DNA ürünü K: Pozitif kontrol (vektör) 2: CU428 negatif kontrol (transforme edilmemiş kontrol). 3: Kalıpsız negatif kontrol. M: EcoRI-HindIII Plus (SM0191.) **E.** pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH H3 Transformant Klonunda Genomik DNA Analizi. 1: H3 genomik DNA 2700 bç'lik genomik DNA ürünü, 2: CU428 Transforme edilmemiş negatif kontrol. 3: Kalıpsız negatif kontrol. K: Pozitif kontrol (vektör). M: Generuler 1kb plus (SM1331). **F.** pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH/D Klonunda Genomik DNA Kontrolü. 1: D Klonu 2700 bç'lik genomik DNA ürünü. 2: CU428 transforme edilmemiş negatif kontrol. 3: Kalıpsız negatif kontrol. K: Pozitif kontrol (vektör). M: Generuler 1kb plus (SM1331). **G.** pIGF-Sinyal-Hgh ve pIGF-PLA1-hGH Vektörlü Transformantlarda Genomik DNA Analizi. 1: PLA1-hGH-pIGF transformantlarının 713 bç'lik genomik DNA ürünü, 2: CU428 negatif kontrol 3: CU428 negatif kontrol. 4: hGHSinyal-hGH-pIGF transformantlarının 695 bç'lik genomik DNA ürünü. M: Generuler 1kb plus (SM1331). %1 Agaroz jel, 80V-40 dk.

3.5. İndüklenen Transformantlarda RNA Seviyesinde Gen İfade Analizleri

Çalışmada oluşturulan rekombinant üretim vektörlerinin transformasyonu sonucu elde edilen ve genomik DNA analizleri tamamlanmış tüm transformantlarda indüklemeye bağlı olarak hedef proteini kodlayan mRNA'nın üretilip üretilmediği gen spesifik primer çiftleri ile PZR temelli analiz edilmiştir. Buna göre, pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT B10 ve H3 klonlarının 3 saatlik ısı şoku ile indüklenmesinden elde edilen RNA'ların cDNA PZR bulgularına göre, her iki klonun 38 °C ısı şoku indüklemesi yoluyla rekombinant kaset üzerinden mRNA ürettiği görülmektedir (Şekil 3.9-A ve B). B10 klonu için, kasette yer alan E.R Sinyal ve PLA1 dizisine spesifik iki primer çiftinden (FGHSinyal ve RGHKontrol) beklenen 651 bç'lik gen parçası PZR ile üretildiğinden hGH geninden mRNA üretiminin gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 3.9-A). H3 klonunda 3 saatlik ısı şokuyla indüklemeye gerçekleştirilmiş, FHGH ve RGHKontrol primerleri ile cDNA kullanılarak yapılan PZR sonucu hGH kasetine ait 589 bazlık parça üretilmiş, yani H3 klonunun da rekombinant kaset üzerinden mRNA ifadesine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 3.9-B). pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT vektörünün transforme edildiği D klonunda ise, 38 °C'de 3 saatlik indüklemeye ile elde edilen hücrelerinim cDNA havuzu PZR analizinde, FGHSinyal ve RGH6xHistidin primerleri kullanılarak 740 bazlık beklenen DNA parçasını üretebildiğinden mRNA ifadesinin olduğu görülmüştür (Şekil 3.9-C). D klonunun cDNA tabanlı PZR reaksiyonuna RNA kalıbı ile kurulmuş kontrol reaksiyonu da dahil edilmiş ve bu örneklerde herhangi bir bant elde edilmediğinden örneklerde genomik DNA kontaminasyonunun olmadığı teyit edilmiştir (Şekil 3.9-C).

rDNA orjinli pIGF vektörlerinin klonlandığı *Tetrahymena* hücrelerinde, 48 saatlik MTT1 promotorunun indüklemesi sonrası transformantlardan elde edilen cDNA'larda FPLA-pIGF ve RHGH-Apal ile Fsinyal-PmeI ve RHGH-Apal primer çiftleri ile PZR analizleri gerçekleştirilmiş ve hGH E.R sinyali kasetli deney grubuna ait 695 bazlık kaset parçası doğru büyüklükte üretilmediğinden mRNA ifadesinin gerçekleşiyor olduğu anlaşılmıştır (Şekil 3.9-D). Fakat, PLA1 sinyali içeren transformant grubunda, 713 bazlık beklenen parçadan daha küçük bir PZR ürünü (yaklaşık 500 bç) elde edildiği görülmüştür (Şekil 3.9-E). Elde edilen bu bulgu, PLA1 içeren kontrol grubu transformantlarda RNA ifadesi açısından veya cDNA sentez reaksiyonu açısından bir problem olabileceğini işaret etmektedir.

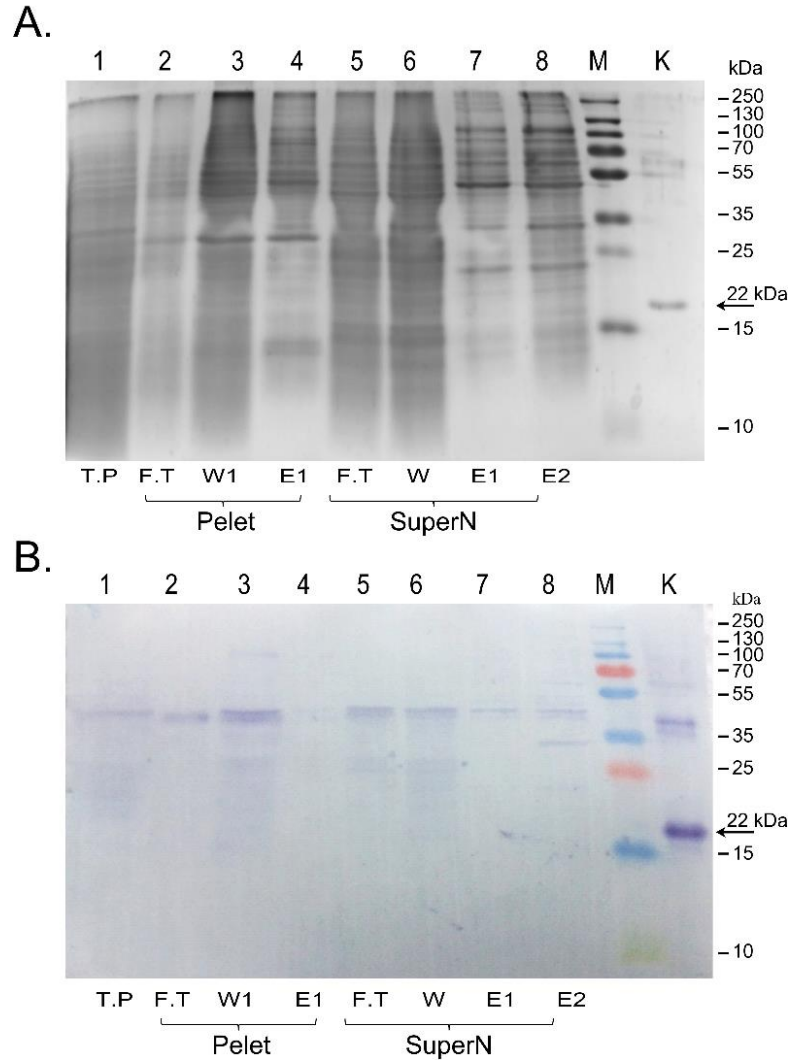


Şekil 3.9. Transformant Hücre Gruplarında Promotor İndüksiyona Bağlı mRNA ifadesinin cDNA-PZR ile Analizi **A.** Transformant B10 klonunda FGHSinyal ve RGHKontrol primerleri ile PZR temelli cDNA analizi. 1: Kalıpsız negatif kontrol. 2: Transforme edilmemiş negatif kontrol. 3: B10 deney grubunda 672 bç'lik cDNA ürünü. M: EcoRI -HindIII Plus (SM0191). K: Pozitif kontrol (vektör). **B.** H3 Klonunda FHGH ve RGHKontrol Primerleri İle cDNA PZR Kontrolü. 1: H3 deney grubunda 589 bç'lik cDNA 2: Kalıpsız negatif kontrol. 3: CU428 transforme edilmemiş negatif cDNA kontrol K: Pozitif kontrol (vektör). M: Generuler 1kb plus (SM1331). **C.** pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT/D klonunda FGHSinyal ve RGH6xHistidin Primerleri İle cDNA Analizi. 1: İndüklenmemiş deney grubu RNA. 2: deney grubu 3 saat 38 °C' de indüklenmiş RNA. 3: deney grubu 30 derece 3 saat recovery RNA. 4: deney grubu indüklenmemiş cDNA. 5: deney grubu 3 saat 38 derece indüklenmiş cDNA. 6: Deney grubu 30 derece – 3 saat recovery cDNA 740 bç'lik ürün. 7: Kalıpsız negatif kontrol. 8: Transforme edilmemiş CU428 negatif kontrol cDNA. K: Pozitif kontrol (20ng Vektör). M: Generuler 1kb plus (SM1331). **D.** PLA1-hGH-pIGF transformantlarında FpIGF-PLA1 / RHGH-Apal primerleri ile cDNA Analizleri 1: Deney grubu 48 saat indükleme cDNA, 2: Deney grubu RNA 48 saat indükleme RNA. 3: Reaksiyon kalıpsız kontrol 4: CU427-CU428 transforme edilmemiş cDNA. 5: 713 bç'lik pozitif Kontrol (vektör) ürünü. M: Generuler 1kb plus (SM1331). **E.** E.R Sinyal-hGH-pIGF Transformantlarında FSinyal-Pmel ve RHGH-Apal Primerleriyle Gerçekleştirilen cDNA PZR Bulguları. 1: Deney grubu 48 saat indüklemiş cDNA - 695 bç'lik ürün. 2: Deney grubu 48 saat indüklenmiş - RNA, 3: Reaksiyon kalıpsız kontrol 4: CU427-CU428 transforme edilmemiş negatif cDNA kontrol. 5: Pozitif Kontrol (Vektör) 695 bç'lik ürün. M: Generuler 1kb plus (SM1331). %1 Agaroz jel, 80V- 40 dk.

3.6. İndüklenen Transformantlarda Protein Seviyesinde Gen İfade Analizleri

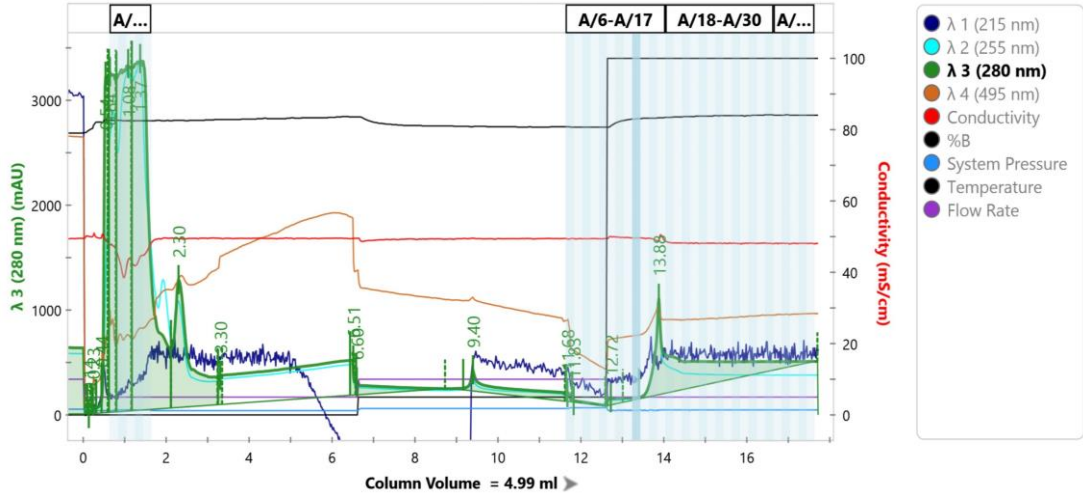
3.6.1. *T. thermophila* CU428 pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT / B10 kodlu klonunun protein ifade analizi bulguları

Genom entegrasyon vektörü olan pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT vektörünün *T. thermophila* CU428 vejetatif hücrelerine transformasyonu sonucu elde edilen B10 transformantından protein örnekleri elde edilerek SDS-PAGE ve Western Blot analizleri tamamlanmıştır. Bu deneyde, 3 saatlik ısı şoku indüklemesi sonrası 26×10^6 hücreden T100B protein izolasyon tamponu ile elde edilen çözünür toplam protein örnekleri Ni-NTA afinitik saflaştırma protokolü ile protein saflaştırmasına alınmıştır (EK-25). Elde edilen çözünür toplam proteine ait süpernatant ve pelet örneklerinin nikel afinite boncuk saflaştırma işlemi esnasında alınan Yıkama-Wash (W1, W2) ve Elüsyon (E1, E2) fraksiyonlarının negatif kontrol olmaksızın SDS-PAGE jelinde analizi Şekil 3.11'de görülmektedir. Bu analizde çözünür toplam protein ve Ni-NTA örneklerinin jel görüntüsünden görüleceği üzere protein izolasyonun kaliteli olduğu görülmektedir. Ancak hedef büyüklükte rekombinant protein bandını temsil edebilecek 22 kDa civarında “belirgin” bir bantlaşma tespit edilememiştir (Şekil 3.10-A). Aynı örneklerin Anti-hGH birincil antikoru ile 1 saatlik inkübasyonu ile yapılan Western Blot analizine göre pozitif kontrolün 22 kDa seviyesine denk gelen bir bantlaşma görülmezken, çözünür protein elüsyon-2 örneklerinde pozitif kontrolün dimer formu (44 kDa) büyüklüğüne yakın 1 adet zayıf bant görülmüştür (Şekil 3.10-B). Örneklerin kontrolü için gerçekleştirilen Western Blot analizinde özellikle yıkama ve elüsyon örneklerinde rekombinant protein açısından potansiyel bantların olması nedeniyle protein havuzunun Ni-NTA afinitik saflaştırması ile zenginleştirilmesi gerektiği anlaşılmıştır.



Şekil 3.10. *T. thermophila* CU428 pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT/B10 klonundan SDS-PAGE ve Western Blot Analizi. **A.** Ni-NTA ile Afinitik Olarak Saflaştırılmış Örneklerin SDS-PAGE Jel Görüntüsü. **B.** Ni-NTA ile Afinitik Olarak Saflaştırılmış Örneklerin Anti-hGH Antikoru ile Western Blot Analizi. 1: Çözünür toplam protein (supernatant). 2: Pelet flow through. (F.T) 3: Pelet yıkama (W). 4: Pelet elüsyon-1. 5: Çözünür toplam protein (Süpernatant) flow through (F.T). 6: Çözünür toplam protein yıkama (W). 7: Çözünür toplam protein elüsyon-1. 8: Çözünür toplam protein elüsyon-2. M: Precision Plus Prestained (Thermo -26619). K: hGH Pozitif Kontrol (rhGH-H5916). Western Aşaması: 1.cil Antikor: GH-1/2 Antikoru (Santa Cruz-36787), Rabbit Polyclonal 1:200, 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon, 2.cil Antikor: 1:10000 (Genescript A00098) HRP Konjuge Anti-Rabbit ,1 saat oda sıcaklığında inkübasyon, Görüntüleme: TMB Substratı ile 15 dk.

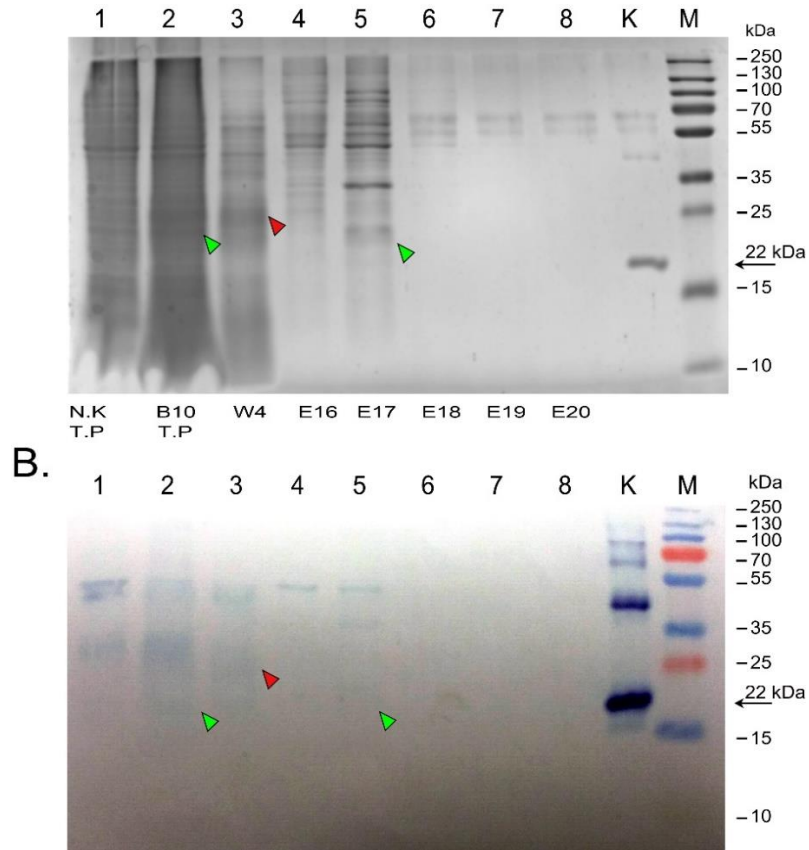
Aynı transformant hücre grubu, tekrar kültüre edilip 3 saat ısı şoku ile indüklendikten sonra yine T100B tamponuyla protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen toplam çözünür protein örnekleri (3 ml), NGC kromatografi cihazında yer alan Nikel afinite kolonuna (BioRad Nuvia- 7800811) yüklenerek saflaştırma sonrası NGC Quest yazılımı ile fraksiyon analizi yapılmıştır (EK-26). Rekombinant proteindeki 6xHistidin afinite takısını hedeflemek üzere uygulanan Nikel afinite kolon saflaştırması ile absorbansa dayalı elde edilen piklere ait grafik Şekil 3.11'de yer almaktadır.



Şekil 3.11. *T. thermophila* CU428 pNeo4-HSP70.2(minus)-hGH-MTT / B10 Toplam Protein Örneklerinin Afinité Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılmasından Elde Edilen Kromatogram Verisi

Grafiğe ait pik/fraksiyon entegrasyon tablosuna göre, 0-11 arası fraksiyonlar, kolona örnek yüklendikten sonra gerçekleştirilen yıkama işlemi sonrası kolona bağlanmayan örnekler aittir (EK-39). Grafikte ilk 3 fraksiyona denk gelen absorbanlarda hafif bir pik yükselmesi elde edilmiş (280 ve 255 nm dalga boyları için) fakat daha sonra pikler bazal seviyeye yaklaşarak elüsyon aşamasına kadar sabit bir profil göstermiştir. Bu durum ilk 2 fraksiyonda yoğun olmak üzere toplamda yaklaşık 4 fraksiyonda kolona tutunamamış proteinlerin kolondan çıktığını işaret etmektedir. 12 numaralı fraksiyondan itibaren kolona verilen elüsyon tamponunun etkisi ile aynı dalga boylarında kolona tutunan proteinlerin kolondan çıktığını işaret eden piklerin oluşumu görülmüştür. Bu pikler özellikle 16-20 arası fraksiyonlarda kuvvetli gözükmüş ve daha sonra elüsyon aşaması sonuna kadar sabit kalarak elüsyon sonlanmıştır. Buna göre elüsyon aşamasında kolona bağlanmış bir veya birden fazla protein örneğinin, elüsyon tamponundaki yüksek konsantrasyonlu imidazol etkisi ile kolon materyaline olan afinitesi bozulduğundan tamponla birlikte kolondan çıktığı ve pik oluşturduğu anlaşılmaktadır (Şekil 3.11). Kolon elüsyonunun başladığı 16 nolu fraksiyondan itibaren 30 nolu fraksiyona kadar örnekler ve 4.yıkama fraksiyonu birlikte SDS-PAGE jeline yüklenerek analiz edilmiş ve özellikle elüsyon örneklerinde belirgin protein bantları elde edilmiştir (Şekil 3.12-A). Aynı fraksiyonların Anti-hGH antikoru ile Western Blot analizi gerçekleştirildiğinde yeşil ve kırmızı oklar ile gösterilen 3 adet antikor bandı tespit edilmiştir (Şekil 3.12-B). Bu bantlardan yeşil oklar ile gösterilen 2 zayıf bant, negatif kontrolde olmayıp toplam protein (Şekil 3.12-B, 2.kuyu) ile 17 nolu elüsyon fraksiyonunda (Şekil 3.112B, 5.kuyu) bulunmakta olup beklenen 22 kDa civarı büyüklüğe sahiptir. Çalışmanın hipotezine göre sinyal dizisi işlenip kesilen büyüme hormonu yaklaşık 23 kDa (Histidin takısı ile birlikte) büyüklüğe sahip olacağı için bu bantların rekombinant

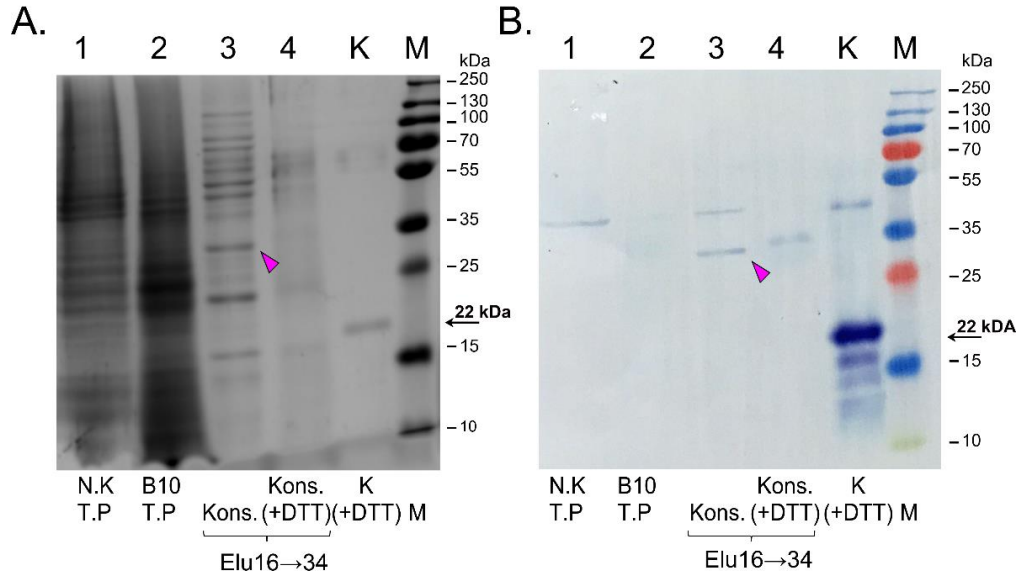
proteini temsil edebileceği düşünülmektedir. Bu bantlardan farklı olarak, kırmızı ok ile işaretlenmiş zayıf bant ise 4.yıkama fraksiyonunda (Şekil 3.12-B, 3.kuyu) 25 kDa marker bandıyla eş seviyede olup hipotez açısından sinyali işlenmemiş 27 kDa rekombinant protein büyüklüğüne denk gelmektedir (Sinyal + hGH + His = 25,77 kDa). Elde edilen bu 3 farklı protein bandı, büyüklük açısından hipotezi sınavacak rekombinant proteinin üretildiğine dair potansiyel bantlar olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.12. Kolon Kromatografisinden Elde Edilen Fraksiyonların SDS-PAGE ve Western Blot Analizi. **A.** SDS-PAGE Analizi. 1: Negatif Kontrol CU428 Çözünür Toplam Protein. 2: Deney Grubu Çözünür Toplam Protein. 3: 4 no'lu yıkama fraksiyonu. 4: Elüsyon 16. 5: Elüsyon 18. 6: Elüsyon 19. 7: Elüsyon 20. 8: Elüsyon 20. K: Pozitif Kontrol 2,4 µg (rhGH- H5916). M: Precision Plus Prestained (Thermo -26619). Örnekler 1:1 hacimde yükleme tamponu ile 10'ar dakika kaynatılarak 20 µl eşit hacimde yüklenmiştir. Boyama: 1 saat Comassie Blue. Jel Konsantrasyonu: %5-%12. **B.** Kolon Kromatografisinden Elde Edilen Fraksiyonların Western Blot Analizi. Bloklama: %5 Süttozu ile Gece Boyu, 1.cil Antikor: GH-1/2 Antikoru, (Santa Cruz-36787, Rabbit Polyclonal 1:200, 1 saat inkübasyon, 2.cil Antikor: 1:10000 (Genescript A00098) HRP Konjuge Anti-Rabbit ,1 saat inkübasyon, Görüntüleme: TMB Substratı ile 15 dk.

NGC saflaştırması ile elde edilen elüsyon bantlarının daha konsantre halde jelde analiz edilebilmesi için afinite kromatografisinin elüsyon aşamasından gelen 16-34 arası tüm fraksiyonlar birleştirilerek ultrafiltrasyon (Amicon Ultra-15 10 kDa Cutoff) kolonuna yüklenmiş ve 10 kDa üzeri tüm proteinler konsantre edilmiştir (Toplam Örnek Hacmi: 15 ml, Konsantre Örnek Hacmi: 200 µl, Oran: 75 kat) (EK-28). Pozitif kontrol olarak kullanılan HumanKine rhGH (Sigma-H5916) rekombinant insan büyüme hormonu

büyüklüğü SDS jelinde 22 kDa'dır. SDS-PAGE'de 22 kDa'dan büyük ve olasılıkla multimerik protein yapısını temsil eden bantlarının da görülmesinden dolayı bunların yapısını bozmak ve disülfid bağlarını kırarak, tek protein bandı elde edebilmek için bu kontrol proteinine 100mM DTT eklenerek 50 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra örnek hacminin 1/50 kadar iyodoasetamid çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş ve 4 saat süreyle 95 °C'de kaynatma işlemine alınmıştır. Elde edilen tüm örnekler pozitif ve negatif kontrollerle birlikte tekrar SDS jelinde koşturulduktan sonra Anti-hGH birincil antikorunu kullanılarak Western Blot yöntemi ile analiz edilmiştir. SDS-PAGE (Şekil 3.13-A) ve Western Blot (Şekil 3.13-B) verilerine göre, çözünür proteinlerin konsantre elüsyonunda mor ok ile işaretlenmiş 25-35 kDa arasında hipotez açısından hGH'nin sinyalinin işlenmemiş 27 kDa'lık hedef proteini büyüklüğü civarında bir protein görülmektedir (Teorik olarak beklenen işlenmemiş hGH'nin büyüklüğü: Sinyal + hGH + His = 25,77 kDa). Membranda elde edilen diğer antikor bantları ise hipotez açısından anlamlı büyüklüklere sahip olmadıklarından değerlendirilmeye alınmamıştır. Negatif kontrol grubunda yaklaşık 40 kDa olarak gözlemlenmiş protein bandı deney grubunda da bulunduğundan aynı şekilde değerlendirmeye alınmamıştır.



Şekil 3.13. *T. thermophila* B10 Klonunun Toplam Çözünür Proteinlerinin Ni-NTA ile Afinitik Saflaştırılan ve Konsantre Edilen Elüsyonlarının SDS-PAGE ve Western Blot Analizi. **A.** Konsantre Edilmiş Toplam Elüsyon Örneklerinin SDS PAGE Görüntüsü. 1: Negatif Kontrol CU428 Çözünür Toplam Protein (T.P). 2: Deney Grubu B10 Toplam Çözünür Protein. 3. B10 Konsantre Elüsyonlar (16-30). 4. DTT Eklenmiş Konsantre Elüsyonlar K. Pozitif Kontrol 1 µg (rhGH-H5916). M: Precision Plus Prestained (Thermo -26619). Örnekler 1:1 hacimde yükleme tamponu ile karıştırılarak 5'er dakika kaynatılarak 20 µl eşit hacimde yüklenmiştir. Yürütme: 80V. Boyama: 1 saat Comassie Blue. Jel Kon: %5-%12. **B.** Konsantre Edilmiş Toplam Elüsyon Örneklerinin Western Blot Membran Görüntüsü. Bloklama: %5 Süttozu ile Gece Boyu, 1.cil Antikor: GH-1/2 Antikoru, (Santa Cruz-3678), Rabbit Polyclonal 1:200, 1 saat inkübasyon, 2.cil Antikor: 1:10000 (Genescript A00098) HRP Konjuge Anti-Rabbit ,1 saat inkübasyon, Görüntüleme: TMB Substratı ile 15 dk.

3.6.2. *T. thermophila* CU428 pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT / H3 kodlu klonunun protein ifade analizi bulguları

Hsp70.2(minus) promotorlu rekombinant E.R sinyalli hGH dizisi içeren pNeo4 genom entegrasyon vektörünün transforme edildiği diğer transformant grubu olan *T. thermophila* H3 klonunda daha önce elde edilen genomik DNA ve cDNA bulgularının pozitif olmasına rağmen protein analizleri için gerçekleştirilen SDS-PAGE ve anti-hGH antikoru ile gerçekleştirilen Western Blot analizinde, hipotez açısından anlamlı bir bant belirlenememiştir (EK-40).

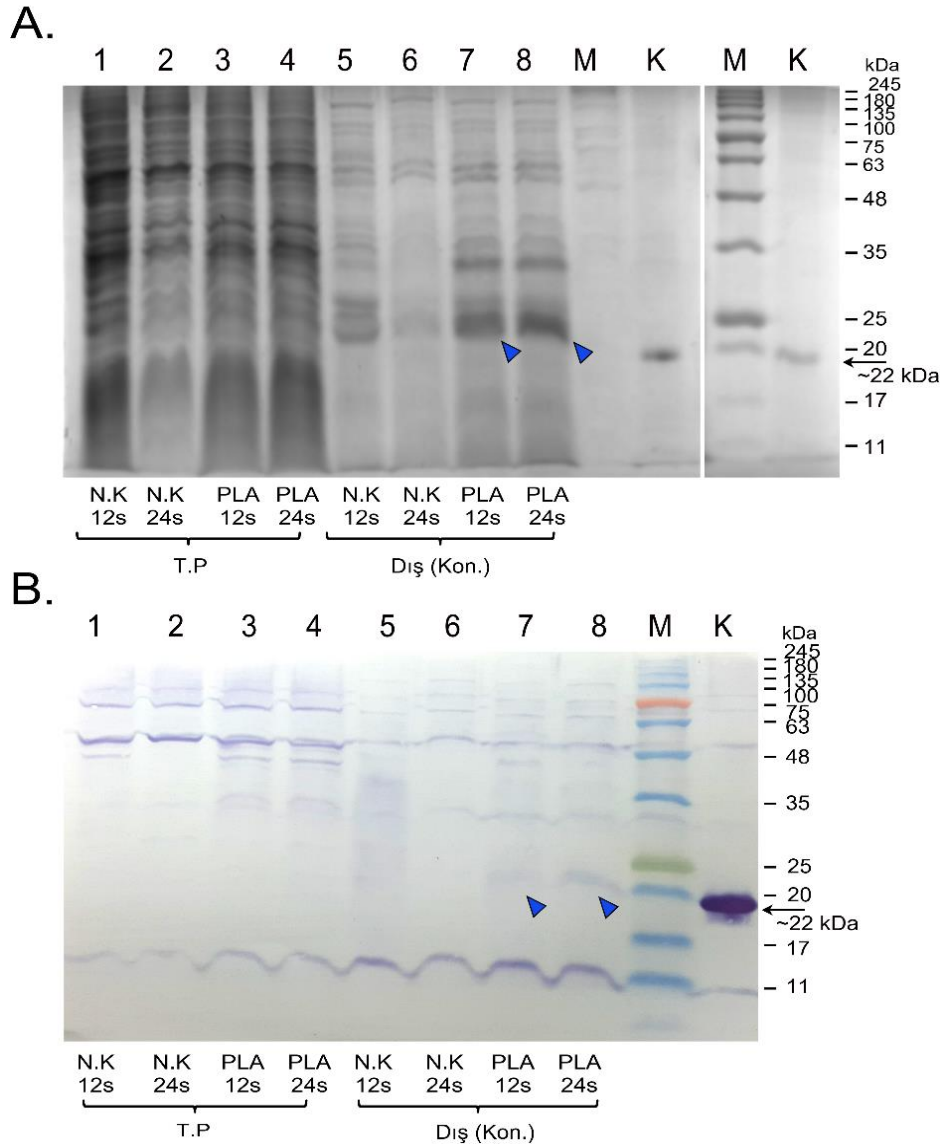
3.6.3. *T. thermophila* CU428 pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT / D kodlu klonunun protein ifade analizi bulguları

Hsp70.2(plus) promotoru kontrolünde E.R sinyalli hGH dizisi içeren ve yine pNeo4 genom entegrasyon sisteminden elde edilen transformant grubu -D klonu- hücrelerinde gerçekleştirilen SDS-PAGE analizinde hedef bir bant belirlenenmiş anti-hGH antikoru ile gerçekleştirilen Western Blot analizlerinde, membranlar üzerinde pozitif kontrol harici herhangi bir bandın yer almadığı anlaşılmış ve transformant grubundan da hipotez açısından anlamlı bir veri elde edilememiştir (EK-40).

3.6.4. Ekstrakromozomal pIGF vektörlü *T. thermophila* konjugatif transformantlarında protein ifade analizi

Ekstrakromozomal vektör yaklaşımı, bir önceki 45 kopyalı genom entegrasyon yönteminden farklı olarak, halkasal vektör üzerinde yaklaşık 10.000 kopyaya çıkabilen orjin ile CdCl₂ ile indüklenebilir MTT1 promotoruna sahiptir. Ekstrakromozomal vektör sistemi ile büyüme hormonunun *T. thermophila* 'da rekombinant üretimi için hazırlanan hGH E.R Sinyalli ve PLA1 (kontrol salgılatma) dizili, iki ayrı pIGF-E. R Sinyal-HGH-6xHistidin ve pIGF-PLA1-HGH-6xHistidin vektörü klonlama aşamaları ile üretilmiş (EK-12) ve konjugatif hücrelere biyolistik transformasyonla transforme edilmiştir. Transformasyon sonucu elde edilen "Bulk (toplam transformant havuzu)" transformantlarda SDS PAGE ve Western Blot analizleri tamamlanmıştır. İlk aşamada kontrol grubu PLA1 sinyalli vektörü içeren transformant hücrelerin 12, 24 ve 48 saat süre

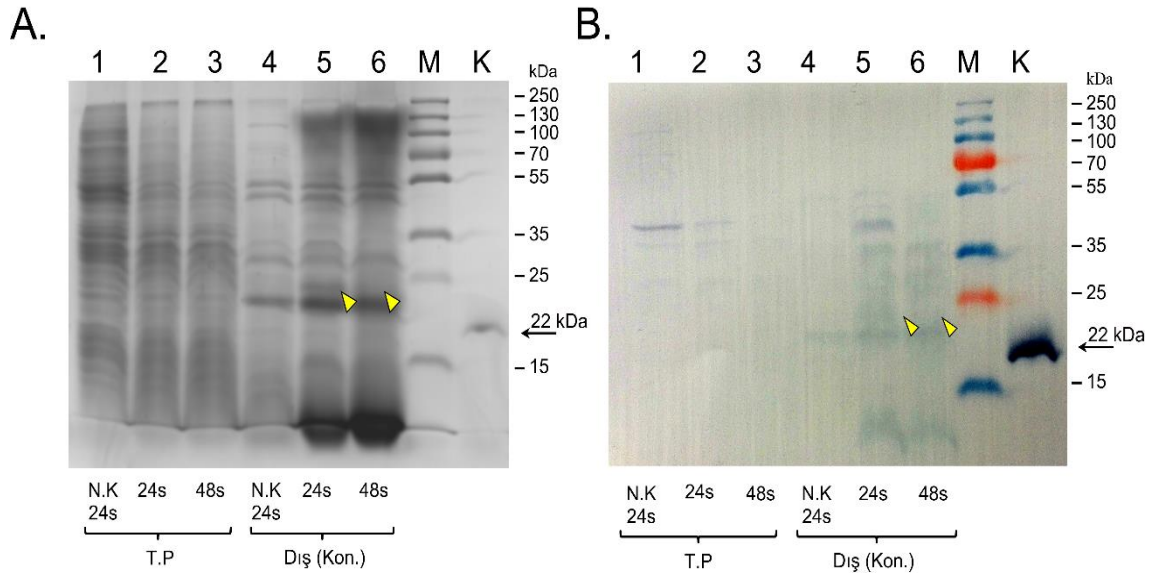
ile 2 µg/ml CdCl₂ ile indüklenmesinden toplanan hücrelerde protein analizleri gerçekleştirilmiş olup indüklemekten sonraki 12. ve 24. saatlik hücrelerden “hücre içi toplam protein” ve konsantre dış ortam protein örnekleri SDS yükleme tamponu ile kaynatılarak, jele yüklenmiştir. SDS-PAGE jeline yüklenen toplam protein ve 12. ve 24. saatlik dış ortam örneklerinde beklenen hedef rekombinant hGH büyüklüğü (sinyal dizisi kesilmiş ve 6X Histidin takısı içeren) olan 23 kDa’ ya eş büyüklükte olan hem 12. (Şekil 3.14-A, kuyu 7) ve hem de 24. saat (Şekil 3.14-A, kuyu 8) dış ortam örneklerinde protein bandı (mavi ok) görülmüş (Şekil 3.14-A, kuyu 7), aynı bantlar Anti-hGH antikoru ile yapılan Western Blot analizinde de elde edilmiştir (Şekil 3.14-B, kuyu 7 ve 8). Vektör içermeyen negatif kontrol örneklerinin 12. ve 24. saatlik dış ortam yüklemelerinde yaklaşık 23 kDa’lık bu protein bulunmamaktadır (Şekil 3.14-A ve B, kuyu 5 ve 6).



Şekil 3.14. *T. thermophila* pIGF-PLA1-HGH-6xHistidin Vektörlü Transformantlarda CdCl_2 İndüksiyonu Sonrası Protein Üretim Analizi. **A.** Protein Örneklerinin SDS-PAGE Analizi. **B.** Protein Örneklerinin Western Blot Analizi. 1. Negatif Kontrol CU428 12 saat indüklenmiş Toplam Protein (T.P). 2: Negatif Kontrol CU428 24 saat indüklenmiş T.P. 3: Deney Grubu 24 saat indüklenmiş T.P. 4: Deney grubu 48 saat indüklenmiş T.P. 5: Negatif kontrol 12 saat indüklenmiş dış ortam (Dış O.). 6: Negatif Kontrol 24 saat indüklenmiş Dış O. 7: Deney Grubu 12 saat indüklenmiş Dış O., 8: Deney Grubu 24 saat indüklenmiş Dış O. M: Blue Elf Prestained Marker (PS-105). K: Pozitif Kontrol (Humatrope Büyüme Hormonu, 1 μg . Bloklama: 1 saat oda sıcaklığı, %5 Süt Tozu. 11.cil Antikor: GH-1/2 Antikoru, (Santa Cruz-3678), Rabbit Polyclonal 1:1000 Gece Boyu +4 derecede. 2.cil antikor 1:10.000, 1 saat oda sıcaklığı. Görüntüleme: TMB ile 15 dk.

Araştırmanın “hipotezini” sınanmasında kullanılan *T. thermophila* transformant grubu pIGF-E.R Sinyal-hGH-6xHistidin vektörünü taşımakta olup 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CdCl_2 ile indüklemesi sonrası 24. ve 48. saatlerde elde edilen hücrelerden hücre içi toplam protein ve dış ortam proteinlerinin konsantre örnekleri, SDS-PAGE ve Western Blot ile analiz edilmiştir. Şekil 3.15-A’nın 5 ve 6 no’lu kuyularında, 24. ve 48. saatlerin dış ortam örneklerinde 23 kDa büyüklüğünde (sinyalsiz salgılatılan rekombinant hGH’nin beklenen büyüklüğünde) bir protein bandı tespit edilmiştir (sarı ok). Vektörsüz negatif kontrol

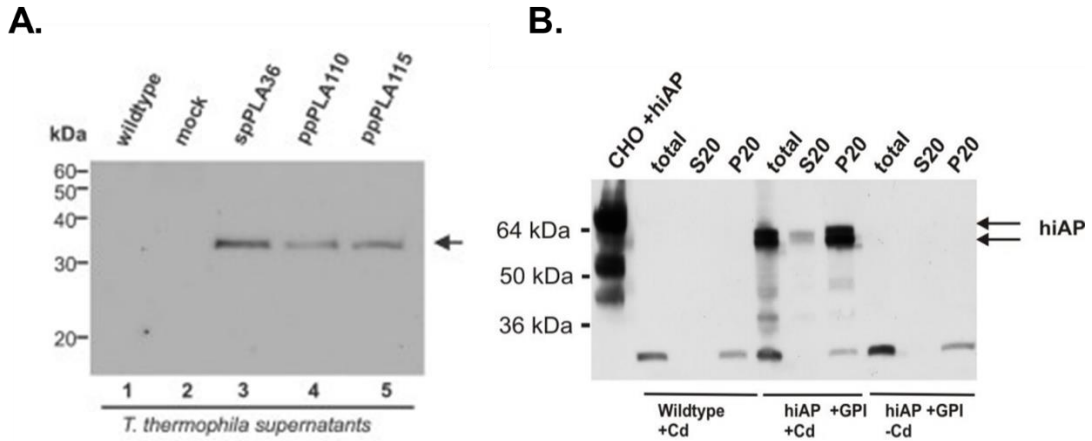
hücrelerinin 24. saatine ait dış ortam protein yüklemesinde SDS-PAGE ve anti-hGH antikoruna ile yapılan Western Blot analizinde bu büyüklükte bir bant bulunmamaktadır (Şekil 3.15-A ve B, kuyu 4). Anti-hGH antikoruna ile dış ortamda oluşan 23 kDa'lık bantlar 24. saat dış ortamda daha fazla iken 48. saat örneklerinde miktar olarak azalmaktadır. PLA1'li ve hGH Sinyal dizili bu iki deney grubunun proteinlerinin birincil anti-Histidin antikoruna ile Western Blot analizine göre ise (EK-42), sadece PLA1'li deney grubunda 23 kDa'lık bir protein, zayıf olarak toplam protein örneği içinde saptanmıştır (EK-42, Turuncu ok). Elde edilen bantların MS-MALDI-TOF analizleri ile kesin olarak teyit edilmemesine karşılık hem PLA1 sinyal dizisinin hem de hGH'nin kendi sinyal dizisinin işlenmesiyle ilgili Western Blot analiz bulguları; hipoteze göre dış ortamda beklendiği gibi 23 kDa'lık protein bandının elde edilmesi, hipotezin kabul edilebileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 3.15. *T. thermophila* pIGF-ERSinyal-HGH-6xHistidin Vektörlü Transformantlarda $CdCl_2$ İndüksiyonu Sonrası Protein Üretim Analizi. A. Protein Örneklerinin SDS-PAGE Analizi B. Protein Örneklerinin Western Blot Analizi 1. Negatif Kont CU428 24 saat indüklenmiş çözünür toplam protein. 2. Deney grubu 24 saat indüklenmiş toplam protein. 3. Deney Grubu 48 saat indüklenmiş toplam protein. 4. Negatif kontrol 24 saat indüklenmiş dış ortam (k). 5. Deney Grubu 24 saat indüklenmiş dış ortam (k). 6. Deney grubu 48 saat indüklenmiş dış ortam (k). M: Blue Elf Prestained Marker PS-105. K: Pozitif Kontrol (Humatrope Büyüme Hormonu, 1 μ g). Bloklama: 1 saat oda sıcaklığı, %5 Süt Tozu. 1.cil Antikor: GH-1/2 Antikoru (Santa Cruz-3678), Rabbit Polyclonal 1:1000 Gece Boyu +4 derecede. 2.cil antikor: 1:10000 (Genescript A00098) HRP Konjuge Anti-Rabbit 1:10.000, 1 saat oda sıcaklığı. Görüntüleme: TMB ile 15 dk.

4. TARTIŞMA

2006 yılında, *Tetrahymena thermophila*'nın Fosfolipaz A1 enziminin PLA1 sinyal dizisi ilk kez bir insan proteini olan DNazI enziminin N-terminal ucuna takılarak, bu enzimin hücre dışına salgılanması sağlanmıştır [15] (Şekil 4.1). 2011 yılında ise insan alkalın fosfataz enziminin E.R. sinyal dizisinin *T. thermophila* tarafından kullanılabileceği, yani transle edilmekte olan proteinin endoplazmik retikuluma yönlendirilip orada translasyonu gerçekleştirilebileceği, E.R. sinyal peptidi kesilebileceği ve proteine ait GPI çapa dizisini yine *Tetrahymena*'nın kullanmasıyla, rekombinant proteinin hücre yüzeyine glikolizasyonlu yapıda lokalize edilebileceği bildirilmiştir [16].



Şekil 4.1. *T. thermophila*'da Sinyal Dizisi İşleme Kapasitesine Dair Literatürdeki Çalışmalar. **A.** İnsan DNazI Enziminin *T. thermophila* PLA1 Sinyal Dizisi Kullanılarak Hücre Dışına Salgılanması [15]. 3 farklı baz çifti uzunluğunda PLA1 Sinyal dizisi kullanılarak her 3 tasarımı sinyali dizili rekombinant proteinin hücre dışı ortama salgılandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada 3 nolu kuyuda sınanmış spPLA36 dizisi kullanılmıştır. **B.** İnsan Alkali Fosfataz Proteinin E.R Yönlendirme ve GPI Çapa Sinyal Dizisi ile *T. thermophila* hücre yüzeyine lokalizasyonun gösterilmesi. GPI çapası eklenen ve sinyal dizisi üzerinden hücre dışına salgılandıktan sonra yüzeye lokalize olan rekombinant proteine ait Western Blot analizi [16].

İnsan büyüme hormonunun 26 aminoasitlik sinyal peptid dizisi (MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA) ile *T. thermophila* FosfolipazA1 proteinine ait 36 aminoasitlik sinyal peptid ve spacer dizisinin birlikte (MNKTLILALVVVLALTATTTLVAFHNHSHNIRVDQDP T-coffee programı kullanılarak korunmuşluk analizi gerçekleştirildiğinde, her iki sinyal dizisi arasında ortalama bir korunmuşluğun olduğu fakat, Treonin (T) (Polar) ve Lösin (L) (İzolösin olarak da temsil edilmekte), Alanin (A) (Hidroforbik) aminoasitleri açısından benzer bir organizasyonun olduğu görülmektedir. PLA1 sinyal dizisinin *T. thermophila* tarafından tanınip işlenebilmesi va her iki sinyal dizisi açısından hidroforbik aminoasit gruplarının benzer

pNeo4 vektörlü (45 kopyalı sistem) B10 transformant grubundan elde edilen hücre içi çözünür toplam protein örnekleri ve bu örneklerin nikel afinite kolonu saflaştırmasına sit elüsyonlarda toplam 4 adet aday protein bandı elde edilmiştir (Şekil 3.12-B ve Şekil 3.13-B). Bu 4 bantlardan 3 tanesi elüsyon örneklerinde elde edilmiş olup büyüklük olarak hem sinyalin işlendiği (hGH + His = 23 kDa) hem de işlenmediği (Sinyal + hGH + His = 25,77 kDa) durumdaki rekombinant protein teorik protein büyüklüğüne yakındır. Bu 4 farklı bant, rekombinant proteinin üretildiği durumda henüz sinyalin işlenmediği veya işlendikten sonra henüz hücre dışına salgılanmadığını işaret etse de bu grupta dış ortam analizleri gerçekleştirilmediği ve Anti-Histidin antikoru ile ilave protein analizi yapılmadığı için elde edilen bantların kesin olarak hedef proteine ait olduğu çıkarımı yapılamamış ve hipotez açısından anlamlı veri elde edilememiştir.

Genom entegrasyon deney grubunda düşük protein üretimi veya yokluğunun, genom entegrasyon sisteminin 45 kopyaya dayanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Düşük kopya sisteminin bu kısıtlayıcı üretim durumu, 10.000 kopya sistemli ekstrasözomal pIGF vektör sistemi ile aşılabilmektedir. Kontrol olarak hGH'nin PLA1 sinyalli (hGH'nin kendi sinyal dizisi yerine) ve hGH'ye ait E.R sinyal dizili kasetler üzerinden ekstrasözomal vektörlü üretim sistemi çalışmaya entegre edilmiştir. Bunun amacı, kasetin yer aldığı vektörün kopya sayısının kısıtlayıcı rolü ve HSP70.2 (minus ve plus) promotorunda ribozom tarafından kullanılabilir mRNA kopya sayısının kısıtlayıcı faktör olduğunun düşünülerek bu kısıtların ortadan kaldırılmasını sağlamaktır. Belirtilen bu nedenlerle; 10.000 kopyalı orjin ve CdCl₂ ile indüklenebilir MTT1 promotoru içeren dairesel pIGF vektör sistemi kullanılmıştır pIGF vektöründen gerçekleştirilen PLA1'li veya hGH sinyalli protein üretim bulgularına göre, her iki grupta da yaklaşık 23 kDa'lık sinyal dizisi kesilmiş büyüme hormonu proteini büyüklüğüne yakın protein bandı dış ortam örneklerinde belirlenmiştir (Şekil 3.14, 3.15). Aynı protein örneklerinin anti-Histidin antikoru ile analizi sonucu hücre içi ortamından saflaştırılan toplam proteinler içinde 23 kDa'lık bir proteinin varlığı belirlendiğinden (EK-42), *T. thermophila*'nın hGH'nin sinyal dizisini işleyerek hücre dışı ortama salgılayabileceği sonucuna varılmıştır. Literatürde *T. thermophila*'da üretilen insan proteinlerinin biyoreaktör şartlarında üretildiği ve yüksek optimizasyona gerektirdiği göz önüne alındığında [15], bu çalışmada elde edilen verilerin güçlendirilebilmesi için biyoreaktör optimum koşulları ile rekombinant protein üretiminin tekrarlanması ve protein çalışmalarındaki saflaştırma adımlarının iyileştirilmesi adımları (çift afinitik takı veya antikor kullanılarak saflaştırma) çalışmanın sonraki aşamalarına dair öneriler olarak ortaya çıkmıştır.

5. SONUÇ

Tez kapsamında *T. thermophila*'nın hGH'nin sinyal dizisini kullanabileceği hipotezi sınınanarak, ekstrakromozomal vektörlü transformantların protein havuzuna ait dış ortam örneklerinde 23 kDa'lık sinyali kesilmiş bir proteinin varlığı iki bağımsız deneysel tasarım ile gösterilmiştir. Sonuç olarak; *T. thermophila*'nın hGH'nin sinyal dizisini kesip rekombinant proteini hücre dışı ortama salgılayabileceği anlaşılmıştır. Daha sonraki çalışmalar için; hedef protein afinitik saflaştırılması ile daha yüksek saflıkta elde edilmesi sağlanarak proteinin MALDI-TOF MS ile kimliklendirilmesi ve Edman Degredasyonu analizi ile hGH'nin *T. thermophila* tarafından işlenen N-terminal ucunun aminoasit dizisinin ortaya çıkarılması ve organizmanın kesim kapasitesi hGH sinyali için tanımlanması sağlanmalıdır.

KAYNAKÇA

- [1] Donna, M. Cassidy-Hanley. (2012). Tetrahymena in the laboratory: strain resources, methods for culture, maintenance, and storage. *Methods in cell biology*, 109, 237.
- [2] Frankel, J. (1999). Cell biology of Tetrahymena thermophila. *Methods in Cell Biology*, 62, 27-125.
- [3] Eisen, J. A., Coyne, R. S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J. R., ... Delcher, A. L. (2006). Macronuclear genome sequence of the ciliate Tetrahymena thermophila, a model eukaryote. *PLoS Biol*, 4(9), 1620–1642.
- [4] Xiong, J., Lu, X., Zhou, Z., Chang, Y., Yuan, D., Tian, M., ... Miao, W. (2012). Transcriptome analysis of the model protozoan, Tetrahymena thermophila, using deep RNA sequencing. *PloS one*, 7(2), e30630.
- [5] Collins, K., ve Gorovsky, M. A. (2005). Tetrahymena thermophila. *Current Biology*, 15(9), R317-R318.
- [6] Blackburn, E. H., ve Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *Journal of molecular biology*, 120(1), 33-53.
- [7] Yao, M. C., ve Yao, C. H. (1981). Repeated hexanucleotide CCCCAA is present near free ends of macronuclear DNA of Tetrahymena. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7436-7439.
- [8] Greider, C. W., ve Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(6205), 331-337.
- [9] Herschlag, D., ve Cech, T. R. (1990). Catalysis of RNA cleavage by the Tetrahymena thermophila ribozyme. 2. Kinetic description of the reaction of an RNA substrate that forms a mismatch at the active site. *Biochemistry*, 29(44), 10172-10180.
- [10] Shimizu, T., Furusawa, K., Ohashi, S., Toyoshima, Y. Y., Okuno, M., Malik, F., Vale, R. D. (1991). Nucleotide specificity of the enzymatic and motile activities of dynein, kinesin, and heavy meromyosin. *The Journal of cell biology*, 112(6), 1189-1197.

- [11] Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, 84(6), 843-851.
- [12] Gaertig, J., Gao, Y., Tishgarten, T., Clark, T. G., Dickerson, H. W. (1999). Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nature biotechnology*, 17(5), 462-465.
- [13] Peterson, D. S., Gao, Y., Asokan, K., Gaertig, J. (2002). The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and biochemical parasitology*, 122(2), 119-126.
- [14] Clark, T. G., Gao, Y., Gaertig, J., Wang, X., Cheng, G. (2001). The I-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI-Anchored Proteins. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(3), 332-337.
- [15] Weide, T., Herrmann, L., Bockau, U., Niebur, N., Aldag, I., Laroy, W., ... Hartmann, M. W. (2006). Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. *BMC biotechnology*, 6(1), 19.
- [16] Aldag, I., Bockau, U., Rossdorf, J., Laarmann, S., Raaben, W., Herrmann, L., ... Hartmann, M. W. (2011). Expression, secretion and surface display of a human alkaline phosphatase by the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *BMC biotechnology*, 11(1), 11.
- [17] Straus, J. W., Migaki, G. ve Finch, M. T. (1992). An assessment of proteolytic enzymes in *Tetrahymena thermophila*. *The Journal of protozoology*, 39(6), 655-662.
- [18] Leader, B., Baca, Q. J. ve Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature reviews Drug discovery*, 7(1), 21-39.
- [19] Pérez-Ibave, D. C., Rodríguez-Sánchez, I. P., de Lourdes Garza-Rodríguez, M., Barrera-Saldaña, H. A. (2014). Extrapituitary growth hormone synthesis in humans. *Growth Hormone & IGF Research*, 24(2), 47-53.
- [20] Baumann, G. P. (2009). Growth hormone isoforms. *Growth Hormone & IGF Research*, 19(4), 333-340.
- [21] Strobl, J. S. ve Thomas, M. J. (1994). Human growth hormone. *Pharmacological Reviews*, 46(1), 1-34.

- [22] Cázares-Delgadillo, J., Ganem-Rondero, A. ve Kalia, Y. N. (2011). Human growth hormone: new delivery systems, alternative routes of administration, and their pharmacological relevance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(2), 278-288.
- [23] Laurence, J., Grimison, B. ve Gonenne, A. (1992). Effect of recombinant human growth hormone on acute and chronic human immunodeficiency virus infection in vitro. *Blood*, 79(2), 467-472.
- [24] Polgreen, L. E., Thomas, W., Orchard, P. J., Whitley, C. B., Miller, B. S. (2014). Effect of recombinant human growth hormone on changes in height, bone mineral density, and body composition over 1–2years in children with Hurler or Hunter syndrome. *Molecular genetics and metabolism*, 111(2), 101-106.
- [25] Dattani, M. ve Preece, M. (2004). Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment. *The Lancet*, 363(9425), 1977-1987.
- [26] Elio, F., De Filippis, V., Gatti, R. ve Spinella, P. (2006). Growth hormone isoforms and segments/fragments: molecular structure and laboratory measurement. *Clinica chimica acta*, 364(1), 67-76.
- [27] Ascacio-Martínez, J. A. ve Barrera-Saldaña, H. A. (2012). Genetic engineering and biotechnology of growth hormones. INTECH Open Access Publisher.
- [28] Bolt, G., Kristensen, C., Boel, E., Lundgaard, T. V. (2009). U.S. Patent Application No. 13/000,266.
- [29] Flintegaard, T. V., Thygesen, P., Rahbek-Nielsen, H., Levery, S. B., Kristensen, C., Clausen, H., Bolt, G. (2010). N-glycosylation increases the circulatory half-life of human growth hormone. *Endocrinology*, 151(11), 5326-5336.
- [30] Tuteja, R. (2005). Type I signal peptidase: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 441(2), 107-111.
- [31] Kim, M. J., Park, H. S., Seo, K. H., Yang, H. J., Kim, S. K., Choi, J. H. (2013). Complete solubilization and purification of recombinant human growth hormone produced in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 8(2), e56168.
- [32] Junnila, R. K., Wu, Z. ve Strasburger, C. J. (2013). The role of human growth hormone's C-terminal disulfide bridge. *Growth Hormone & IGF Research*, 23(3), 62-67.

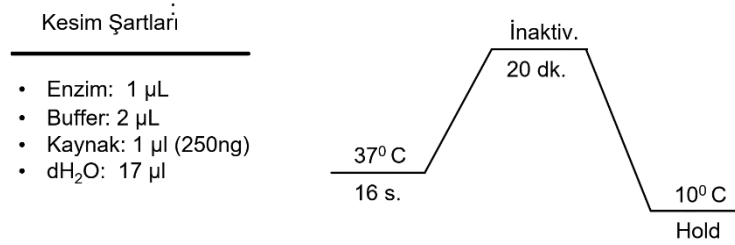
- [33] Reh, C. S. ve Geffner, M. E. (2010). Somatotropin in the treatment of growth hormone deficiency and Turner syndrome in pediatric patients: a review. *Clinical pharmacology: advances and applications*, 2, 111.
- [34] Salim, H. M., Ring, K. L. ve Cavalcanti, A. R. (2008). Patterns of codon usage in two ciliates that reassign the genetic code: *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*. *Protist*, 159(2), 283-298.
- [35] Wuitschick, J. D. ve Karrer, K. M. (2000) "Codon usage in *Tetrahymena thermophila*", *Methods Cell Biol*, 62, 565–568.
- [36] Yilmaz, G. ve Arslanyolu, M. (2015). Efficient expression of codon-adapted affinity tagged super folder green fluorescent protein for synchronous protein localization and affinity purification studies in *Tetrahymena thermophila*. *BMC biotechnology*, 15(1), 22.
- [37] Mochizuki, K. (2008). High efficiency transformation of *Tetrahymena* using a codon-optimized neomycin resistance gene. *Gene*, 425(1), 79-83.
- [38] Shang, Y., Song, X., Bowen, J., Corstanje, R., Gao, Y., Gaertig, J., Gorovsky, M. A. (2002). A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 3734-3739.
- [39] Feng, L. F., Chang, Y., Yuan, D. X., & Miao, W. (2011). Expression analysis of 5 hsp70 genes in *Tetrahymena thermophila*. 32(3). 267–276.
- [40] Yu, T., Barchetta, S., Pucciarelli, S., La Terza, A., Miceli, C. (2012). A novel robust heat-inducible promoter for heterologous gene expression in *Tetrahymena thermophila*. *Protist*, 163(2), 284-295.
- [41] Merriam, E. V. ve Bruns, P. J. (1988). Phenotypic assortment in *Tetrahymena thermophila*: assortment kinetics of antibiotic-resistance markers, tsA, death, and the highly amplified rDNA locus. *Genetics*, 120(2), 389-395.
- [42] Brito, P. H., Guilherme, E., Soares, H., Gordo, I. (2010). Mutation accumulation in *Tetrahymena*. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 354.
- [43] Ruehle, M. D., Orias, E. ve Pearson, C. G. (2016). *Tetrahymena* as a unicellular model eukaryote: genetic and genomic tools. *Genetics*, 203(2), 649-665.

- [44] Chalker, D. L. (2012). Transformation and strain engineering of *Tetrahymena*. *Methods Cell Biol*, 109, 327-345.
- [45] Winey, M., Stemm-Wolf, A. J., Giddings, T. H., Pearson, C. G. (2012). Cytological analysis of *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol*, 109, 357-378.
- [46] Sweet, M. T. ve Allis, C. D. (2006). Transformation of *Tetrahymena thermophila* by Electroporation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(4), pdb-prot4502.
- [47] Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., Royall, E., Belsham, G. J., Roberts, L. O., Shatsky, I. N. (2005). A cross-kingdom internal ribosome entry site reveals a simplified mode of internal ribosome entry. *Molecular and cellular biology*, 25(17), 7879-7888.
- [48] Koonin, E. V., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Krylov, D. M., Makarova, K. S., ... Rogozin, I. B. (2004). A comprehensive evolutionary classification of proteins encoded in complete eukaryotic genomes. *Genome biology*, 5(2).
- [49] Dorokhov, Y. L., Skulachev, M. V., Ivanov, P. A., Zvereva, S. D., Tjulkina, L. G., Merits, A., ... Atabekov, J. G. (2002). Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5301-5306.
- [50] Hernández, G., Altmann, M., ve Lasko, P. (2010). Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences*, 35(2), 63-73.
- [51] Shibuya, N., ve Nakashima, N. (2006). Characterization of the 5' internal ribosome entry site of *Plautia stali* intestine virus. *Journal of general virology*, 87(12), 3679-3686.
- [52] Yao, M. C., Yao, C. H., Halasz, L. M., Fuller, P., Rexer, C. H., Wang, S. H., ... Chalker, D. L. (2007). Identification of novel chromatin-associated proteins involved in programmed genome rearrangements in *Tetrahymena*. *Journal of cell science*, 120(12), 1978-1989.

EKLER

EK-1. Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonları

Çalışmada klonlama ve restriksiyon kesim profili analizlerini ve klonlama deneylerini gerçekleştirebilmek için DNA parçalarının ve vektörlerinin ilgili restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonları gerçekleştirilmektedir. Tavsiye edilen ünite enzim miktarı kesilecek DNA'nın mikrogramına göre hesaplanmakta olup bu çalışmadaki reaksiyonlarda 1 µg DNA için 1 ünite (1 µl) enzim kullanılmıştır. Her bir reaksiyon için optimize edilen kesim protokolü şu şekildedir:



Şekil EK-1.1. Restriksiyon Endonükleaz Kesim Reaksiyonu Şartları

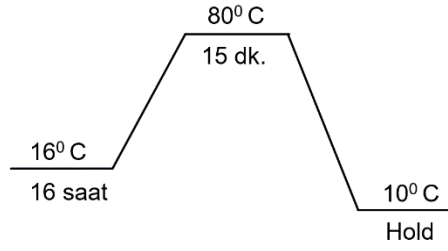
Çiftli kesim reaksiyonlarındaki enzim miktarları için üretici firmanın tavsiye ettiği oranlarda enzim/DNA oranları kullanılmaktadır. Kesim reaksiyonu şartları ise aynıdır. Enzim inhibisyonu için, 80 derecede tüm restriksiyon enzimleri inhibe olduklarından bu sıcaklık tercih edilmektedir.

EK-2. Ligasyon Reaksiyonu Şartları

Çalışmada üretilen rekombinant DNA kasetlerinin vektörlere yerleştirilebilmesi için kaset ve vektör DNA'ları aynı restriksiyon enzimleri ile kesilerek klonlamaya hazır hale getirilmektedir. Restriksiyon kesimi tamamlanan insert ve vektörün birleşmesi için de ligasyon reaksiyonu gerçekleştirilmektedir. Reaksiyonda gerekli olan DNA hesabı vektör/insert büyüklüğü ve ligasyon oranını içeren bir formül ile hesaplanmakta olup pNeo4 vektörleri için 3:1, pIGF vektörleri için 6:1 oranı kullanılmıştır. Deneysel olarak takip edilen ligasyon reaksiyonu şu şekildedir:

Ligasyon Şartları:

- İnsert: 1µL
- Vektör: 1µL
- T4 Ligaz Buffer: 2µL
- T4 Ligaz: 1µl (NEB)
- dH₂O: 5 µl



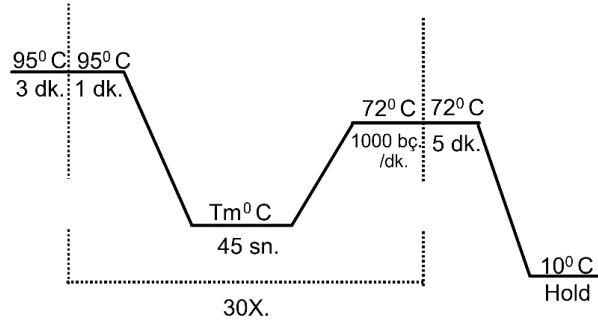
Şekil EK-2.1. Ligasyon Reaksiyonu Şartları (NEB T4 DNA Ligaz İçin)

EK-3. TAQ Polimeraz Koloni PCR Protokolü

Bu çalışmada koloni PCR ve teyit deneylerinde TAQ DNA Polimeraz enzimi tercih edilmiştir. Thermo Scientific EP0402 TAQ Polimeraz enzimi için önerilen protokol şu şekildedir:

TAQ Polimeraz Koloni PCR

- TAQ Buffer: 1,25 µl
- dNTP: 1,0 µl
- MgCl₂: 1,25 µl
- FPrimer: 1,25 µl
- RPrimer: 1,25 µl
- Kalıp: 1,0 µl
- Enzim: 0,15 µl (TAQ)
- dH₂O: 4,35 µl



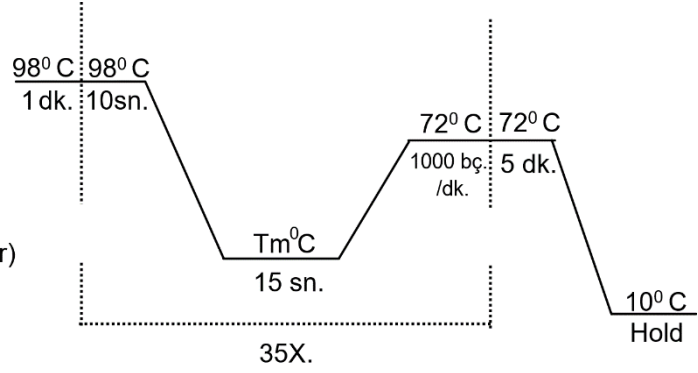
Şekil EK-3.1. TAQ Polimeraz PCR Reaksiyonu

EK-4. PrimeSTAR Enzimi için PCR Şartları

Çalışmada rekombinant üretim için gerçekleştirilen tüm DNA çalışmaları ve PCR aşamalarında PrimeSTAR HF (Takara, R010A) polimeraz enzimi kullanılmıştır. Bu enzimin hatalı baz ekleme aktivitesi düşük olduğundan dolayı DNA dizisindeki mutasyon olasılıkları en aza inmektedir. Bu enzim için önerilen PCR aşamaları şu şekildedir:

PrimeStar PCR Reaksiyonu

- PS Buffer: 5,0 µl
- dNTP: 2,0 µl
- FPrimer: 2,5 µl
- RPrimer: 2,5 µl
- Kalıp: 1,0 µl
- Enzim: 0,2 µl (PrimeStar)
- dH₂O: 11,8 µl



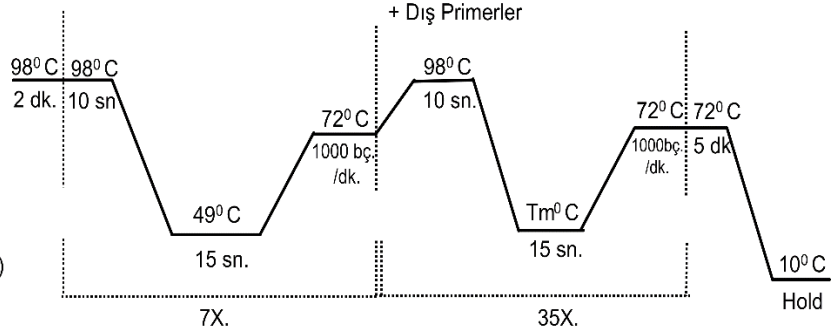
Şekil EK-4.1. PrimeSTAR Polimeraz Enzimi için PCR Şartları

EK-5. Örtüşen PCR Reaksiyonu ile Parçaların Birleştirilmesi (PrimeStar HF)

Çalışmada ihtiyaç duyulan insan büyüme hormonu rekombinant üretim dizisinin oluşturulması için sentetik olarak üretilen kasette örtüşen primerler kullanılarak PCR temelli mutasyonlar gerçekleştirilmiştir. Örtüşen primer çiftleri ile üretilen parçaların PrimeStar Polimeraz enzimi kullanılarak PCR reaksiyonunda birleştirilebilmesi için şu reaksiyon takip edilmiştir:

PCR Birleştirme Reaksiyonu (PrimeStar)

- PS Buffer: 5,0 µl
- dNTP: 2,0 µl
- FPrimer: 2,5 µl
- RPrimer: 2,5 µl
- Kalıp: 1,0 µl
- Kalıp: 1,0 µl
- Enzim: 0,2 µl (PrimeStar)
- dH₂O: 10,8 µl

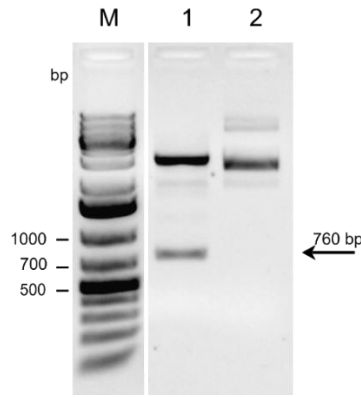


Şekil EK-5.1. Örtüşen DNA Parçalarının PCR Reaksiyonu ile Birleştirilmesi (PrimeStar)

Buna göre ilk 7 döngü primersiz olarak 49 derece sıcaklıkta gerçekleştirilerek örtüşen parçaların birbiri ile bağlanması sağlanmaktadır. 7 döngü sonunda reaksiyona ileri ve geri dış primer çiftleri eklenerek PCR normal şekilde tamamlanır. Reaksiyonda kullanılan kalıp miktarı ürünlerin jeldeki miktarına göre belirlenerek eşit olarak reaksiyona alınmaktadır.

EK-6. Sentetik Dizili pUC57 Vektörünün Transformasyonu ve İncert Saflaştırılması

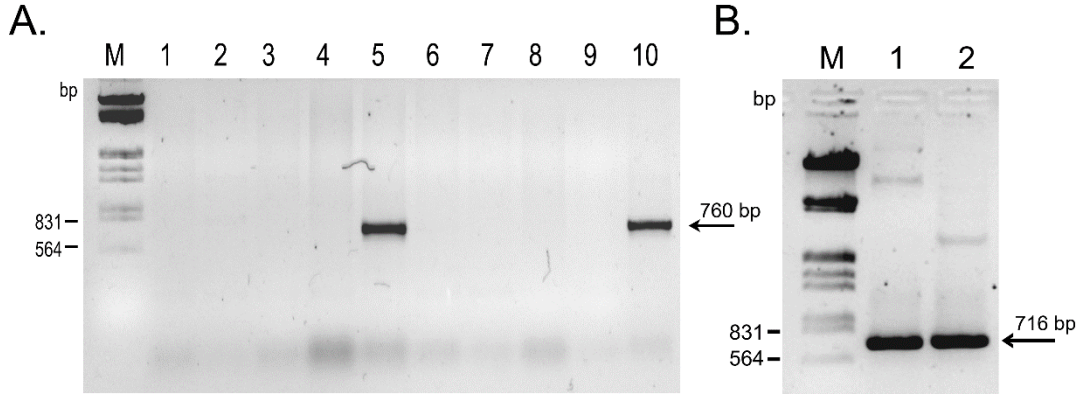
pUC57 vektörü üzerinde temin edilen sentetik dizinin saflaştırılması için, vektör *E. coli* XL1-Blue klonlama konakçısına ısı şoku transformasyonu (EK-14) ile transforme edilmiş ve bu hücrelerden 10 ml LB besiyerine ekim yapılarak plazmit izolasyonu kiti ile (Thermo Sci. Kat No: 0562) plazmit saflaştırılmıştır. Elde edilen plazmitin (puC57-hGH) 200 ng'ı 3 saat süre ile 37°C'de MscI-FseI restriksiyon enzimleriyle çiftli kesime alınarak incert varlığı kontrol edilmiştir (şekil EK-6.1).



şekil EK-6.1. pUC57-hGH vektörü MscI-FseI Kesimi. M: Generuler 1kb plus SM1331. 1: MscI-FseI Kesim Ürünü. 2: Kontrol – pUC57 (Kesilmemiş). Ok: Beklenen ürün (760 bç.). %1 Agaroz Jeli, 80V-40 dk.

Vektörün 760 bç'lik sentetik diziyi içerdği teyit edildikten sonra bu parçanın pNeo4 – Hsp70.2(minus) – MTT vektörüne klonlanması için toplam 1µg vektör üzerinden tekrar MscI-FseI kesim reaksiyonu kurulmuş ve vektörden salınan kaset jelden saflaştırma kiti (Thermo Scientific, Kat No:0691) ile saflaştırılmıştır. Eş zamanlı olarak, Hsp70 promotor ve 3' terminasyon kısımları daha önceden entegre edilen pNeo4-Hsp70-II(minus)-MTT genom entegrasyon vektörü MscI – FseI kesimi ile lineer hale getirildikten sonra vektör jelden saflaştırma kiti yardımı ile saflaştırılmıştır. Elde edilen incertin 21 ng'ı ve lineer pNeo4 vektörünün 50 ng'ı birlikte T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla 65°C'de ligasyon reaksiyonuna alınmıştır. Elde edilen ligasyon ürünlerinin tamamı *E. coli* XL1-Blue kompetent hücrelerine ısı şoku protokolü (EK-14) transforme edilmiş ve elde edilen transformantlar büyüme hormonu dizisi için tasarlanmış FhGHKaset (5'TGGCCAATGGCTACTGGTTCTAGAACTTC3') ve RhGHKaset (5'GGCCGGCCTCATCAGAAACCGC 3') primerleri kullanılarak koloni PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuca göre pozitif transformantlardan 5.ci kuyuya ait koloni (şekil EK-6.2-A) seçilerek hücrelerden plazmit izolasyonu gerçekteşirilmiş ve sentetik

diziye içeren pNeo4-Hsp70(minus)-hGH(sentetik)-MTT vektörü elde edilmiştir. Bu vektörden 30 ng kalıp kullanılarak aynı primer (FGHkaset – RGHkaset) ve aynı reaksiyon şartlarında PCR kontrolü yapılmış ve kasetin vektördeki varlığı teyit edilmiştir (Şekil EK-6.2-B).



Şekil EK-6.2. A: Pozitif *E. coli* Transformantlarının Koloni PCR Analizi. Ok: Beklenen kaset büyüklüğü-760 bç) **B:** pNeo4- Hsp70(minus)- hGH-MTT vektörü ve pUC19 vektörünün PCR Teyidi. (M: *EcoRI* -*HindIII*. 1: Tt-hGH-pNeo4 vektörü. 2: Pozitif Kontrol (pUC57). Ok: Beklenen Ürün (716 bç). %1 Agaroz Jeli, 80V- 40 dk.

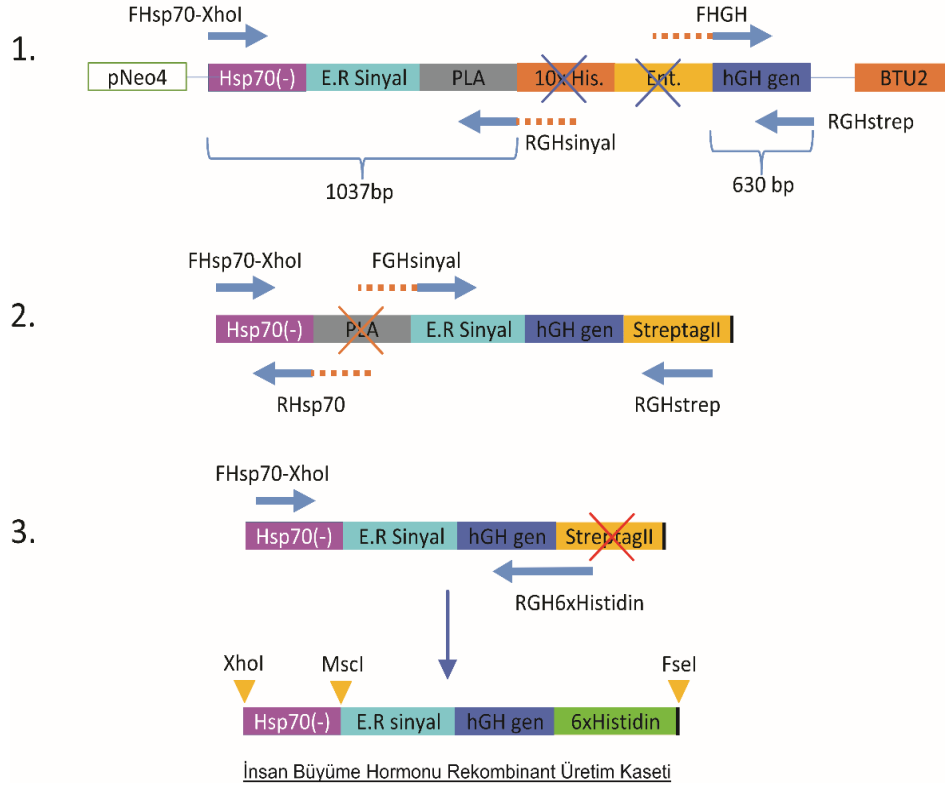
EK-7. pNeo4-Hsp70(minus)-MTT vektörüne Klonlanan Sentetik Dizi Üzerinden Rekombinant Üretim Kasetinin Oluşturulması

Çalışmada ortaya koyulan hipotezi sınamak için sentetik dizi üzerindeki N-terminal 6xHistidin, Enterokinaz ve PLA1 dizilerinin kasetten çıkarılması ve C-terminal 6xHistidin takısının eklenmesi aşamaları örtüşen primerler kullanılarak PCR temelli gerçekleştirilmiştir (EK-5). Bu amaçla, FHsp70-XhoI, RHGHSinyal, FHGH, RGHstrep ve RGH6xHistidin (İlk aşamada kullanılması düşünülen afinite takısı Streptag-II için RGH-Strep primeri kullanılmış, fakat en son aşamada bu takı RGH6xHistidin primeri kullanılarak 6xHistidin olarak revize edilmiştir), FGHHSinyal, RHsp70 örtüşen primer çiftleri tasarlanmıştır (Tablo EK-7.1) (Şekil EK-7.1).

Tablo EK-7.1: hGH Rekombinant Üretim Kaseti Oluşturmak için Gerekli Örtüşen Mutasyon Primerleri (Primerlerin Örtüşen Dizileri Farklı Renkte Gösterilmiştir).

Primer	Dizi	Tm
FHSP70-XhoI	5' CTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTA 3'	60
RHGH-Sinyal	5' AGGAATAGTAGGGAA AGCAGAACCTTCTTGTAACC 3'	62
FHGH	5' ACAAGAAGGTTCTGC TTTCCCTACTATTCTTTATCTA 3'	60
RHGHstrep	5' GCCGGCCTCATCATTTTTTCGAATTGAGGGTGAGACCAGAAA CCGCAAGAACCTTCAA3'	58
RHSP70	5' GTAGCCATTGGCCA TTTTTGTAACCTTTTTTAATTATTTGTTT 3'	62
FGHSinyal	5' AAAAAGTTTACAAAAT GGCCAATGGCTACTGGTTC 3'	62

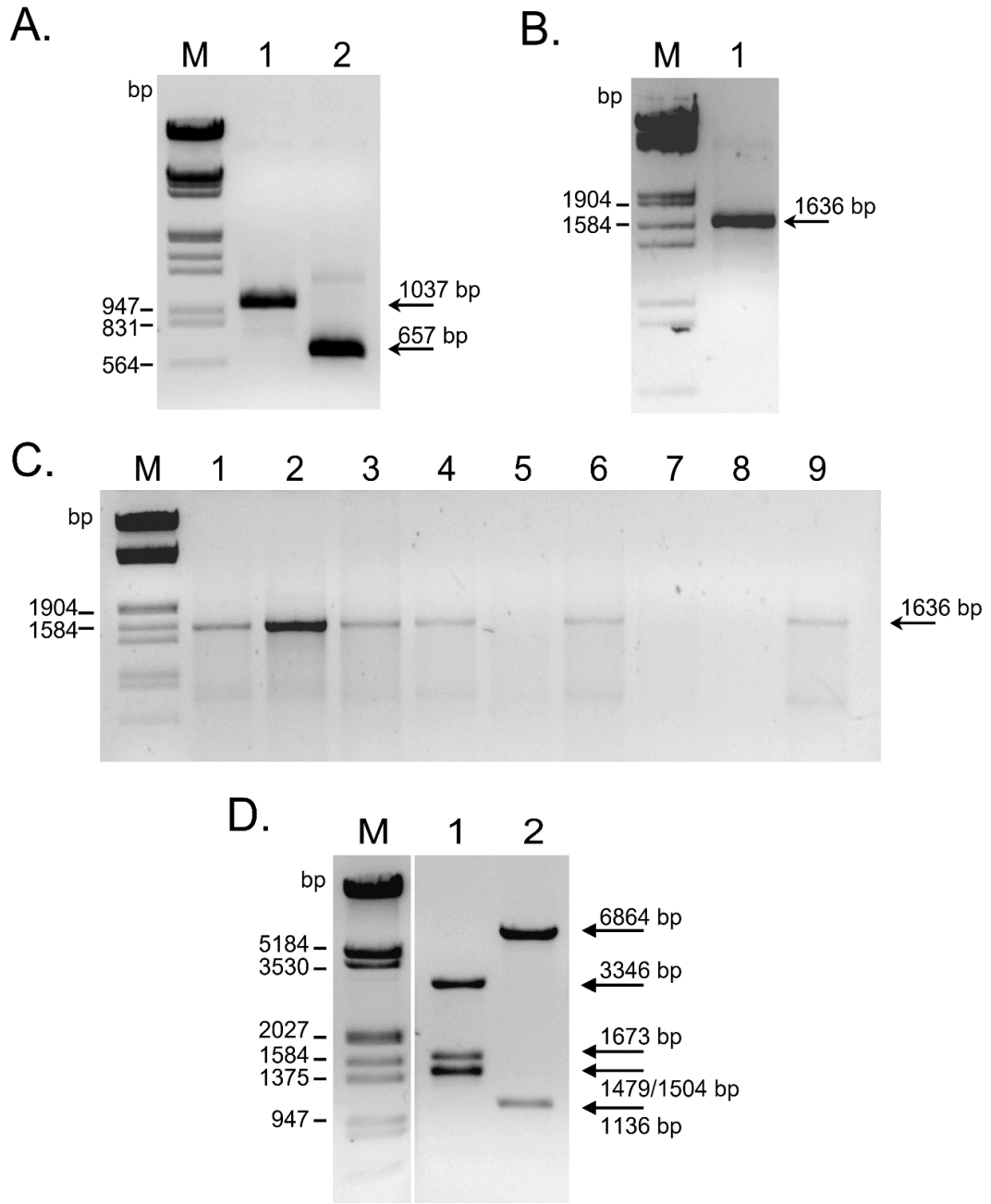
Bu primerlerin kaset ve vektör üzerinde oturduğu kısımlar şu şekildedir:



Şekil EK-7.1. Örtüşen Primerlerin Şematik Gösterimi ve Rekombinant hGH Üretim Kaseti PCR Aşamaları
1. N-terminal 10xHistidin ve Enterokinaz dizilerinin çıkarılması 2. PLA1 dizisinin çıkarılması 3. Streptag-II takısının 6xHistidin ile değiştirilmesi.

EK-8. Sentetik Diziden N-terminal 10xHistidin ve Enterokinaz Dizilerinin Çıkarılması

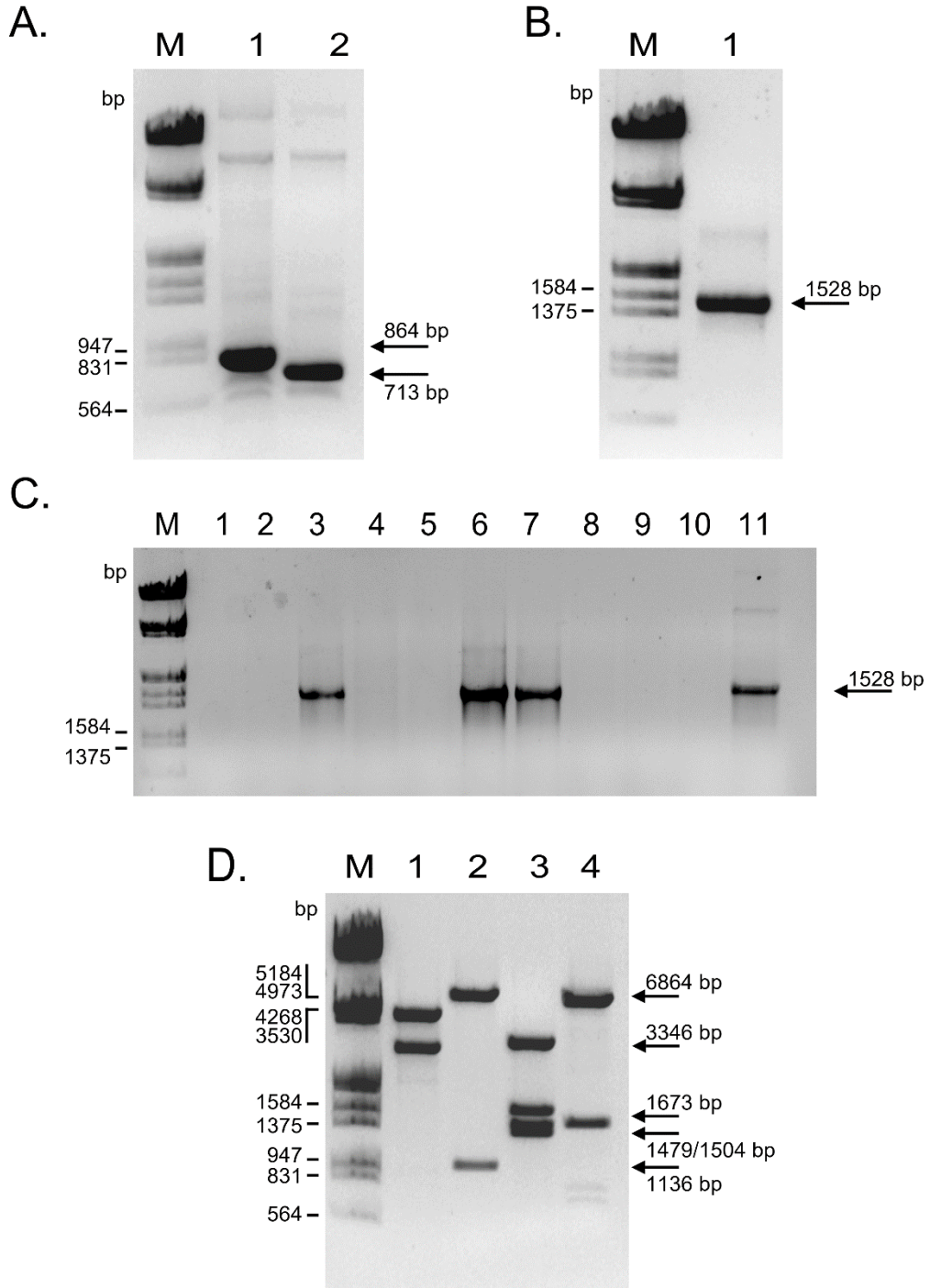
pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH(sentetik)-MTT vektöründen 20 ng kalıp kullanılarak ilk iki parça Fsp70-XhoI ve RHGHSinyal (1.p: 1037 bç.) ile FHGH ve RGHstrep (2.p: 630 bç.) primer çiftleri yardımıyla üretilmiştir (Şekil EK-8.1-A). FHGH ve RHGHSinyal primerleri üzerindeki örtüşen 30 bazlık kısım kullanılarak, bu iki parça dış primerler (FHsp70-XhoI ve RGHstrep) ile PCR birleştirme reaksiyonuna alınmıştır. Buna göre ilk 7 döngü dış primersiz olmak üzere 35 döngü PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve birleşen ürün agaroz jelde kontrol edilmiştir (Şekil EK-8.1-B). Beklenen 1626 bç'lik ürün daha sonra kit yardımı ile jelden saflaştırılmıştır. Sonraki aşamada, birleştirilmiş parçanın pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT vektörüne ligasyonu için vektör ve insert XhoI-FseI enzimleri ile 37°C'de 16 saat çift restriksiyon kesim reaksiyonuna alınmış ve her iki kesim ürünleri jelden saflaştırılmıştır. Ligasyon reaksiyonu 40 ng insert ve 50 ng vektör kullanılarak T4 DNA Ligaz enzimi yardımıyla 16°C'de 16 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ligasyon ürününün tamamı E. coli XL1-Blue kompetent hücrelerine transforme edilmiş ve elde edilen koloniler FHsp70-XhoI ve RGHstrep primer çifti ile PZR taramasına alınmıştır (Şekil EK-8.1-C). Koloni PCR sonuçlarına göre beklenen 1636 bç'lik kaseti içeren 2. koloni pozitif klon olarak seçilmiş ve bu klondan kit yardımı ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen vektördeki kaset halen PLA1 dizisi içerirken Histidin-Enterokinaz dizisi çıkarıldığı ve Streptag-II takısı eklendiği için pNeo4-Hsp70.2(minus)-PLA1-hGH-MTT vektörü olarak adlandırılmıştır. Elde edilen vektör, üzerindeki HindIII ve EcoRI restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri kullanılarak kesim profil analizine alınmış ve vektörün parçalarının doğru olduğu teyit edilmiştir (Şekil EK-8.1-D).



Şekil EK-8.1. Örtüşen Primer PCR'ları ile N-terminal 6xHistidin, Enterokinaz Dizilerinin Çıkarılması. A: Örtüşen Parçalar 1 -2'nin Üretimi (Beklenen: 1037 bç ve 657 bç) B: 1 ve 2 Parçalarının Birleştirme Reaksiyonu Ürünü (Ok: Beklenen ürün 1636 bç) C: Ek 8. N-terminal 6xHistidin, Enterokinaz Dizileri çıkarılmış kaseti içeren pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT vektörünün *E. coli* hücrelerinde Koloni PCR kontrolü (Beklenen 1636 bç) D: İzole edilen pNeo4-Hsp70.2(minus)-PLA1-hGH-MTT vektörünün restriksiyon parmak izi kontrolü. 1: *EcoRI* (3346 bç, 1673bç, 1504 bç, 1479 bç), 2: *HindIII* (6864 nç, 1136 bç). Her bir reaksiyonda 200 ng vektör kesimi gerçekleştirilmiştir. M: *EcoRI* -*HindIII* Plus (SM0191). %1 Agaroza Jeli, 80V- 40 dk.

EK-9. hGH E.R Sinyal Dizisinin 5' Ucunda Yer Alan PLA1 Dizisinin Çıkarılması:

Bir önceki klonlama aşamasında elde edilen PLA1 dizili pNeo4 vektörü kalıp olarak kullanılmak üzere, kaset üzerindeki PLA1 dizisinin çıkarılarak 5' ucunda sadece hGH E.R Sinyal dizisinin bulunması için FHsp70-Xho v4 RHsp70 ile FGHsinyal ve RGHstrep primerleri ile 3. (844 bç) ve 4. (713 bç) örtüşen parçalar üretilmiş ve parçalar jelden saflaştırılarak birleştirme reaksiyonuna alınmıştır. Buna göre 27ng pNeo4-Hsp70.2(minus)-PLA1-hGH-MTT vektörü kalıp olarak kullanılmak üzere: FHsp70-Xho ile RHsp70 ve FGHsinyal ile RGHstrep primer çiftleri yardımıyla 15 bç uzunluğunda örtüşen kısmı üzerlerinde bulunduran iki parça üretilmiştir (Şekil EK-9.1-A). Buna göre jelde büyüklükleri tutarlı olan bu iki parçanın birleştirilmesi için, bu parçalar kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. Beklenen birleştirme ürünü 1528 bç uzunluğunda olup reaksiyonda ilk 7 döngü dış primersiz, sonraki 29 döngü FHsp70-Xho ile RGHstrep primerleri eklenerek gerçekleştirilmiştir (EK-5). Elde edilen reaksiyon ürünü jelden saflaştırıldıktan sonra 1528 bç'lik insert jelde görüntülenerek teyit edilmiştir (Şekil EK-9.1-B). Saflaştırma sonrası elde edilen birleştirme ürününden, ligasyon için kesim reaksiyonu kurulmuştur. Yapılan ligasyon hesabına göre 50ng vektöre karşılık 38 ng insert gerekmektedir. Bu amaçla, vektörün ve insertin MscI-FseI çiftli kesim reaksiyonu 37°C'de 16 saat ve 65°C'de 20 dakika inaktivasyon ile tamamlanmıştır. Elde edilen uçları kesik insert ürününün tamamı jele yüklenerek saflaştırılmıştır. Ligasyon için daha önce lineer hale getirdiğimiz pNeo4 vektöründen 50ng alınarak 38 ng insert ile birlikte reaksiyona eklenmiştir. Ligasyon reaksiyonu 16°C olarak aynı ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Elde edilen ligasyon ürünlerinin tamamı *E. coli* XL1-Blue kompetent hücrelerine transforme edilmiş ve elde edilen klonlarda FHsp70-Xho ile RGHstrep primerleri kullanılarak koloni PCR taraması gerçekleştirilmiş ve pozitif olan 6.koloniden plazmit izole edilerek N-terminal 10x Histidin, Enterokinaz ve PLA1 dizisi çıkarılmış, C-terminalde ise StreptagII saflaştırma takısı içeren pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT (PLA1 'siz) vektörü elde edilmiştir (Şekil EK-9.1-C). Elde edilen vektörün restriksiyon kesim profili analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuca göre biyoinformatik olarak beklenen büyüklükler ile XhoI-FseI, EcoRI, HindIII ve SacI enzimleri ile kesilen vektörün oluşturduğu ürün büyüklükleri karşılaştırılarak vektörün doğru parçaları içerdiği görülmüştür (Şekil EK-9.1-D).



Şekil EK-9.1. *hGH E.R Sinyal Dizisinin Önünde Yer Alan PLA1 Dizisinin Çıkarılması* **A:** Mutasyon İçin Gerekli Parçaların Üretilmesi 1. Kuyu: 3. parça (844 bç) 2: 4. parça (713 bç) **B:** Birleştirme Ürününün agaroz jelde kontrolü (1528 bç) **C:** Oluşturulan pNeo4-Hsp7.20(minus) – *hGH* (PLA1 'sız)- MTT vektörünün Koloni PCR Kontrolü (FHsp70-XhoI ve RGHstrep primerleri ile) **D:** Kaseti İçeren Vektörün Restriksiyon Profil Analizi. 1: SacI (451 bç, 2,3082 bç), 2: HindIII (6866 bç, 1028 bç), 3: EcoRI (3346 bç, 1673 bç, 1479 bç-1396 bç), 4: XhoI-FseI (1528bç + Vektör). M: EcoRI-HindIII Plus (SM0191). %1 Agaroz Jeli, 80V- 40 dk.

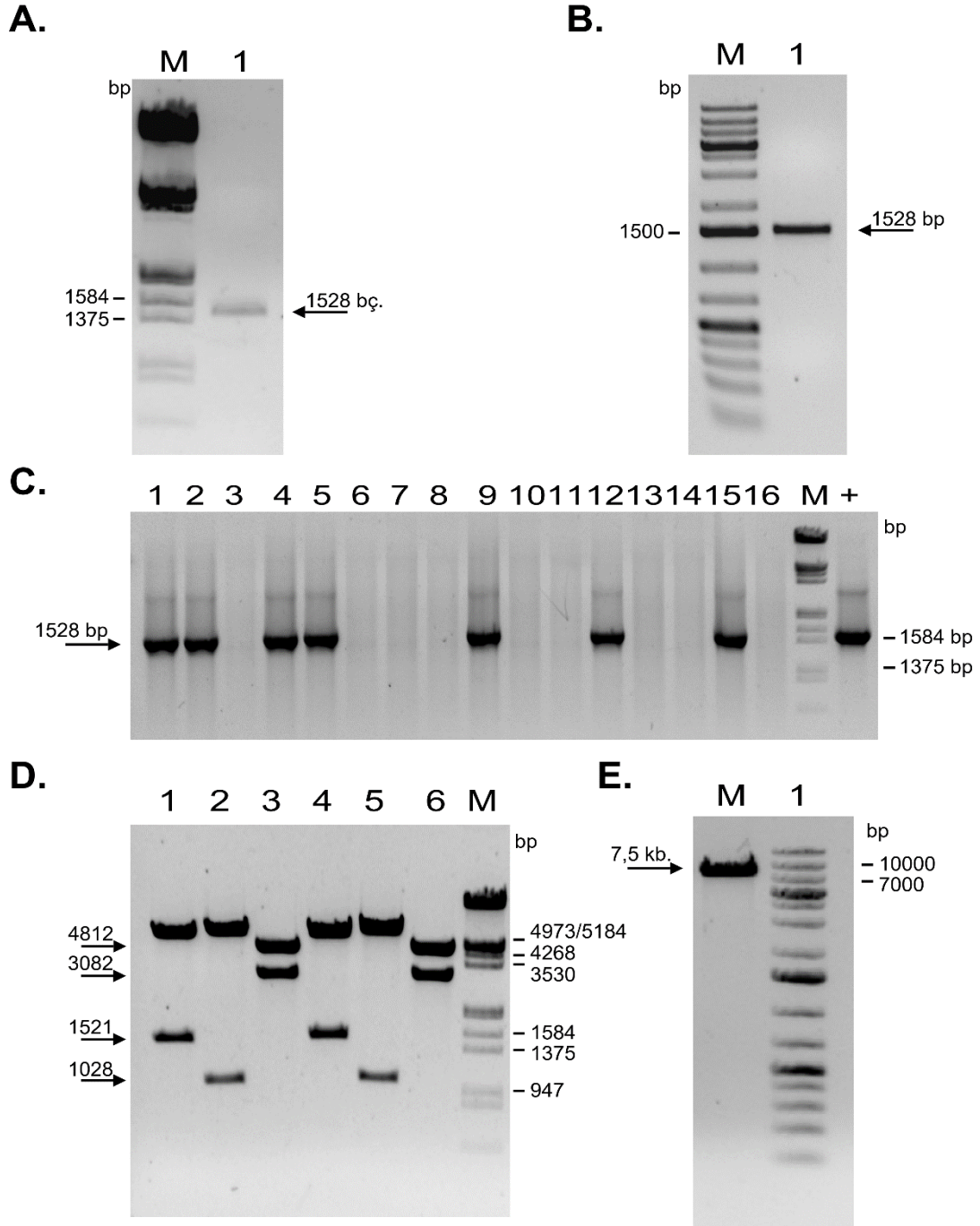
EK-10. N-terminal Modifikasyonları Tamamlanmış Kasete C-Terminal 6xHistidin Takısının Yerleştirilmesi

N-terminal parçaları çıkarılmış kasette yer alan ve rekombinant kaset üretimi sırasında eklenmiş Streptag-II dizisi, afinitik saflaştırmaya imkân veren takıyı oluşturmaktadır. 8 aminoasitten oluşan takı Streptavidin 'e doğal afinite gösterdiği için afinitik protein saflaştırmalarında kullanılmaktadır. İlk etapta üretilmesi planlanan rekombinant proteinin saflaştırılması için bu takının kullanılması planlanmış ve bazı ön deneyler bu takı üzerinden gerçekleştirilmiş, fakat saflaştırma ve Western Blot açısından bazı sıkıntılar görülmüştür. Bunların içerisinde Anti-Strep Antikoru (Novagen 72590-3 Monoklonal) ile yapılan Western Blot denemelerinde yüksek nonspesifik bant elde edilmesi ve saflaştırma kiti için gerekli Streptavidin 'in maliyetinin yüksek olmasından dolayı belirtilen takının son aşamada PCR reaksiyonu ile 6xHistidin takısıyla değiştirilme ihtiyacı duyulmuştur. Bu amaçla geri primer E.R Sinyal- hGH Gen + 6x His + TGATGA + SEXAI + FseI yapısını oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Primerin dizisi şu şekildedir:

5'AAGGCCGGCCACCTGGTTCATCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAAACCGCAAGA
ACCTTCAACAAA 3' (RGH6xHistidin)

Mevcut kaset üzerinde belirtilen değişikliği yapabilmek için Streptag-II takısını bulunduran pNeo4-HGH-PLA1 siz vektörü kalıp olarak kullanılmıştır. PLA1 'siz vektörün HindIII–XhoI/FseI enzimleri ile kesim profilinin beklenen profile uygunluk gösterdiği görülmüş ve vektördeki kaset üzerinden PCR reaksiyonuna geçilmiştir. Buna göre HSP70.2(minus) promotorundan FHsp70-XhoI ileri primeri ile belirtilen geri primer birlikte PCR reaksiyonda kullanılarak 1528 bp uzunluğunda ve C-terminal 6xHistidin takısı ve buna ek 2xTGA stop kodonu, SexAI ve FseI restriksiyon enzim tanıma bölgeleri içeren yeni parça üretilmiştir (Şekil EK-10.1-A). Elde edilen insert agaroz jelde teyit edilerek doğru büyüklükte parçanın elde edildiği teyit edilerek (Şekil EK-10.1-B) ürün pNeo4-Hsp70.2(minus)-Sinyal-hGH-MTT genom entegrasyon vektörünü oluşturmak üzere XhoI-FseI klonlaması ile pNeo4 vektörüne yerleştirilmiştir. Klonlama için, kaset ve vektör üzerinde yer alan XhoI/FseI restriksiyon enzimleri ile kesilerek yapışkan hale getirilmiştir. Yapılan hesaba göre 50 ng kesik vektöre karşılık 38 ng insert kullanılarak T4 DNA ligaz enzimi ile ligasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen vektörün tamamı XL1-Blue kompetent hücrelerine aktarıldıktan sonra hücreler Ampisilinli tabakta gelişmeye bırakılmıştır. Elde edilen master tabak kolonileri FHsp70-XhoI ve RGH6xHistidin primer çifti kullanılarak PCR ile taranmıştır (Şekil EK-10.1-C). Sonraki aşamada, pozitif koloniler arasından seçilen 5. ve 9. kolonilerden LB besiyerine ekim yapılarak ticari kit yardımıyla plazmit

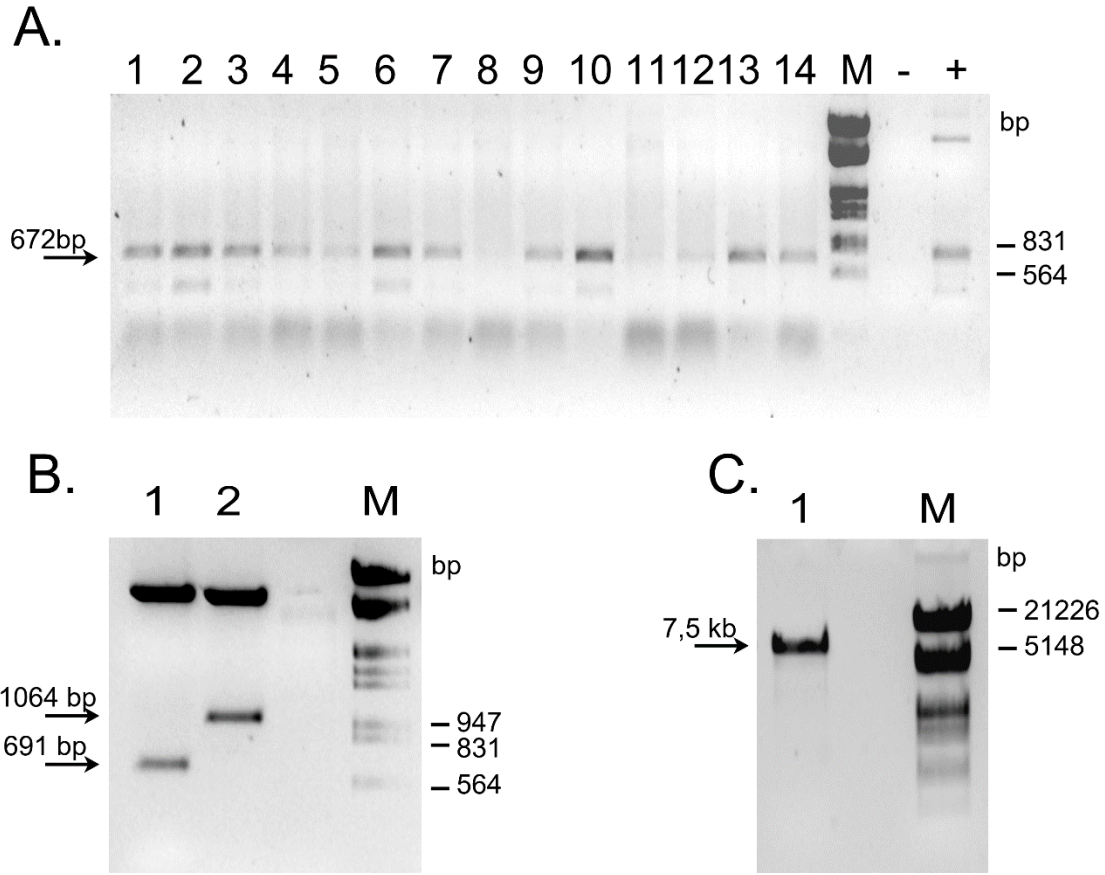
izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen plazmitlerin 200 ng'ı XhoI-FseI (Beklenen, 1521), HindIII (Beklenen: 1028, 6866), SacI (Beklenen: 3082) enzimleri ile gece boyu kesim kontrolüne alınmış ve ürünlerin tamamı %1'lik Agaroza jele yüklenmiştir. Jel görüntüsüne göre her iki vektörün kesim profillerinin beklenen profile uygunluk gösterdiği görölmüştür (şekil EK-10.1-D). 5 numaralı klondan izole edilen vektör biyolistik transformasyonda kullanılmak üzere KpnI enzimi ile kesim reaksiyonuna alınarak PCR saflaştırmasına alınmış ve konsantre edilip muhafaza edilmiştir (şekil EK-10.1-E).



Şekil EK-10.1. N-terminal Modifikasyonları Tamamlanmış Kasete C-Terminal 6xHistidin Takısının Yerleştirilmesi **A:** FHsp70-XhoI / RGH6xHistidin Primerleri İle 6xHistidin Takısının Yerleştirilmesi (Beklenen: 1528 bç) **B:** 6xhistidin İçeren Rekombinant Üretim Kaseti Safılaştırma Ürünü. **C:** 6xhistidin takılı Rekombinant Kaseti İçeren pneo4 Vektörünün Transformasyonu Sonrası Koloni PCR Kontrolü (Beklenen 1528 bç) **D:** Elde edilen 5 ve 11 numaralı vektörlerin restriksiyon parmak izi kontrolü (1/4: XhoI/FseI (1521bç'lik parça salmakta), 2/5: HindIII (1028/6866 bç), 3/6: SacI (3082/4812 bç) **E:** KpnI ile Lineer hale getirilmiş pNeo4-Hsp70.2(minus)-Sinyal-hGH-MTT vektörünün jelde kontrolü. Vektörün lineer büyüklüğü: 7,5 kb. M: EcoRI-HindIII Plus (SM0191) ve Generuler 1kb plus-SM1331. %1 Agaroz Jeli, 80V- 40 dk.

EK-11. hGH Rekombinant Üretim Kasetinin pNeo4--Hsp70.2(plus)-MTT Genom Entegrasyonu Vektörüne Yerleştirilmesi

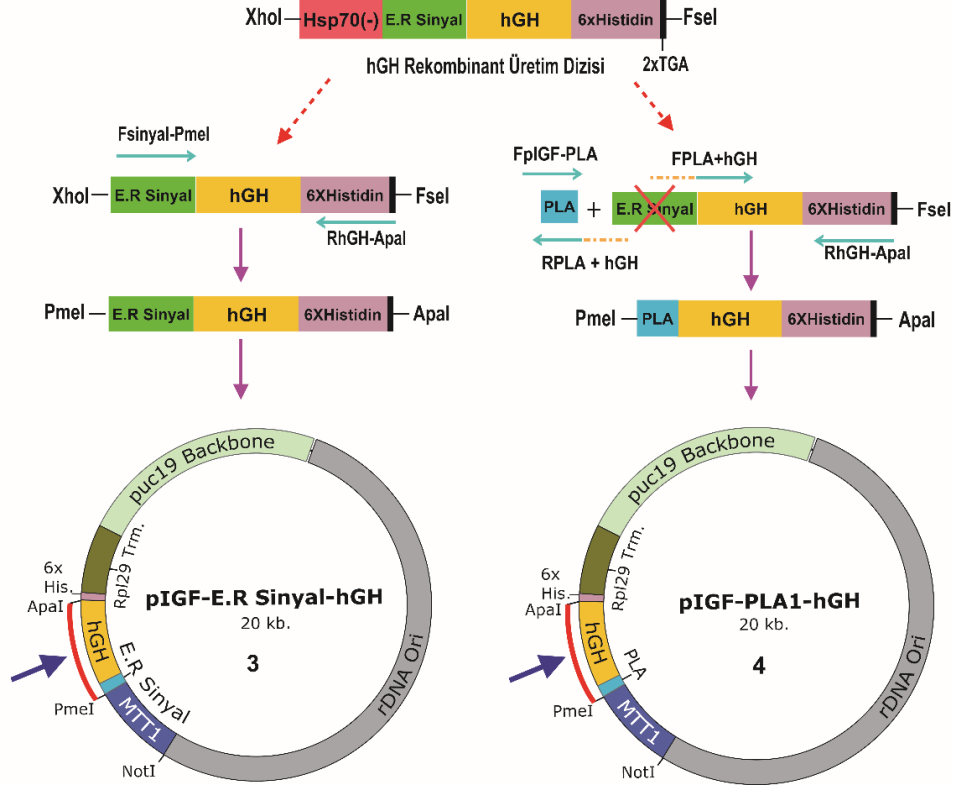
Rekombinant Kasetin diğer genom entegrasyonu vektörü olan pNeo4-Hsp70.2(plus)-MTT vektörüne klonlanarak pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH- MTT vektörünün oluşturulması için MscI-FseI enzimleri ile kesilen 6xHistidin takılı rekombinant üretim kasetinin aynı enzimler ile lineer hale getirilmiş pNeo4-Hsp70.2(plus)-MTT vektörü ile birleştirilmiştir. Vektör MscI-FseI ile kesilmiş halde lineer formda temin edildiği için insert saflaştırması sonrası vektörle ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Buna göre 50ng vektöre karşılık 14,5 ng insert ligasyona alınmış ve ligasyon ürünlerinin tamamı XL1-Blue hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası gerçekleştirilen koloni PCR analizine göre 10 numaralı koloni pozitif olarak belirlenerek plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen vektör restriksiyon profili kontrolüne alınmıştır (Şekil EK-11.1-A). MscI-FseI, HindIII enzimleri ile kontrol edilen vektörün doğru parçaları saldığı teyit edilmiştir (EK-11.1-B). Her iki pNeo4 vektörünün *T. thermophila*'da biyolistik silah transformasyonu ile genom entegrasyonunu sağlanması için vektör 3' MTT bölgesinin ucunda yer alan KpnI enzimi ile lineer hale getirilmiş ve her bir vektörden toplamda 2µg DNA alınarak biyolistik silah transformasyonuna hazır hale getirilmiştir (EK-11.1-C).



Şekil EK-11.1. pNeo4-Hsp70(plus)-MTT Vektörüne 6xhistidin Takılı Rekombinant Kasetin Klonlanması. **A:** Transforme edilen vektörün koloni PCR Kontrolü (FGHSinyal ve RGHKontrol primerleri, Beklenen: 672 bç) **B:** İzole edilen pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT Vektörünün Restriksiyon Profil Analizi 1: MscI ve FseI Kesimi (691 bç), 2: HindIII (1064 bç), her bir reaksiyonda 200ng vektör kesilmiştir. **C:** 1. KpnI Enzimi İle Lineer Edilen Vektörün Agaroz Jelde Kontrolü. (Lineer vektörün büyüklüğü yaklaşık 7,5 kb dir) M: EcoRI -HindIII Plus (SM0191). %1 Agaroz Jeli, 80V- 40 dk.

EK-12. hGH E.R Sinyal ve PLA1 içeren Rekombinant Kasetlerin Oluşturulması ve rDNA orijinli pIGF Vektörlerine Yerleştirilmesi

5' kısmında E.R yönlendirme dizisi olarak doğal hGH E.R sinyali ve PLA1 dizisi taşıyan İnsan büyüme hormonu protein kasetlerini rekombinant olarak rDNA orijinli pIGF vektör sistemiyle kullanabilmek için, hGH rekombinant üretim kasetinin uçlarına pIGF vektörüne uygun restriksiyon enzimlerinin PCR reaksiyonu ile eklenmesi gereklidir. Bu amaçla ilk olarak rekombinant üretim kaseti üzerinden FSinyal-PmeI, RHGH-ApaI ve kasetteki İnsan E.R sinyalinin PLA1 dizisi ile değiştirilmesi ileri primer FpIGF-PLA1, örtüşen primer çifti FPLA1+HGH ve RPLA1+hGH primerleri tasarlanmıştır (Şekil EK-12.1).



Şekil EK-12.1. pIGF Vektörlerine Klonlanan hGH ER Sinyal ve PLA1 Dizili Kasetlerin Oluşturulması ve Vektörde Klonlandığı Kısımlar. Kasetlerin klonlanması için 5' ileri primerlere PmeI, 3' geri primerlere ApaI eklenmiştir.

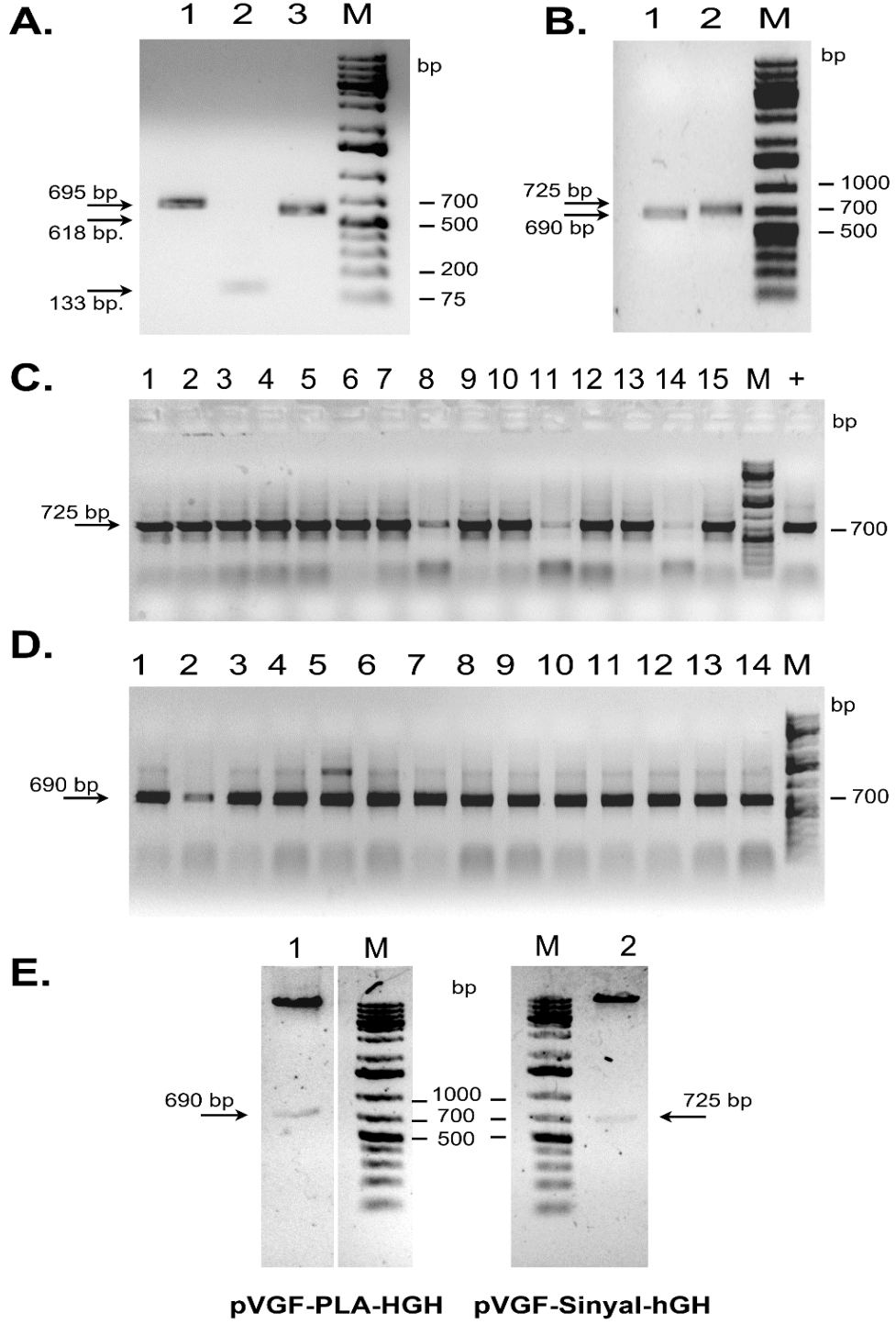
Buna göre, ilk olarak pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT vektöründeki kaset kullanılarak hGH E.R Sinyal dizisi ve hGH gen dizisini içeren kısma pIGF'ye uygun restriksiyon dizileri eklenerek ilk aşama insert üretilmiştir (Şekil EK-12.2-A). Diğer tasarım olarak hedef proteinin dışarı salgılatılmasının hedeflendiği ve hGH E.R sinyali dizisinin çıkarılıp PLA1 dizisi eklenecek kaset için örtüşen primerler kullanılarak mutasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo EK-12.1. pIGF Vektörlerine Klonlanacak Rekombinant Kasetlerin Oluşturulmasında Kullanılan Primer Çiftleri

Fsinyal-PmeI	5'CACGTTTAAACATGGCTACTGGTTCTAGAACTTC3'
FpIGF-PLA1	5'CACGTTTAAACATGAACAAGACTCTCATCTTAGC3'
FPLA1+hGH	5'GACTAAGACCCCTTCCCTACTATTCC3'
RPLA1+hGH	5'GGAATAGTAGGGAAGGGGTCTTAGTCAACTCTGATG3'
RHGH-ApaI	5'GTGGGGCCCTCATCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAAACCGC

Buna göre Tablo 6.2'deki örtüşen primerler (kalın font) yardımı ile PLA1 ve hGH gen dizisi parçaları ayrı ayrı üretilip jelden saflaştırıldıktan sonra dış primerler (FpIGF-PLA1 ve RHGH-ApaI) ile birleştirme reaksiyonuna alınmıştır (Şekil EK-12.2-B). Üretilen

parçalar agaroz jelden saflaştırıldıktan sonra kontrol edilmiş ve pIGF vektörlerine klonlayabilmek için boş pIGF vektörü ile birlikte Pmel-Apal enzimleri kullanılarak kesilmiştir (kesik pIGF vektörü laboratuvar envanterinden temin edilmiştir). Elde edilen kesim ürünleri jelden saflaştırıldıktan sonra hGH Sinyal ve PLA1 dizili her iki kaset ayrı ayrı pIGF vektörüne ligasyon reaksiyonu ile yerleştirilmiştir. Buna göre her iki insertin 20 ng'ı 50ng kesik pIGF vektörü ile 16 saat ligasyon reaksiyonuna alınmıştır. Ligasyon sonrası her iki vektöre ait ligasyon ürünlerinin tamamı ayrı ayrı Dh5 α kompetent hücrelerine ısı şoku ile transforme edilmiş ve elde edilen koloniler dış primerler kullanılarak (hGH-Sinyal için: FSinyal-Pmel ve RHGH-Apal, PLA1 için: FpIGF-PLA1 ve RHGH-Apal) PCR reaksiyonları ile kontrol edilmiştir (Şekil EK-12.2-C ve D). Koloni PCR sonucuna göre pozitif PLA1-6 ve Sinyal-12 numaralı klonlardan Plazmit izolasyonu gerçekleştirilerek pIGF-PLA1-hGH ve pIGF-Sinyal-hGH vektörleri elde edilmiştir. İzole edilen bu iki vektör Pmel/Apal restriksiyon kesim analizine alınarak doğru büyüklükte insert içerip içermedikleri tekrar teyit edilmiştir (Şekil EK-12.2-E). Teyit edilen her iki vektör 2 μ g olacak şekilde halkasal formda konsantre edilerek konjugatif biyolistik transformasyonda kullanılmıştır.



Şekil EK-12.2. *pIGF Vektörlerine Klonlanacak Kaset ve Vektörlerin Oluşturulması ve Vektörlerin Teyidi. A: Rekombinant Üretim İçin Gerekli hGH-Sinyal ve PLA1 Kasetlerinin Oluşturulması, 1: Sinyal-HGH insert (695 bç), 2: PLA1 parçası (Örtüşen, 133 bç), 3: hGH parçası (örtüşen, 618 bç.) B: Safleştirilmiş İnsertlerin Jel Kontrolü. 1: Sinyal-hGH Kaseti, 2: PLA1-hGH kaseti (Birleştirme Ürünü). C: pIGF-PLA1-hGH klonlarının koloni PCR Analizi (FpIGF-PLA1 ve RHGH-Apal Primerleril). D: pIGF-Sinyal-hGH Klonlarının Koloni PCR Analizi (FSinyal-PmeI ve RHGH-Apal). E: pIGF-PLA1-hGH (6.koloni) ve pIGF-Sinyal-hGH (12.koloni) vektörlerinin Apal ile PmeI çift kesim kontrolü (PLA1 içeren kaset: 905 bç, hGH E.R Sinyalli kaset: 725 bç. M: Generuler 1kb plus-SM1331. %1 AgaroZ Jeli, 80V- 40 dk.*

EK-13. *T. thermophila* Biyolojisi ve Kùltürizasyon İşlemleri

Transformasyon ve protein çalışmalarında kullanılan *T. thermophila* ırkları deneysel aşamalar göz önüne alınarak farklı metotlarla kùltürize edilebilmektedir. Genellikle 10 ml hacimde Modifiye NEFF besiyeri (Tablo 6.3) içeren cam tüplerde uzun süreli muhafaza edilen stok hücrelerden 15, 20, 50 ve üstü hacimlerde SPP veya NEFF besiyeri içeren Flask veya Steril petrilere ekim yapılmaktadır. Flask ile kùltürizasyon için besiyeri hacminin en az 5 katı hacimde olacak şekilde temiz, asidik veya deterjan özellikle kimyasal kalıntısı içermeyen flasklar kullanılması önerilmektedir. SPP ve NEFF besiyerlerinin Proteaz-Pepton ve Glikoz miktarları farklı olduğundan dolayı hücre bölünmesi üzerinde farklı etkiler yaptığı literatürde belirtilmiştir [1]. Buna göre SPP besiyerinin hücrelerin daha hızlı bölünmeye sevk etmesi nedeni transformasyondan sonra bölünmeyi ve fenotipik seçilimi hızlandırması için hücre büyütmesinde SPP besiyerinde kullanılmaktadır [1]. Protein üretimi ve diğer deneysel aşamalar için bölünme süresini uzatmak ve hücrelerin plato fazında daha dayanıklı olmasını sağlamak için NEFF besiyeri tercih edilmektedir. Ayrıca, NEFF besiyerinin Proteaz-Pepton içeriğinin daha düşük olmasının protein çalışmalarında dış ortam örneklerinde pepton kaynaklı artefakt oluşumunu azaltması nedeni ile NEFF besiyeri tercih edilmektedir. Her iki besiyeri de ortak olarak Yeast Extract ve FeCl₃ içermektedir. Tüm kùltürizasyon işlemlerinde genellikle cam tüp stoğundan yaklaşık 100-200 µl hücre flask veya petrilere inoküle edilerek deneysel aşamalara bağılı olarak 24-48 saat süreyle 30 derece sıcaklıkta inkübasyon gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin oksijen ihtiyacı fazla olduğu için Flask büyütmelerinde ortalama 100-120 rpm değerlerinde sabit çalkalama işlemi uygulanmaktadır. Tüm kùltürizasyon işlemlerinde besiyeri ortamı Pen-Strep ve Amfoterisin antibiyotikleri ile takviye edilmektedir (Tablo 6.4). Hücreler uzun süreli muhafaza edilmek istendiğinde sıvı azot dondurma protokolü takip edilerek dondurma işlemi gerçekleştirilmektedir. Dondurulan hücreler deneylerde kullanılmak üzere uyandırma protokolü ile uyandırılıp 10 ml'lik Modifiye NEFF besiyeri içeren cam tüplerde 2 haftada bir tazelenmek üzere stok kùltür olarak muhafaza edilebilmektedir [1].

Tablo EK-13.1. *T. thermophila* Kültürizasyonunda Kullanılan Besiyerleri

Modifiye NEFF Besiyeri		SPP Besiyeri
Proteaz – Pepton	%0.25	%2,0
Yeast Extract	%0.25	%0,1
Fec _{l3}	%0,5	%0,2
Glikoz	33.3 µM	33.0 µM
Besiyeri maddeleri eklendikten sonra dH ₂ O ile final hacme tamamlanan besiyerleri otoklavlanarak steril edilir ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.		

Tablo EK-13.2. *T. thermophila* Kültürizasyonunda ve Transformant Seçiminde Kullanılan Antibiyotikler

Antibiyotik (Stok)	1 ml için	5 ml için
Pen – Strep (10.000 ünite Penisilin – 10 mg Streptomisin)	5 µl	25 µl
Amfoterisin B (250 µg/ml)	5 µl	25 µl
Pozitif Transformant Seçiliminde: (50.000 µg /ml Stok)		
Paramomisin (100 µg /ml)	2 µl	10 µl
Paramomisin (300 µg /ml)	6 µl	30 µl
Paramomisin (600 µg /ml)	12 µl	60 µl
Paramomisin (1000 µg /ml)	20 µl	100 µl

EK-14. *E. coli* Transformasyon Protokolü

a) Hazırlık: Deneyden önce su banyosu 42 derece sıcaklığa getirilir, deney tüpleri uygun şekilde isimlendirilir, hücrelerin inkübasyonu için steril LB besiyeri hazır tutulur ve başka bir inkübatör 37 derece sıcaklıkta hazır tutulur.

b) Protokol: Kompetent hücreler -86'dan çıkarılıp hemen buza alınır. Buzda 5 dakika boyunca bekletilen hücrelere steril ortamda ligasyon ürünlerinin tamamı aktarılır ve hücreler tekrar 30 dakika boyunca buzda bekletilir. Süre sonunda hücreler 2 dakika boyunca 42 derecede tutulduktan hemen sonra 3 dakika süre ile buzda bekletilerek ısı şoku uygulanır. Şok sonrası hücrelere 500 µl LB Broth eklenerek 37° C'de 100-120 rpm'de ve 30-40 dakika süre ile çalkalamalı inkübasyon uygulanır. İnkübasyon sonunda hücreler 8000 rpm – 3 dakika boyunca santrifüj edilir ve santrifüj sonrası süpernatant,

tüpte 100 µl kalacak şekilde uzaklaştırılır. Hücre peleti tüpte kalan süpernatant ile çözülür ve oda sıcaklığındaki antibiyotikli LB Agar tabağına yayılır. Tabaklar 5 dakika dinlendirildikten 37 derecede gece boyu inkübe edilir.

EK-15. *E. coli* Hücrelerinin İnkübasyon İşlemleri

Klonlama işlemlerinde kullanılan *E. coli* suşlarını kültürize etmek için sıvı LB Broth besiyeri ve katı LB Agar besiyerleri kullanılmaktadır. LB Broth besiyeri transformasyon ve plazmit izolasyonu gibi işlemlerde gerekli hücre sayısına ulaşmak için tercih edilmektedir. Besiyeri içerisinde Tripton, NaCl ve Yeast Extract bulunmakta ve distile su ile final hacme getirilen besiyeri otoklavlanarak steril edilmektedir (Tablo 6.5). Ekim işlemleri steril ortamda öze ile gerçekleştirilmekte ve transforme edilen rekombinant vektörü içeren transformant hücrelerde Ampisilin direnci üzerinden vektörün stabilize olmasını ve pozitif transformantların seçilebilmesini sağlamak için, besiyeri içerisine 1:1000 oranında Ampisilin antibiyotiği eklenmektedir. Yüksek kopya sayılı plazmitler için genellikle 5 ml'lik gece boyu kültür yeterli olduğu için genellikle 5 ve 10 ml'lik kültür ekimi yapılmaktadır. İnkübasyon maksimum 16 saat süre ile 37 derece sıcaklıkta çalkalamalı olarak gerçekleştirilmektedir.

Tablo EK-15.1. LB Broth Besiyeri İçeriği

Kimyasal	500 ml için:
Tripton	5,0 gr
Yeast Extract	2,5 gr
NaCl	2,5 gr

Transformasyonu gerçekleştirilen kompetent hücrelerde koloni PCR analizi ile pozitif klon tarayabilmek için hücreler aynı oranda Ampisilin içeren LB Agar tabaklarına steril ortamda ekilmekte ve seçilen koloniler yine antibiyotik içeren master tabağa taşınmaktadır. Kolon taraması master tabaktaki kolonilerden koloni PCR reaksiyonu yardımıyla gerçekleştirilmektedir.

EK-16. *T. thermophila* Vejetatif Biyolistik Silah Transformasyon Protokolü & Aşamaları

DNA'nın Lineer Hale Getirilmesi

- Her bir transformasyon aşaması için aktarılacak vektörden yaklaşık 1-4 µg kullanılır.
- Genom entegrasyonu için vektör restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilerek jelden veya reaksiyon tüpünden saflaştırılır
- Elde edilen plazmit 2 µg/µl konsantrasyonunda olacak şekilde dH₂O ile çözülür.

Altın Partiküllerinin Vektör DNA'sı ile Birleştirilmesi

Transforme edilecek vektörün transforme edilebilmesi için altın ile kaplanması gerekmektedir. Bu işlem için sırasıyla:

- 4 µL (4-12 µg) lineer DNA
- 40 µL 2.5 M CaCl₂
- 16 µL Spermidin

Eklenerek tüpte karıştırılır. Her eklemenin ardından ~3 saniye vortekslenir. Tüm bileşenler eklendikten sonra, 4°C'de 10 dakika çalkalanır.

DNA/altın karışımının ateşleme için hazırlanması:

1. Partiküller, 4 santigrat derecede 10.000 6 saniye santrifüj edilerek çöktürülür ve süpernatant pipetlenerek uzaklaştırılır.
2. Altın partikülleri %70'lik 100 µL etanol ile yıkanır, hafif spinlenerek süpernatant uzaklaştırılır.
3. %100'lük 100 µL etanol ile yıkanır, spin atılır ve süpernatant uzaklaştırılır.
4. 40 µL %100'lük etanol içinde pipetlenerek çözülür.
5. Her atışta bu partiküllerin 10 µl'si makro tutucu üzerine eklenerek kullanılmaktadır.

Hücrelerin Hazırlığı

1. Her bir transformasyon için 50 ml SPP'de hücre büyütülmelidir.
2. Hücre yoğunluğu 2.10⁵ hücre/ml olduğunda hücreler açlık tamponuyla yıkanarak, 50 ml tamponda açlığa alınır.
3. Hücreler az 6 saat açlığa alınarak transformasyona hazır hale getirilir.

4. $2 \cdot 10^5$ hücre/ml yoğunluğundaki, 50 ml aç hücreler (veya konjugatif), konik dipli bir tüpte 1100 g'de 3 dakika santrifüj edilerek toplanır
5. Süpernatant uzaklaştırılır ve 500 µl 10 mM Tris-HCl içerisinde çözülür.
6. 4 adet dairesel "Whatmann 50" filtre kâğıdı 4 petri tabağının (100 mm) her birine yerleştirilir ve 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile nemlendirilir.
7. Hücreler filtre kağıdının ortasından başlanarak $\frac{3}{4}$ 'lük kısmına kadar yayılır.

Ateşleme:

1. Cihazın iç yüzeyi %70'lik alkolle temizlenir.
2. İzopropanol içerisinde bir tane 900 PSI rupture disk ıslatılır.
3. Rupture disk retining cap içine yerleştirilir ve bu da partikül bombardıman aparatına monte edilir.
4. Macrocarrier tutucuya önce stopping screen, ardından da DNA kaplı partikülleri içeren makrotaşıyıcı (aşağı bakacak şekilde) yerleştirilir ve kilitleme halkasıyla sağlamlaştırılarak tablaya (mikrotaşıyıcı ateşleme birimi) monte edilir.
5. İçinde hücrelerin bulunduğu bir 100 mm petri tabağı, kapağı açık şekilde en alt seviyeye yerleştirilir.
6. Helyum tankında 1100 psi basınç ayarlanır.
7. Cihazın Vac tuşuna basılır ve 26.5-27 Hg'ye kadar vakum çekilir çekilmez Vac tuşu Hold'a (alt kademe) alınır ve vakum vanası kapatılır.
8. Fire tuşuna basılı tutulup atış gerçekleştirildikten sonrası fire tuşu bırakılır.
9. Hücreleri kurumaktan korumak için üzerlerine 1 ml 30 °C 10 mM Tris-HCl eklenir ve diğer ateşlemeler bitirilinceye kadar 30 °C'de inkübasyona bırakılır.

Seçilim:

Transforme edilen aç hücreler eğer makronükleer transformasyon içinse, hücreler hızlı bir şekilde 1X SPP büyüme besiyerine aktarılır. 5-7 saat toparlanma sürecinin ardından 80 µg/ml konsantrasyonuna kadar Paramomisin baskısı kurulabilir ve 1µg/ml CdCl₂ indüklemesi yapılır

EK-17. *T. thermophila* Konjugatif Biyolistik Silah Transformasyon Protokolü ve Transformant Seçilimi

Çalışmada kullanılan ve yüksek kopya sayılı rDNA vektörlerinden biri olan pIGF vektörlerinin organizmaya transforme edilebilmesi için tip olarak farklı cinsiyette 2

hücrenin açlık stresine maruz bırakılarak konjugasyona başlamaları ve bu sürecin 7,5-8'inci saatlerine denk gelen zaman diliminde yeni MAC'ın oluştuğu evrede transformasyonun gerçekleştirilmesi şarttır. Bu amaçla iki farklı tip (örneğin CU427 ve CU428 ırkları) *T. thermophila* hücreleri 50 ml SPP besiyerine ekildikten sonra yeterli hücre yoğunluğuna ulaşmaları sağlanır. İnkübasyon süresinde besiyerine Amfoterisin antibiyotiği koyulmayarak sadece Pen-Strep ile desteklenir. Hücrelerin gelişmesinden sonra her iki hücre ayrı ayrı 50 ml 10mM Tris-HCl açlık tamponunda çözülerek en az 1 gün olacak şekilde çalkalamalı olarak inkübasyona devam edilir. Hücrelerin mikroskopik kontrolü yapıldıktan sonra her iki hücreden 5×10^6 sayıda hücre peletlenerek eşit hacimde steril açlık tamponu ile çözülür ve toplam hacmin en az 5 katı olacak şekilde flask içerisinde birleştirilir ve hücreler çalkalamasız olarak inkübe edilerek konjugasyona girmeleri sağlanır. 4. saatten itibaren birleştirilen hücrelerin mikroskopik takibi yapılarak %80 konjugatif çift oranına ulaşp ulaşmadıkları teyit edilir. Eğer konjugasyon oranı çok düşükse transformasyona devam edilmez. Yeterli konjugatif çift elde edildiğinde, hücrelerin MAC oluşum durumu Hoechst boyaması ile kontrol edilir. 7.5 saatte olan eski MAC'ın kaybolduğu zaman dilimi yakalandığında, vejetatif transformasyon protokolündeki adımlar aynen takip edilerek transformasyon gerçekleştirilmektedir. Transformasyonda kullanılan vektör miktarı ise 2-4 µg olacak şekilde ayarlanmaktadır.

Transformasyon sonrası hücreler taze besiyerine aktararak inkübasyona devam edilir. İlk antibiyotik baskısı konjugasyonun bittiği 13-14'üncü saate ulaşıldıktan sonra 100 µg/ml Paramomisin antibiyotiğinin eklenmesi ile kurulur. Daha sonraki günlerde hücreler taze besiyerine aktararak 300-600 µg/ml Paramomisin konsantrasyonuna ulaşılır ve bu evrede canlı kalan hücreler pozitif transformant olarak belirlenerek stoklanır.

EK-18. Hsp70.2 Promotoru Isı Şoku İndükleme Protokolü

- a) İndükleme için kullanılacak sıcaklığa (38 derece) uygun cihaz hazır hale getirilerek gerekli miktarda SPP besiyerinin bu ortamda 38 derecede ısıtılması sağlanır.
- b) Sayımı yapılan kültürler 50'lik falkon tüplere aktarılır. Swing Rotor tercihlili olarak uygun rcf'te (1200-1300, 3 dk.) çöktürüldükten sonra, eğer dış ortam deneyleri yapılacak ise süpernatant saklanır, geriye kalan peletlerin üzerine kültürle aynı

hacimde sıcak besiyeri aktarıldıktan sonra üzerlerine gerekli antibiyotik takviyesi yapılarak hücreler çözülür (steril ortamda yapılması önemlidir).

- c) İndükleme zamana bağlı olarak yapılacaksa, hücreler steril erlenlere veya bir önceki kültür erlenine aktarıldıktan sonra çalkalamalı veya çalkalamasız olarak belirtilen sıcaklıkta indüklenir.
- d) İstenilen çalışmada ihtiyaç duyulan miktarda hücreler steril şartlarda pipetle transfer edildikten sonra tekrar santrifüjlenerak tercihen 1 veya 2 kez açlık tamponu (10 mM Tris) ile yıkanır. Bu hücrelerden istenirse sayım için örnek alındıktan sonra tekrar bir peletleme işlemi sonrası hücreler -86'da muhafaza edilmelidir.

İndükleme Aşamasında Örnek Toplama: Hsp70.2 promotorunun indüklemesi aşamasında protein ve DNA analizleri için 0.saat (indükleme öncesi), 3.saat, 6.saat, 12.saat ve 24.saat (indükleme sonrası) hücre örnekleri toplanmıştır (Genomik DNA ve RNA için: 2ml, Protein için: 5-10 ml (hücre yoğunluğuna göre)).

EK-19. Hsp70.2 Isı Şoku İndüklemesi Sonrası Hücrelerde Normal İnkübasyon Aşaması (Recovery – Isı Şokunun Sonlandırılması)

Hsp70.2 promotorlu kaset içeren transformantlarda 38 derece ısı şokunu takiben translasyonun devamı ve ısı şokunun sonlandırılması için bir normal inkübasyon – recovery aşaması uygulanmaktadır. Buna göre, ısı şoku ile indüklenen hücreler steril flasklara aktarıldıktan sonra hücreler 30 derecede 120 rpm çalkalamalı olarak normal inkübasyon ortamına alınarak deneye göre 3, 6, veya 12 saat süre ile inkübasyona devam edilir.

EK-20. pIGF Vektörlerini İçeren Pozitif Transformantlarda MTT1 Promotorunun İndüklenmesi ve Hücre Örneklerini Toplanması

Ekstrakromozomal pIGF vektörlerinin transforme edildiği hücrelerde vektörlerde yer alan MTT1 promotorunun indüklenmesi sonrası RNA ve protein analizleri için örnek alınması gereklidir. Bu amaçla, MTT1 promotorunun indüklemesi için hücre büyültme

protokolüne göre ekimi yapılan (çalışma için 15 ml petride büyütülen transformant hücreler kullanılmıştır) transformantların besiyeri ortamına finalde 2 µg/ml olacak şekilde CdCl₂ solüsyonu (filtre edilmiş – steril) eklemesi yapıldıktan sonra hücrelerden 6, 12, 24 ve 48 saatlere ait örnek alınmıştır. RNA için hücre yoğunluğu gözle takip edilerek 2'şer ml örnek alınmış olup, protein örneklerinde her bir grubun hücre sayısı thoma lamı ile sayılarak 3x10⁶ hücreye denk gelecek şekilde hücreler santrifüjlendikten sonra pelet 1ml 2X SDS boyası ile çözülerek kaynatılmış ve -20'de muhafaza edilmiştir.

EK-21. Genomik DNA İzolasyonu

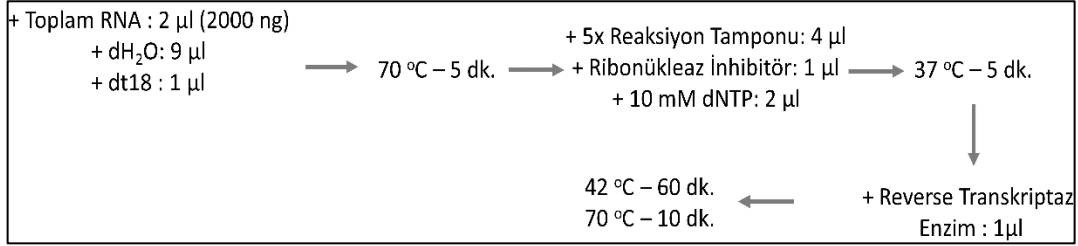
Transformasyon sonrası elde edilen hücrelerde PCR analizi gerçekleştirebilmek için ticari kit ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre izolasyonlarda Wizard A1120 kit (Promega) kullanılmış olup protokol olarak bitki hücrelerine uygulanan protokol sırası takip edilmiştir. Her bir izolasyon için logaritmik fazdan yaklaşık 1,5 ml hücre yeterli gelmekte olup, izolasyonun en son aşaması olan rehidrasyon işlemi +4 derecede gece boyu gerçekleştirilmiştir.

EK-22. Toplam RNA İzolasyonu

İndüklenen transformant hücrelerden toplam RNA izolasyonu için ticari kit kullanılmıştır (MN- Nucleospin 740955.10). Buna göre her bir deney grubundan RNA izolasyonu için toplanan pelet örnekleri kit protokolündeki kültür hücreleri ve doku örnekleri için önerilen izolasyon protokolü takip edilmiştir. Protokol içerisinde kolonda DNaz uygulaması bulunmaktadır. Kolon bench saflaştırmasına dayanan protokolün en son aşamasında RNA örnekleri RNaz içermeyen su ile elüğe edildikten sonra spektrofotometrik olarak ölçülerek miktar tayini yapılmış ve örnekler -86'da muhafaza edilmiştir.

EK-23. *T. thermophila* 'da Toplam RNA Örneklerinden Ticari Kit Yardımıyla cDNA Havuzu Oluşturulması

Çalışmada toplam RNA izolasyonu ile elde edilen toplam RNA örneklerinden ticari kit yardımı ile cDNA havuzu oluşturulmuştur (Thermo RevertAid cDNA-K1621). Buna göre her bir RNA örneğinden Toplam 2000 ng kullanılarak aşağıdaki akış takip edilmiştir:



Şekil EK-24.1. cDNA Sentez Reaksiyonu

Elde edilen cDNA örnekleri 1/10 dilüğe edilerek PCR reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılmıştır. Ana cDNA stoğu ise -20'de muhafaza edilmiştir.

EK-24. *T. thermophila* Hücrelerinden T100B Tamponu ile Protein İzolasyonu

Genom entegrasyon vektörlerinin transforme edildiği B10, H3 ve D1 klonlarında native şartlarda protein izolasyonunu gerçekleştirebilmek için T100B ile izolasyon tercih edilmiştir. Buna göre, her bir deney grubu için 1100 g'de 4 dakika boyunca swing rotor kullanılarak santrifüjle hücre örneği toplanmıştır. Elde edilen peletler 1'er kez açlık tamponu 10mM Tris (pH 6.7) ile yıkanarak tekrar santrifüjlenmiş ve hücrelerden süpernatant uzaklaştırılarak protein izolasyonuna hazır hale getirilmiştir. 25 milyon hücre için 3 ml tampon kullanılacak şekilde T100B tamponu uygulanmıştır (Tablo Ek-24.1).

Tablo EK-24.1. T100B Protein İzolasyon Tampon İçeriği (1ml için)

5M NaCl	30 µl
100mM Tris-HCl	250 µl
Triton X-100	10 µl
100 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl flüoride)	20 µl
5X Proteaz İnhibitör Kokteyli (Roche – 04693159001)	200 µl
Distile su	490 µl

Triton-X100'ün köpük oluşturmaları ve PMSF'in suda çabuk bozulması nedeni ile tampona en son PMSF eklemesi yapılmaktadır. Elde edilen tampon +4 derecede muhafaza edilmekte ve izolasyondan önce taze hazırlanmaktadır. Hücrelere tampon hesabına göre aktarılan T100B sonrası buzda 15 dakika süre ile inkübasyon uygulanmakta ve ara ara pipetleme ile homojenizasyon sağlanmaktadır. Elde edilen homojenat soğutmalı santrifüjde +4 derece sıcaklıkta 14.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlenmekte ve elde edilen süpernatant örnekleri toplanmaktadır. Bu süpernatant grubu çözünür toplam proteini temsil etmekte olup, tüpte kalan pelet kısım çözünür olmayan proteinler ve yapıları içermektedir. Her iki örnek de aliquat edildikten sonra 2X SDS yükleme boyası ile karıştırılıp analizlerde kullanılmıştır. Çalışma kapsamında süpernatant örneklerine aynı zamanda T100 tamponu ile karıştırılarak Ni-NTA afinitik saflaştırma da uygulanmıştır. 2X SDS yükleme tamponu ile karıştırılıp kaynatılan proteinler -20 derecede, aliquat edilen native proteinler -86'da muhafaza edilmektedir.

EK-25. Toplam Protein Örneklerinde Bench Ni-NTA Afinitik Saflaştırma Protokolü

pNeo4 vektörlü pozitif transformantlardan T100B izolasyonu ile elde edilen toplam protein (süpernatant ve pelet) örneklerindeki 6xHistidin takısı içeren proteinleri saflaştırabilmek için Ni-NTA (nikel kaplı agaroz boncukları) saflaştırması uygulanmıştır. Buna göre T100B'den elde edilen protein grupları dondurulmaksızın hemen Ni-NTA boncukları ile muamele edilmiştir. Saflaştırma için kullanılan boncuklar ticari kite ait olup (Qiagen-30210) ilgili protokolde 4ml lizata (proteine) 1 ml %50 slurry boncuk kullanılmasını önermektedir. Her bir örnek için hesaplanan miktarda alınan %50 slurry Ni-NTA boncukları 13.000 rpm 1 dakika süre ile santrifüjlenerek alkolden uzaklaştırılır. Kalan boncukların üzerine protein örnekleri eklendikten sonra +4 derece sıcaklıkta 1 saat veya gece boyu hafif çalkalamalı inkübasyon gerçekleştirilir (Bu çalışmada aksi belirtilmedikçe 1 saat süre ile inkübasyon uygulanmıştır). Inkübasyon aşamasından sonra boncuklara tutunan proteinlerin yıkama ve elüsyonu aşağıdaki tamponlar kullanılarak gerçekleştirilir:

Kimyasallar	Yıkama Tamponu (1lt) (pH: 8.0)	Elüsyon Tamponu (1lt) (pH: 8.0)
50 mM NaH ₂ PO ₄ (mW 137.99 g/mol)	6.90 gr	6.90 gr
300 mM NaCl (mW 58.44 g/mol)	17.54 gr	17.54 gr
İmidazol (mW 68.08 g/mol)	1.36 g (20mM)	17.00 gr (250 mM)

Uygulamadan önce tamponların sıcaklığının +4 derece olarak ayarlanması ve pH değerlerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Buna göre, Ni-NTA boncukları ile inkübe edilen örnekler ilk aşamada gravite kolonlarına aktararak bağlanmayan proteinlerin uzaklaşması sağlanır (Flow through- FT). Kalan boncuklar 2 kez 4 ml yıkama tamponu ile yıkanır ve gravite ile kolondan uzaklaştırılması sağlanarak toplanır (Wash- Yıkama Örnekleri /zayıf tutulan proteinler- W). Yıkamaların sonunda bağlı proteinlerin elüe edilerek kolondan ayrılması için 4 kez 0,5 ml elüsyon tamponu ile muamele edilir ve elde edilen her bir elüsyon örneği saklanarak afinitik saflaştırma tamamlanır. Alternatif olarak elüsyon aşaması betamerkaptoethanol içeren 2X SDS yükleme boyası ile boncukların muamele edilmesi yoluyla da gerçekleştirilebilmektedir.

EK-26. Ni-NTA Hazır Kolon Sistemi ile Afinitik Protein Saflaştırılması (Biorad Nuvia & NGC Sistemi)

Rekombinant proteine eklenmiş olan 6xHistidin takısını hedef alan Nikel afinite kolonu yardımı ile hedef rekombinant protein yapısının yüksek saflıkta saflaştırılması için Biorad Nuvia Nikel Afinitite Kolonu (5ml) NGC kromatografi cihazı ile birlikte kullanılmıştır. Bu sistem bench saflaştırmaya göre pik analizi imkânı verdiği için elde edilecek elüsyonlarda toplanacak saf protein havuzu ile analizlerinin daha tutarlı gerçekleştirilmesi sağlanabilmektedir. Bunun amaçla, cam tüp stoğunda canlı olarak muhafaza edilen Hsp70-HGH kasetini içeren B10 pozitif klonundan 50 ml SPP besiyerine ekim yapılmış ve Ek-1'de yer alan hücre büyütme protokolüne göre büyütülmüştür. Elde edilen kültürün tamamı Ek-19'de yer alan ısı şoku indüklemeye protokolüne göre 3 saat süre ile indüklendikten sonra kültürde bulunan hücrelerin tamamı santrifüjlenmiş ve (yaklaşık 28×10^6 hücre-50ml) T100B protokolüne göre protein izolasyonu uygulanmıştır. Saflaştırma işleminin yıkama aşaması 50 mM Fosfat tamponu ile yapılmış, elüsyon ise 500 mM İmidazol içeren 50 mM fosfat tamponu kullanılarak tamamlanmış ve kolondan çıkan örnekler 1ml/fraksiyon olacak şekilde ayrı tüplere toplanmış ve saklanmıştır. Saflaştırma için NGC cihazında takip edilen ve kolon prosedürüne göre önerilen program şu şekildedir:

ChromLab™ Method Report - IMAC HGH

Created: 2/26/2016 2:16 PM Fluidic Scheme: NGC Quest Plus
Last Modified: 2/26/2016 2:16 PM Pump Head: F10
Project: Examples/Serkan IMAC Control Flow Rate: Yes
Technique: Affinity pH Monitoring: No
Method Notes:

Fraction Collection

Rack Type: F1 (12-13 mm x 100 mm tubes) Start Tube: A1
Collection Pattern: Serpentine Fraction Size: 1.0 ml

Buffer Selection

Inlet A: Buffer A
Inlet B: Buffer B

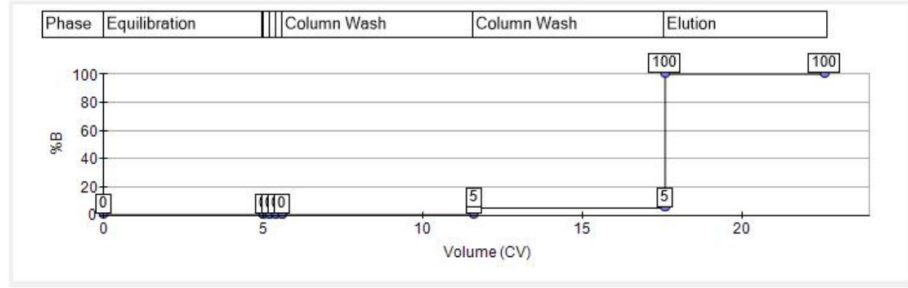
Columns

Position	Name	Volume	Max Pre Column Pressure	Max Delta Column Pressure	Default Flow Rate	Max Flow Rate
N/A	Nuvia IMAC Ni-Charged, 5 ml	4.99 ml	44 psi	44 psi	7 ml/min	20 ml/min

UV Detector

Wavelengths: 215 nm, 255 nm, 280 nm, 495 nm

Gradient Graph



Şekil EK-26.1. Ni-NTA Kolon Kromatografisi Safılaştırma Protokolü

EK-27. Dış Ortam Besiyeri Örneklerinin Toplanması ve Konsantre Edilmesi Aşamaları

Dış ortam protein örneklerinin konsantrasyon aşamaları Amicon 10 kDa ultrafiltrasyon tüpleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Amicon Ultra 10K — 10,000 MWCO). Bu sistemde 10 kDa ve üzeri proteinleri filtre üzerinde tutularak santrifüj etkisi ile sıvının uzaklaştırılması sağlanmakta ve örnek hacmi 200-250 µl hacme konsantre edilmektedir. Deneyde her bir dış ortam için filtre kapasitesi olan 15 ml örneğin tamamı kullanılarak konsantrasyon gerçekleştirilmiş ve tüm santrifüj aşamaları Swing Rotor kullanılarak +4 derecede soğutmalı santrifüjde gerçekleştirilerek 45 dakika süre ile uygulanmıştır. Deneyde aksi belirtilmedikçe her bir dış ortam örneği için 5X PIC solüsyonundan 1X final hacim olacak şekilde Proteaz inhibitör kokteyl solüsyonu eklenerek konsantrasyon aşamasındaki olası proteaz aktivitesi en aza indirilmiştir (PIC: Roche – 000000004693159001).

EK-28. Glisin-SDS PAGE Protokolü

Çalışmada kullanılan SDS jelleri için %12 Ayırma ve %5 Paketleme konsantrasyonu içeren Glisin SDS jelleri hazırlanmıştır. Buna göre kullanılan tablo şu şekildedir:

Yüzde	dH ₂ O (ml)	Akrilamid / Bis (ml)	Jel Tamponu (ml)	%10 w/v SDS (ml)
5 %	5.7	1.7	2.5	0.1
12 %	3.4	4.0	2.5	0.1

Ayırma Jel Tamponu: 1,5 M Tris HCl – pH 8.8

Paketleme Jel tamponu: 0.5 M Tris-HCl – pH 6.8

Örnek yükleme aşamasında, örneklere, örnek hacmiyle eşit miktarda 2X Laemmli boyası (beta-mercaptoethanol içeren) eklendikten sonra 10 dakika 95 °C'de kaynatma uygulanmaktadır. Yürütme aşaması paketleme jeli için sabit 40V, ayırma jeli için 80V olarak uygulanmaktadır. Örneklerin yürütme işlemi tamamlandıktan sonra protein jelleri 1 saat Comassie Blue boyası (Page Blue- Kat No:24620) ile boyamaya alınır. Boyama sonrası jeller dH₂O ile yıkandıktan sonra destain edilerek görüntülenmektedir.

EK-29. Western Blot Protokolü ve Tamponları

Western Blot için Transfer Aşaması:

- Transfer aşaması için Comassie boyaması yapılmamış jeller distile su ile yıkanarak tampon ve SDS'den uzaklaştırılır. Yıkanan jel taze hazırlanmış Towbin tamponu içerisine alınarak 30 dakika muamele edilir.
- Bu esnada jelin şişme payı hesaplanarak transferde kullanılacak PVDF membran kesilir Bu çalışmada tüm transfer işlemleri Millipore PSQ 0,45 um membran ile gerçekleştirilmiştir. Membran protokolüne göre jel boyutunda kesilen membran 15 saniye %100 metanol ile aktive edildikten sonra 15 dakika Towbin tamponunda inkübe edilir.

- Bekleme süresinde 4 adet Whatman kâğıdı membran ile aynı boyutta kesilir. Towbin tamponu ile ıslatılan kağıtlar transfer cihazında önce 2 adet alt kısma koyulduktan sonra (rulo ile hava kabarcığı alınır) üzerine membran yerleştirilir ve membran üzerine transfer edilecek jel hizalanır. Üst kısım 2 adet ıslak Whatman ile kapatılır ve tüm aşamalarda hava kabarcığı giderilerek sandviç oluşturulur.
- Transfer işlemi Biorad Turbo Blotter manuel program ile 25V, 0,2A, 35 dakika süre ile volt sabit olarak gerçekleştirilir.
- Transfer sonunda membran ve jel ayrılarak transfer edilen jel Comassie boyama ile boyanarak transfer kalitesi kontrol edilebilir.

Bloklama Aşaması:

- Membran bloklaması için %0,1 25 ml TBS-T + içerisine 5 %' yağsız süt tozu (v/w) ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat veya gece boyu +4 derecede hafif çalkalamalı bloklama yapılır.

1.cil Antikor Uygulaması:

- Bloklama sonrası %0,1 500 ml TBS-T solüsyonu (Tween- 20) ile membran Toplam 5 kez 5'er dakika süre ile çalkalamalı olarak yıkanır.
- Yıkama sonrası: 20 ml TBST + %0,1 içeren tampona 1.cil antikor eklenerek 1 saat oda sıcaklığında veya gece boyu +4 derecede hafif çalkalamalı olarak inkübe edilir.

2.cil antikor uygulaması:

- 1.cil antikor inkübasyonu sonrası membrandan bağlanmayan antikorlar %0,1 TBS-T tamponu ile 5 'er kez 5 dakika süre ile yıkanarak uzaklaştırılır.
- Yıkama sonrası membran yine %0,1 TBS-T içerisine ikincil antikor eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.

Görüntüleme:

- 2.cil antikor uygulanan membran 2 kez TBS-T, 3 kez TBS tamponu ile yıkandıktan sonra önceden oda sıcaklığına getirilmiş TMB solüsyonu ile muamele edilir. 15 dakikalık inkübasyon süresinin ardından membran distile su ile yıkanıp fotoğraflanır.

Western Blot için gerekli olan tamponların içerikleri şu şekildedir:

Towbin (Transfer Tamponu): 200 ml için – Tris: 0,303 gr, Glisin: 2,880 gr, Metanol: 40ml, DH2O: 160 ml

10X – TBS: 1lt için: 60,6 gr Tris, 87,6 gr NaCl

1X – TBST: 1/10 dilüğe edilen TBS tamponu içerisine %0,1 v/v Tween 20 eklenir.

EK-30. Sentetik Ürettirilen hGH Kaset Dizisi

>pTtGH716_Sentetik

TGGCCAATGGCTACTGGTTCTAGAACTTCTTTATTATTAGCTTTCGGTTTATTATGCTTACCTT
GGTTACAAGAAGTTCTGCTCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACGACGACGACGACAA
ATTCCCTACTATTCTTTATCTAGATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACAC
CAATTAGCTTTCGACACTTACCAAGAATTCTGAAGAAGCTTACATTCCTAAAGAACAAAAATACT
CTTTCTTACAAAACCCCTCAAACCTTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCTACTCCTTCTAACAG
AGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCTTTATTATTAATTCAATCT
TGGTTAGAACCTGTTCAATTCTTAAGATCTGTTTTTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTG
ACTCTAACGTTTACGACTTATTAAAAGACTTAGAAGAAGGTATTCAAACCTTAAATGGGTAGATT
AGAAGACGGTTCTCCTAGAACTGGTCAAATTTTCAAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAAC
TCTCACAACGACGACGCTTTATTAAAAAACTACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGG
ACAAAGTTGAAACTTTCTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGCGGTTTC
ATGAGGCCGGCC

MscI – hGH E.R Sinyal – 10xHistidin – Enterokinaz Kesim Bölgesi – Büyüme Hormonu
Gen Dizisi (Kodon Optimize) – 2x Stop (TGA) – FseI

EK-31. Kodon Optimize Büyüme Hormonu Translasyon Dizisinin Protein ile Dikey Hizalama Kontrolü

```
sp|P01241|      MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEA
Codon_Opt_Transl. MATGSRTSLLLAFLGLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEA
*****
sp|P01241|      YIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLR
Codon_Opt_Transl. YIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLR
*****
sp|P01241|      SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
Codon_Opt_Transl. SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD
*****
```

```

sp|P01241|          ALLKNYGLLYCFRKMDKVFETFLRIVQCRSVEGSCGF
Codon_Opt_Transl.  ALLKNYGLLYCFRKMDKVFETFLRIVQCRSVEGSCGF
*****

```

EK-32. pUC19 Vektörü İçerisinde Temin Edilen Sentetik Dizinin Dizi Analizi

Bilgi ve Kaset Dizisinin Karşılaştırılması

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

hGH_Sentetik      TCAGCTTGCATGCAGGCCTCTGCAGTCGACGGGCCCGGGATCCGATCCAAATTTGGCCAA
hGH_KasetDizi     -----TGGCCAA
                                     *****

hGH_Sentetik      TGGCTACTGGTTCTAGAACTTCTTTATTATTAGCTTTCGGTTTATTATGCTTACCTTGGT
hGH_KasetDizi     TGGCTACTGGTTCTAGAACTTCTTTATTATTAGCTTTCGGTTTATTATGCTTACCTTGGT
                                     *****

hGH_Sentetik      TACAAGAAGGTTCTGCTCACCACCACCACCACCACCACCACCACGACGACGACGACA
hGH_KasetDizi     TACAAGAAGGTTCTGCTCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACGACGACGACGACA
                                     *****

hGH_Sentetik      AATTCCCTACTATTCCCTTATCTAGATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGAT
hGH_KasetDizi     AATTCCCTACTATTCCCTTATCTAGATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGAT
                                     *****

hGH_Sentetik      TACACCAATTAGCTTTCGACACTTACCAAGAATTCGAAGAAGCTTACATTCCCTAAAGAAC
hGH_KasetDizi     TACACCAATTAGCTTTCGACACTTACCAAGAATTCGAAGAAGCTTACATTCCCTAAAGAAC
                                     *****

hGH_Sentetik      AAAAATACTCTTTCTTACAAAACCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCCTA
hGH_KasetDizi     AAAAATACTCTTTCTTACAAAACCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCCTA
                                     *****

hGH_Sentetik      CTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCTT
hGH_KasetDizi     CTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCTT
                                     *****

hGH_Sentetik      TATTATTAATTCAATCTTGGTTAGAACCTGTTCAATTCTTAAGATCTGTTTTCGCTAACT
hGH_KasetDizi     TATTATTAATTCAATCTTGGTTAGAACCTGTTCAATTCTTAAGATCTGTTTTCGCTAACT
                                     *****

hGH_Sentetik      CTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAGAGACTTAGAAGAAG
hGH_KasetDizi     CTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAAGAGACTTAGAAGAAG
                                     *****

hGH_Sentetik      GTATTCAAACTTTAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCCTAGAACTGGTCAAATTTTCA
hGH_KasetDizi     GTATTCAAACTTTAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCCTAGAACTGGTCAAATTTTCA
                                     *****

hGH_Sentetik      AACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCACAACGACGACGCTTTATTAAGAACT
hGH_KasetDizi     AACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCACAACGACGACGCTTTATTAAGAACT
                                     *****

hGH_Sentetik      ACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAACTTTCTTAAGAATTG

```

```

HGH_KasetDizi   ACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAAACTTTCTTAAGAATTG
                  *****
hGH_Sentetik    TTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGCGGTTTCTGATGAGGCCGGCCCCAAATTATCT
HGH_KasetDizi   TTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGCGGTTTCTGATGAGGCCGGCC-----
                  *****
hGH_Sentetik    AGATGCATTCGCGAGGTACCGAGCTCGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC
HGH_KasetDizi   -----
hGH_Sentetik    TGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGC
HGH_KasetDizi   -----
hGH_Sentetik    TGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAAT
HGH_KasetDizi   -----
hGH_Sentetik    GCGAATGCGCCTGATGCGTATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACG
HGH_KasetDizi   -----

```

EK-33. Hsp70-II Heat Shock Promotoru DNA Dizisi

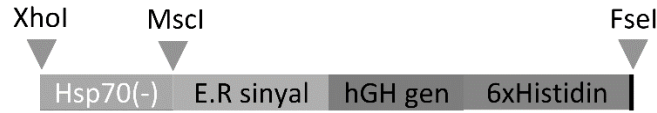
```

>Hsp70-II_Promotor (856bp)
TAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATAAATTGAAAATAACTAAAATTAAACAATTCCTTAA
ATTTATATTGTCAGATATTTTAGCTATGTAATTTGCAAGCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATA
AAACTAAAAAATATTCATTATATAATTAAAAAAGGAACTTTAAACAAAATATCTTAATTTCTATATTA
ATTTATTAATTATTTACTTTAAAGAAAAAGAGAAAACCTTCTAAATCAAATTAATTTTAATAGAAGTTTT
TAATCTATCTAAATAGTAATAATTGTTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTT
AGCAAAATATTTATTTTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTTATAGCTAATTTTTTAATTTTAA
AATATTTTTTAAAAAATTTGGTTGTTTGGTTTGTGATAGATAATTAATTATTTGTAAGTTTTAGTTTAT
AATCAATTTTTTTTAATCTTTCTAAAATTAATAATAAGATTTTTTAATCTTTCTTTTCTTATTTGCT
ATTAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAATAATTTAGAAACAATTTACTGATTTCTAAAATTCT
TTTGTTATTAAAAAATACACTTCAAATTAAAAAAAATAAAATTTCCAACAATTCTATCAGAAATTTTTT
TCGCTTTAAACAGCTAAAAAGAAATTTGATCAAAAATAAATAATCAATTAATCAAAAAAACAAAAAA
ACACTCTCAACAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAAACAAATAATTAAAAAAGTTTACAAAAATGTCTGG
AAATAAAAAGCTGAAGGAATTGGTATT
ATG içeren Hipotetik IRES & Kozak Dizisi

```

EK-34. Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Büyüme Kaset Yapısı ve Elemanların Dizi Bilgileri

Primer çiftleri ile sentetik dizi üzerinden üretilen rekombinant hGH Üretim kasetinin yapısı şu şekildedir:



İnsan Büyüme Hormonu Rekombinant Üretim Kaseti

Rekombinant Kaset DNA Dizisi:

>RekombinantKaset

```

CTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATAAATTGAAAATAACTAAAATTAAACAATTCCTT
AAATTTATATTGTCAGATATTTTAGCTATGTAATTTGCAAGCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAA
AAAATATTCATTATATAATTAAAAAGGAACCTTTAAACAAAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTATTTA
CTTTAAAGAAAAAGAGAAAACCTCTAAATCAAATTAATTTTAATAGAAGTTTTTAATCTATCTAAATAGTAATAATTG
TTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTAGCAAAATATTTATTTTATATTTCTGCTGATAA
TTAAGTGAGTGTTATAGCTAATTTTTTAATTTTAAAAATATTTTAAAAAAATTTGGTTGTTTGGTTTGTGATAGATAA
TTAATTATTTGTAAGTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAATCTTCTAAAATTAATAATAAGATTTTTTAATCTTT
CCTTTTTCTTATTTGCTATTAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAATAATTTAGAAACAATTTACTGATTTCT
AAAATCTTTTGTATTAAAAAATACACTTCAAATTAAAAAAATAAAATTTCCAACAATTCATCAGAAATTTTTTTT
CGCTTTAAACAGCTAAAAAGAAATTTGATCAAAAAATAAATAATCAATTAATTCAAAAAACAAAAAACACTCTCAA
CAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAAACAAATAATTAAAAAGTTTACAAAAATGGCCAATGGCTACTGGTTCTAGAACT
TCTTTATTATTAGCTTTTCGGTTTATTATGCTTACCTTGGTTACAAGAAGGTTCTGCTTTCCCTACTATTCCCTTTATCT
AGATTATTCGACAACGCTATGTTAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTTCGACACTTACCAAGAATTCGAAGAA
GCTTACATTCCCTAAAGAACAAAAATACTCTTTCTTACAAAACCCCTCAAACCTCTTTATGCTTCTCTGAATCTATTCCCT
ACTCCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAATTATTAAGAATTTCTTTATTATTAATTCATCTC
TGGTTAGAACCTGTTCAATTCCTTAAGATCTGTTTTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTAC
GACTTATTAAGAACTTAGAAGAAGGTATTCAAACCTTAAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCTCCTAGAACTGGTCAA
ATTTTCAAACAACTTACTCTAAATTCGACACTAACTCTCACAACGACGACGCTTTATTAAGAACTACGGTTTATTA
TACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAACTTTCTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGC
GGTTTCACCACCACCACCACCACATGATGAACCAAGGTGGCCGGCC
XhoI - Hsp70 (minus) - MscI - hGH E.R Sinyal - hGH DNA - 6xHist - 2xTGA -
SexAI - FseI

```

EK-35. Genom Entegrasyon Vektörü pNeo4-Hsp70.2(minus)-MTT Vektör Yapısı ve Dizisi

> pNeo4-Hsp70(minus)-MTT

```

GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA
TGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC
TTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTGCTCAGGAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAG
ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAG
AACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGC
AACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATG
GCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA

```

TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGG
AGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTAT
TAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCAC
TTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGTGTGATAAACTCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCA
TTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG
AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA
TACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCA
AAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT
TTTTTCTGCGCTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGC
TACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGT
TAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGG
GGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA
GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGG
AGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGT
GATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCGC
CTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
CCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGC
CTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCA
ACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG
GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTACT
AAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCG
ATATACAATTTATTTCTAAAAATATTTAAAAATAAAAAATAAAGGGTTTTGAATAACTCCTTTAATTTAAATACA
CATTTTTAAATTTTTTTTAGCTCTTTAAATATTATAAAAAATAAAAAATAACTAACTAAAAATAAATAAAAAAGATAAT
AATGATTAAAGGTATAATACTGAATAAGAAAAACATAATAGAGTACTTATTTTTTATATCACTATTTTTAATATCTT
GAAAGCAAACTTTTTTATATATCTTAAATATATTTGTATCGTTTTATTCAATTATTTTCTTTAAATTTCAAATATATT
GATAAAAAAGATGACATGTTTTTTAAAGAAAACATGAAATATAAAATAGATAAATATCAATTATTTTATTTATTAAT
ATATAAGCTGCTCAAAACATAGCTCATTCAATTAATATATGTGAATCATTAAATTTTCAAAATATTACTCATTATT
TAGGCTATCATTTATTTTTTATTTTCAATTATCCGTTTCTATTATATTTTAAATATTAAGTTGTGATTCTTGAATTTG
TGTCATGAATTATTTGTAAATCTTTTTATTTCTGATAAAAAATATAAATTGATTGACTCATGATTTAAATCATGAGTC
AACCTAACTAATTTTCAAAATCTTCTATTCTAAATATAGATGTGATTCTTGAATCTCTCTTGAATATAAAGTAATT
TTTTATATTTCTGATATAATTCTTAGCTACGTGATTACAGATTATACAATGATCCATATAAAATAATGTAAATAGTG
TATATATATATATTCGTCTTTTTTATTCTTTATATAATTTAAAAAAATTAAAAAATTTAATAAAGCTCTAATAAAAT
AAATAATAATACTAACTTAAATAATGATTGAACAAGATGGTTTACACGCTGGTTCTCCCGCCGCTTGGGTGAAAG
ACTTTTCGGTTATGACTGGGCTCAACAAACCATCGGTTGCTCTGATGCCGCCGCTCTCCGTCTTTCTGCTCAAGGTCG
TCCTGTTCTTTTCGTCAAGACCGACCTTTCTGGTGCCTTAATGAACCTCAAGATGAAGCTGCCCGTCTTTCTTGGCT
TGCCACCACCGGTGTTCTTTCGCTGCTGTCTTACGTTGTCACTGAAGCCGGTAGAGACTGGCTTCTTTTAGGTGA
AGTCCCCGGTCAAGATCTTCTTTCTTCTCACCTTGCTCCTGCCGAAAAAGTTCTATCATGGCTGATGCTATGCGTCG
TCTTCATACCCTTGATCCCGCTACCTGCCCTTTTCGACCACCAAGCCAAACATCGTATCGAACGTGCTCGTACTCGTAT
GGAAGCCGGTCTTGTGCTGATCAAGATGATCTTGACGAAGAACATCAAGGTCTTGCCCTGCCGAACCTTTTCGCCAGACT
TAAGGCCCGTATGCCGACGGTGAAGATCTTGTGCTCACCCATGGTGATGCCTGCTTACCCAATATCATGGTTGAAAA
TGGTCGTTTTTCTGGTTTTCATCGACTGTGGTCTGCTTGGTGTGCGCCGACCGTTATCAAGATATTGCCTTAGCTACCCG
TGATATTGCTGAAGAACTTGGTGGTGAATGGGCTGACCGTTTCCTTGTCCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCTCA
ACGTATCGCCTTCTATCGTCTTCTTGACGAATTCTTCTGAGATCCTTAAATTAATAAATTTCAATATATTTTACAACT
TTCATATAAAATAAATATATATATAAAATTAATTTTTAGTGTATTATATTAACATTAAAGCACCAAAAAAACGTGTT

AATATACTACTATAAAATATAATTTATTCCAAATTGACTAAAATCATTATTTTACAACCTCATTGTATATATATTTTA
 TGTC AATTATTTTTTTTAACTTTCTAAAAAATAATTCCTCTTACATACATGTTAGCTCTTAAAAATTTGTCTGCA
 AATCCAATAATAATATTTTTTTTTGCCATTAAATTTTCAAATTTTACTGGAAAAATGCAGCCCGGGGATCCACTAG
 TTCTAGAGCGGCCATCAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATA
 AATTGAAAATAACTAAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTGTCTAGATATTTTAGCTATGTAATTTGCAAGCAATA
 TTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAATATTCATTATATAATTAAAAAGGAACCTTTAAACAAAATAT
 CTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTTTACTTTAAAGAAAAAGAGAAAACCTCTAAATCAAATTAATTTTAATAG
 AAGTTTTTAATCTATCTAAATAGTAATAATTGTTATATTTGAATAATATAAAATTTATCAATAAATAATACATTTTAG
 CAAAATATTTATTTTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTATAGCTAATTTTAAATTTAAAAATATTTTAA
 AAAAATTTGGTTGTTGGTTGTGATAGATAATTAATTTTGAAGTTTGTAGTTTATAATCAATTTTAAAAATCTT
 TCTAAAATTAATAAAGATTTTTTAATCTTTCCTTTTCTTATTGCTATTAATAATCAATTTATTCATAAAGGATA
 TTTAATAATTTAGAAACAATTTACTGATTTCTAAAATCTTTTGTATTAAAAATACACTTCAAATTAAAAAAATA
 AAATTTCCAACAATTCTATCAGAAATTTTTTTCGCTTTAAACAGCTAAAAAGAAATTTGATCAAAAATAAATAATCAA
 TTAATTTCAAAAAACAAAAAAACACTCTCAACAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAAACAAATAATTAAAAAGTTTA
 CAAAAatgaacaagactctcatcttagcttttagttgttggtttggctttaactgcaccaccttggttgctttccaca
 accactctcacacatcagagttgactaagaccctTGGCCAACCTGGTGGCGGCCACCACCACCACCACCACCACC
 ACCACCACCACCCTGATGAGTTTAAACGatccttaaattaaaaattcaatatatatttacaacatttcatataaaat
 aaatatattatataaaattaatttttagtgattatattaacattaaagcaccacaaaaaacgtgtaataataactacta
 taaaatataatttattccaaattgactaaaatcattattttacaactcatttgatatatatattttatgtcaattattt
 tttttaacttttcaaaaaaaaaaattcctcttcacatacatgtagctcttaaaaatttgctgcaaatccaataata
 atattttttttgccattaaattttcaaatttttactggaaaaatgcaGTACTGGTACTGGAGAAGGATGCAAATGTA
 CAAGTTGCTAATGCTGCAAACCTGTTTAAATAAGGATGTTGTTGTGGTGATAAAGCTAAGGCTTGCTGTACTGATCCAA
 ACAGTGGATGTTGCTGCTCAAATAAGGCAAATAAATGCTGTGATGCTACTTCAAAGCAAGAGTGTTAGACTTGTTAAT
 GTTGTAATGAAATAAATATGTTAATTAATTTAAAAATATGTTGATGTTGTAATTCATAATTGCATAAAATCAGTTT
 CGTATTTTATTA AAACTTTAATATTATCATCCTAAAATTTATTA AAAA AACTGTTATTAATAAATCAATAATTATC
 GCTATTTTCATAGATTTTTTTTAAATGCAAAAAGCAAGTATGTTATTTAAATTAAGTAAACATTGATTGAAAGTATTATCT
 ACAGAAAAA A AATATATAATTTACTTTTTAATCAATTTAATTGGAAATTATTTTATATTTTTTAAAAATGAAAAA
 CATATATATTTATAATAAACATTCAAATTTATTTTACAAAATTTATATAAAAATCTTTAATAATTACAATTAATTGAA
 TTC AATCTGTAATATAAAATTACACCATACATTTATATTAACAATGACTACTTTTAGAAAAAATTTAAAAA AAT
 AAATTAATGTTTATTTTAAATTTGGTAAAAATACTCAACTTATTG AATTTAGAAAATGTAAATCAAATAAATTA
 TTTAATTTAATGAAAAAGTTTTTTTGAATTAGTAAATATTATCAACTAAAAACAAACTGAAAAACCATATTTGGTA
 ATTATTACTTTTGCATAAAGAAATTAATAATGTAAATGAAATGAATATCTCTAAAAATTATATAAAAAATATCAATT
 TTAAGCTAATTTGCAATTAATAAATGCTAAAATGAAAAATAAATCTAAAATAAAAAATATCTATGTTTCATATTTGCATA
 AAATAAATTTGTTTGTGAGTTTTTAGTTGCAATTA AAACGGTACCCAATTTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGC
 GCTCACTGGCCGTCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATC
 CCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCG
 AATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA
 GCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCCGTC AAGCTCTAA
 ATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAA AACTTGATTAGGGTGATGGTT
 CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCT
 TGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCGGATTTTCGGCCT
 ATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAG

MTT1 5' (Promotor) - Neo4 - BTU2, Hsp70-II(minus) - PLA1 - Klonlama Bölgesi -
 BTU2 - MTT 3' (Terminasyon)

EK-36. Çalışmada Kullanılan Primerler ve Dizileri

Primer İsmi	5' – 3' Dizi	Tm ₀
FGHSinyal	AAAAAGTTTACAAAATGGCCAATGGCTACTGGTTC	62
FHGH	ACAAGAAGGTTCTGCTTTCCCTACTATTCCCTTTATCTA	58
FhGHKaset	TGGCCAATGGCTACTGGTTCTAGAACTTC	60
FHSP70-XhoI	AAAACTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTA	60
FNeomisin	ATGATTGAACAAGATGGTTTACAC	60
FpIGF-PLA1	CACGTTTAAACATGAACAAGACTCTCATCTTAGC	60
FPLA1+hGH	GACTAAGACCCCTTCCCTACTATTCC	60
Fsinyal-PmeI	CACGTTTAAACATGGCTACTGGTTCTAGAACTTC	60
RGH6xHistidin (RGH6xKaset)	AAGGCCGGCCACCTGGTTCATCAGTGGTGGTGGTGGTGG TGGAACCGCAAGAACCTTCAACAAA	60
RGHKontrol	GAAACCGCAAGAACCTTCAACAG	58
RHGH-ApaI	GTGGGGCCCTCATCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGAAACC GC	50
RhGHKaset	GGCCGGCCTCATCAGAAACCGC	58
RHGH-Sinyal	AGGAATAGTAGGGAAAGCAGAACCTTCTTGTAACC	58
RHGHstrep	AAAGGCCGGCCTCATCATTTTTTCGAATTGAGGGTGAGACC AGAAACCGCAAGAACCTTCAA	58
RHSP70	GTAGCCATTGGCCATTTTGTAAACTTTTTTAATTATTTGTTT	62
RPLA1+hGH	GGAATAGTAGGGAAGGGGTCTTAGTCAACTCTGATG	60

EK-37. Rekombinant Kaseti İçeren pNeo4 –Hsp70.2(minus)-hGH-MTT Vektörünün Dizi Analizi Kontrolü

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

SekansDizi   1   GTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATT
VektörDizi   1   *****
SekansDizi  61   CAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAA
VektörDizi  61   *****
SekansDizi 121   GGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTT
VektörDizi 121   *****
SekansDizi 181   GCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT
VektörDizi 181   *****
SekansDizi 241   TGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
VektörDizi 241   *****
SekansDizi 301   TTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGG
VektörDizi 301   *****
SekansDizi 361   TATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGA
VektörDizi 361   *****
SekansDizi 421   ATGACTTGTTGAGTACTACCCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
VektörDizi 421   *****
SekansDizi 481   GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGA
VektörDizi 481   *****
SekansDizi 541   CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA
VektörDizi 541   *****
SekansDizi 601   CTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACA
VektörDizi 601   *****
SekansDizi 661   CCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTA
VektörDizi 661   *****
SekansDizi 721   CTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCAC
VektörDizi 721   *****
SekansDizi 781   TTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC
VektörDizi 781   *****
SekansDizi 841   GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
VektörDizi 841   *****
SekansDizi 901   TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA
VektörDizi 901   *****
SekansDizi 961   TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT
VektörDizi 961   *****
SekansDizi 1021  AGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA
VektörDizi 1021  *****
SekansDizi 1081  ATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG
VektörDizi 1081  *****

```

SekansDizi 1141 AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA
VektörDizi 1141 *****
SekansDizi 1201 CAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT
VektörDizi 1201 *****
SekansDizi 1261 TTCCGAAGGTAAC TGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGC
VektörDizi 1261 *****
SekansDizi 1321 CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAA
VektörDizi 1321 *****
SekansDizi 1381 TCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
VektörDizi 1381 *****
SekansDizi 1441 GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC
VektörDizi 1441 *****
SekansDizi 1501 CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA
VektörDizi 1501 *****
SekansDizi 1561 GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGAAGCGGCAGGGTCGGAA
VektörDizi 1561 *****
SekansDizi 1621 CAGGAGAGCGCACAGGGAGCTTCCAGGGGGAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCG
VektörDizi 1621 *****
SekansDizi 1681 GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCC
VektörDizi 1681 *****
SekansDizi 1741 TATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTG
VektörDizi 1741 *****
SekansDizi 1801 CTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTG
VektörDizi 1801 *****
SekansDizi 1861 AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
VektörDizi 1861 *****
SekansDizi 1921 AAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAAT
VektörDizi 1921 *****
SekansDizi 1981 GCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG
VektörDizi 1981 *****
SekansDizi 2041 TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCGGCTCGTATGT
VektörDizi 2041 *****
SekansDizi 2101 TGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG
VektörDizi 2101 *****
SekansDizi 2161 CCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCG
VektörDizi 2161 *****
SekansDizi 2221 GCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTGATATACAATTTATTTCTA
VektörDizi 2221 *****
SekansDizi 2281 AAAAATATTTAAAAATAAAAAATAAAGGGTTTGAATAACTCCTTAATTTAAATACA
VektörDizi 2281 *****
SekansDizi 2341 CATTTTTAAATTTTCTTCTTAAATATTCATAAAAATAAAAAATACTAACTAA
VektörDizi 2341 *****
SekansDizi 2401 AATAAATAAAAAGATAATAATGATTAAAGGTATAATACTGAATAAGAAAAACATAATAG
VektörDizi 2401 *****

SekansDizi 2461 AGTACTTATTTTTTATATCACTATTTTAAATATCTTGAAAGCAAACCTTTTTTATATATC
VektörDizi 2461 *****
SekansDizi 2521 TTAAAATATATTGTATCGTTTATTCAATTATTTCTTTAAATTTCAAATATATTGATAAA
VektörDizi 2521 *****
SekansDizi 2581 AAAGATGACATGTTTTTTAAAGAAAACATGAAATATAAAATAGATAAAATATCAATTATTT
VektörDizi 2581 *****
SekansDizi 2641 TATTTATTAAATATATAAGCTGCTCAAAACATAGCTCATTCAATTAATATGTGAA
VektörDizi 2641 *****
SekansDizi 2701 TCATTAATTTTCAAATATTACTCATTATTTAGGCTATCATTTATTTTATTTTCAATT
VektörDizi 2701 *****
SekansDizi 2761 ATCCGTTTCTATTATATTTTTAATATTAAGTTGTGATTCTTGAATTTGTGTCATGAATTA
VektörDizi 2761 *****
SekansDizi 2821 TTTGTAAATCTTTTTATTTCTGATAAAAAATATAAATTGATTGACTCATGATTTAAATCA
VektörDizi 2821 *****
SekansDizi 2881 TGAGTCAACCTAACTAATTTTCAAATCTTCTATTTCTAAAATATAGATGTGATTCTTGA
VektörDizi 2881 *****
SekansDizi 2941 ATCTCTCTTGAATATAAAGTAATTTTTTATATTTCTGATATAATTCTTAGCTACGTGATT
VektörDizi 2941 *****
SekansDizi 3001 CACGATTTATACAATGATCCATATAAAATAATGTAAATAGTGTATATATATATATTCGTC
VektörDizi 3001 *****
SekansDizi 3061 TTTTTTATTCTTTATATAATTTAAAAAAATTAAAAAAATTAATAAAGCTCTAATAAAAT
VektörDizi 3061 *****
SekansDizi 3121 AAATAATAATACTAACTTAAATAATGATTGAACAAGATGGTTTACACGCTGGTTCTCC
VektörDizi 3121 *****
SekansDizi 3181 CGCCGCTTGGGTCGAAAGACTTTTCGGTTATGACTGGGCTCAACAAACCATCGGTTGCTC
VektörDizi 3181 *****
SekansDizi 3241 TGATGCCGCCGCTCTCCGCTTTCTGCTCAAGGTCGTCCTGTTCTTTTCGTCAGACCGA
VektörDizi 3241 *****
SekansDizi 3301 CCTTCTGGTGCCCTTAATGAACCTCAAGATGAAGCTGCCGCTTTCTTGGCTTGCCAC
VektörDizi 3301 *****
SekansDizi 3361 CACCGGTGTTCCCTGCGCTGCTGTCTTACGTTGTCACTGAAGCCGGTAGAGACTGGCT
VektörDizi 3361 *****
SekansDizi 3421 TCTTTTAGGTGAAGTCCCCGGTCAAGATCTTCTTCTCTCACCTTGCTCCTGCCGAAAA
VektörDizi 3421 *****
SekansDizi 3481 AGTTTCTATCATGGCTGATGCTATGCGTCGTCTTCATACCCTTGATCCCGCTACCTGCCC
VektörDizi 3481 *****
SekansDizi 3541 TTTCGACCACCAAGCCAAACATCGTATCGAACGTGCTCGTACTCGTATGGAAGCCGGTCT
VektörDizi 3541 *****
SekansDizi 3601 TGTCGATCAAGATGATCTTGACGAAGAACATCAAGGTCTTGCCCCTGCCGAACCTTTTCGC
VektörDizi 3601 *****
SekansDizi 3661 CAGACTTAAGGCCGCTATGCCCGACGGTGAAGATCTTGTCGTCACCATGGTGATGCCTG
VektörDizi 3661 *****
SekansDizi 3721 CTTACCCAATATCATGGTTGAAAATGGTCGTTTTTCTGGTTTCATCGACTGTGGTCGCTC
VektörDizi 3721 *****

SekansDizi 3781 TGGTGTGCGCCGACCGTTATCAAGATATTGCCTTAGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAACT
 VektörDizi 3781 *****
 SekansDizi 3841 TGGTGGTGAATGGGCTGACCGTTTCCTTGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCTCA
 VektörDizi 3841 *****
 SekansDizi 3901 ACGTATCGCCTTCTATCGTCTTCTTGACGAATTCTTCTGAGATCCTTAAATTAAAAATTC
 VektörDizi 3901 *****
 SekansDizi 3961 AATATATATTTACAACTTTCATATAAAATAAATATATTATATAAAATTAATTTTTAGTG
 VektörDizi 3961 *****
 SekansDizi 4021 TATTATATTAACATTAAAGCACCAAAAAACGTGTTAATATACTACTATAAAATATAATT
 VektörDizi 4021 *****
 SekansDizi 4081 TATTCCAAATTGACTAAATCATTATTTTACAACCTCATTTGTATATATATTTTATGTCAA
 VektörDizi 4081 *****
 SekansDizi 4141 TTATTTTTTTTTAACTTTCTAAAAAAAATTCCTCTTCACATACATGTTAGCTCTTAAA
 VektörDizi 4141 *****
 SekansDizi 4201 AATTTGTCTGCAAATCCAATAATAATATTTTTTTTTTGCCATTAAATTTTCAAATTTTAC
 VektörDizi 4201 *****
 SekansDizi 4261 TGGAAAAATGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCATCAAGCTTATCGATAC
 VektörDizi 4261 *****
 SekansDizi 4321 CGTCGACCTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATAAATTGAAAATAA
 VektörDizi 4321 *****
 SekansDizi 4381 CTAAAAATTAAACAATTCCTTAAATTTATATTGTCAGATATTTTAGCTATGTAATTTGCAA
 VektörDizi 4381 *****
 SekansDizi 4441 GCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAAATATTCATTATATAATTA
 VektörDizi 4441 *****
 SekansDizi 4501 AAAAGGAACTTTTAAACAAAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTATTTACTTT
 VektörDizi 4501 *****
 SekansDizi 4561 AAAGAAAAAGAGAAAACCTCTAAATCAAATTAATTTAATAGAAGTTTTAATCTATCTA
 VektörDizi 4561 *****
 SekansDizi 4621 AATAGTAATAATTGTTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTAG
 VektörDizi 4621 *****
 SekansDizi 4681 CAAAATATTTATTTTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTATAGCTAATTTTTTA
 VektörDizi 4681 *****
 SekansDizi 4741 ATTTTAAATATTTTAAAAAAATTTGGTTGTTTGGTTTGTGATAGATAATTAATTATTT
 VektörDizi 4741 *****
 SekansDizi 4801 GTAAGTTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAAATCTTCTAAAATTAATAAAGATTTTT
 VektörDizi 4801 *****
 SekansDizi 4861 TAATCTTTCCTTTTCTTATTTGCTATTAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAAT
 VektörDizi 4861 *****
 SekansDizi 4921 AATTTAGAAACAATTTACTGATTTCTAAAATTCCTTTGTTATTAAAAAATACACTTCAAA
 VektörDizi 4921 *****
 SekansDizi 4981 TTAAAAAAATAAAATTTCCAACAATCTATCAGAAATTTTTTTTCGCTTTAAACAGCTAA
 VektörDizi 4981 *****
 SekansDizi 5041 AAAGAAATTTGATCAAAAATAAATAATCAATTAATCAAAAAAACAAAAAACACTCTC
 VektörDizi 5041 *****

SekansDizi 5101 AACAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAAACAAATAATTAAAAAGTTTACAAAATGGCCAA
 VektörDizi 5101 *****
 SekansDizi 5161 TGGCTACTGGTTCTAGAACTTCTTTATTATTAGCTTTCGGTTTATTATGCTTACCTTGGT
 VektörDizi 5161 *****
 SekansDizi 5221 TACAAGAAGGTTCTGCTTTCCTACTATTCTTTATCTAGATTATTCGACAACGCTATGT
 VektörDizi 5221 *****
 SekansDizi 5281 TAAGAGCTCACAGATTACACCAATTAGCTTTCGACACTTACCAAGAATTCTGAAGAAGCTT
 VektörDizi 5281 *****
 SekansDizi 5341 ACATTCCTAAAGAACAAAAATACTCTTTCTTACAAAACCTCAAACCTCTTTATGCTCTT
 VektörDizi 5341 *****
 SekansDizi 5401 CTGAATCTATTCTACTCTTCTAACAGAGAAGAACTCAACAAAAATCTAACTTAGAAT
 VektörDizi 5401 *****
 SekansDizi 5461 TATTAAGAATTTCTTTATTATTAATTCAATCTTGGTTAGAACCTGTCAATTCTTAAGAT
 VektörDizi 5461 *****
 SekansDizi 5521 CTGTTTTTCGCTAACTCTTTAGTTTACGGTGCTTCTGACTCTAACGTTTACGACTTATTAA
 VektörDizi 5521 *****
 SekansDizi 5581 AAGACTTAGAAGAAGGTATTCAAACCTTAAATGGGTAGATTAGAAGACGGTTCTCCTAGAA
 VektörDizi 5581 *****
 SekansDizi 5641 CTGGTCAAATTTTCAAACAAACTTACTCTAAATTCGACACTAATCTCACAACGACGACG
 VektörDizi 5641 *****
 SekansDizi 5701 CTTTATTAAAAACTACGGTTTATTATACTGCTTCAGAAAAGACATGGACAAAGTTGAAA
 VektörDizi 5701 *****
 SekansDizi 5761 CTTTCTTAAGAATTGTTCAATGCAGATCTGTTGAAGGTTCTTGCGGTTTCCACCACCACC
 VektörDizi 5761 *****
 SekansDizi 5821 ACCACCCTGATGAACCAGGTGGCCGGCCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC
 VektörDizi 5821 *****
 SekansDizi 5881 ACCACTGATGAGTTTAAACGATCCTTAAATTAATAATTAATATATATTTTACAACTTTC
 VektörDizi 5881 *****
 SekansDizi 5941 ATATAAAATAAATATATTATATAAAATTAATTTTTAGTGTATTATATTAACATTAAAGCA
 VektörDizi 5941 *****
 SekansDizi 6001 CCAAAAAAACGTGTTAATATACTACTATAAAATATAATTTATTCCAAATTGACTAAAATC
 VektörDizi 6001 *****
 SekansDizi 6061 ATTATTTTACAACCTCATTTGTATATATATTTTATGTCAATTATTTTTTTTAACTTTCTAA
 VektörDizi 6061 *****
 SekansDizi 6121 AAAAAAAATTCCTCTTCACATACATGTTAGCTCTTAAAAATTTGTCTGCAAATCCAATA
 VektörDizi 6121 *****
 SekansDizi 6181 ATAATATTTTTTTTTTGCCATTAAATTTTCAAATTTTACTGGAAAAATGCAGTACTGGTA
 VektörDizi 6181 *****
 SekansDizi 6241 CTGGAGAAGGATGCAAATGTACAAGTTGCTAATGCTGCAAACCTGTTTAATAAGGATGTT
 VektörDizi 6241 *****
 SekansDizi 6301 GTTGTGGTGATAAAGCTAAGGCTTGTCTGCTGATCCAAACAGTGGATGTTGCTGCTCAA
 VektörDizi 6301 *****
 SekansDizi 6361 ATAAGGCAAATAAATGCTGTGATGCTACTTCAAAGCAAGAGTGTTAGACTTGTTAATGTT
 VektörDizi 6361 *****

SekansDizi 6421 GTAAATGAAATAAATATGTTAATTAAAAATTTAAAATATGTTGATGTTGTAATTCATAATT
VektörDizi 6421 *****
SekansDizi 6481 GCATAAAATCAGTTTCGTATTTTATTA AAAACTTTAATATTATCATCCTAAAATTTATTA
VektörDizi 6481 *****
SekansDizi 6541 AAAAAAAGTGTATTAATAAATCAATAATTATCGCTATTTTCATAGATTTTTTTAAATGCA
VektörDizi 6541 *****
SekansDizi 6601 AAAGCAAGTATGTTATTTAAATTAAGTAAACATTGATTGAAAGTATTATCTACAGAAAAA
VektörDizi 6601 *****
SekansDizi 6661 AAAAATATATAATTTACTTTTTTAATCAATTTAATTGGAAATTATTTTATATTTTTTAAAA
VektörDizi 6661 *****
SekansDizi 6721 ATGAAAAAACATATATATTTATAATAAACATTCAAATTTATTTTACAAAATTTATATAAA
VektörDizi 6721 *****
SekansDizi 6781 AATCTTTAATAATTACAATTAATTGAATTCAATCTGTAAATATAAAATTACACCATACAT
VektörDizi 6781 *****
SekansDizi 6841 TTATATTAACAATGACTACTTTTAGAAAAAAATTTAAAAAAAATAAATTAATGTTTAT
VektörDizi 6841 *****
SekansDizi 6901 TTTAAATTTTGGTAAAAATACTCAACTTATTTGAATTTAGAAAATGTAAAATCAAATAAA
VektörDizi 6901 *****
SekansDizi 6961 TTATTTTAATTTAATGAAAAAGTTTTTTTGAATTAGTAAATATTATCAACTAAAAACAA
VektörDizi 6961 *****
SekansDizi 7021 ACTGAAAAACCATATTTGGTAATTATTACTTTTGCATAAAGAAATTTAATAATGTAAATG
VektörDizi 7021 *****
SekansDizi 7081 AAATGAATATCTCTAAAAATTATATAAAAAATATCAATTTTAAGCTAATTGTCAATTAAT
VektörDizi 7081 *****
SekansDizi 7141 AAATGCTAAAATGAAAAATAATCTAAATAAAAAAATATCTATGTTTCATATTTGCATAAAA
VektörDizi 7141 *****
SekansDizi 7201 TAAATTGTTTGTTCAGTTTTTTAGTTGCAATTAAAACGGTACCCAATTCGCCCTATAGTG
VektörDizi 7201 *****
SekansDizi 7261 AGTCGTATTACGGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCGT
VektörDizi 7261 *****AA*AAAT*****
SekansDizi 7321 GCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCG
VektörDizi 7321 *****
SekansDizi 7381 AAGAGGCCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACG
VektörDizi 7381 *****
SekansDizi 7441 CGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTA
VektörDizi 7441 *****
SekansDizi 7501 CACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGT
VektörDizi 7501 *****
SekansDizi 7561 TCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTG
VektörDizi 7561 *****
SekansDizi 7621 CTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCAT
VektörDizi 7621 *****
SekansDizi 7681 CGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAC
VektörDizi 7681 *****

SekansDizi 7741 TCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAG
VektörDizi 7741 *****
SekansDizi 7801 GGATTTTGCCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACG
VektörDizi 7801 *****
SekansDizi 7861 CGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAG
VektörDizi 7861 *****

EK-38. pNeo4-Hsp70.2(Plus)-MTT Vektöründe ATG’li Plus Dizisinin Dizi Analizi Kontrolü

HSP70plusSEQ -----CTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATAAATTGAAAATAA
Hsp70plusdizi -----CTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATAAATTGAAAATAA

HSP70plusSEQ CTAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTGTCAGATATTTAGCTATGTAATTTGCAA
Hsp70plusdizi CTAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTGTCAGATATTTAGCTATGTAATTTGCAA

HSP70plusSEQ GCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAATATTCATTATATAATTAA
Hsp70plusdizi GCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAATATTCATTATATAATTAA

HSP70plusSEQ AAAAGGAACTTTTAAACAAAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTATTTACTTT
Hsp70plusdizi AAAAGGAACTTTTAAACAAAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTATTTACTTT

HSP70plusSEQ AAAGAAAAAGAGAAAACCTCTAAATCAAATTAATTTTAATAGAAGTTTAAATCTATCTA
Hsp70plusdizi AAAGAAAAAGAGAAAACCTCTAAATCAAATTAATTTTAATAGAAGTTTAAATCTATCTA

HSP70plusSEQ AATAGTAATAATTGTTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTAG
Hsp70plusdizi AATAGTAATAATTGTTATATTTGAATAATATAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTAG

HSP70plusSEQ CAAAATATTTATTTTTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTTATAGCTAATTTTTTA
Hsp70plusdizi CAAAATATTTATTTTTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTTATAGCTAATTTTTTA

HSP70plusSEQ ATTTTAAAAATATTTTTTAAAAAATTTGGTTGTTTGGTTTGTGATAGATAATTAATTATTT
Hsp70plusdizi ATTTTAAAAATATTTTTTAAAAAATTTGGTTGTTTGGTTTGTGATAGATAATTAATTATTT

HSP70plusSEQ GTAAGTTTGTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAAATCTTTCTAAAATTAATAATAAGATTTTT
Hsp70plusdizi GTAAGTTTGTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAAATCTTTCTAAAATTAATAATAAGATTTTT

HSP70plusSEQ TAATCTTTCCTTTTTCTTATTGCTATTAAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAAT
Hsp70plusdizi TAATCTTTCCTTTTTCTTATTGCTATTAAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAAT

HSP70plusSEQ AATTTAGAAACAATTTACTGATTTCTAAAATCTTTTGTATTAAAAAATACACTTCAAA
Hsp70plusdizi AATTTAGAAACAATTTACTGATTTCTAAAATCTTTTGTATTAAAAAATACACTTCAAA

HSP70plusSEQ TTAAAAAAAATAAAATTTCCAACAATTCATCAGAAATTTTTTCGCTTTAAACAGCTAA
Hsp70plusdizi TTAAAAAAAATAAAATTTCCAACAATTCATCAGAAATTTTTTCGCTTTAAACAGCTAA

HSP70plusSEQ AAAGAAATTTGATCAAAAATAAATAATCAATTAATTCAAAAAACAAAAAACACTCTC
Hsp70plusdizi AAAGAAATTTGATCAAAAATAAATAATCAATTAATTCAAAAAACAAAAAACACTCTC

HSP70plusSEQ AACAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAACAAATAATTAAGTTTACAAAAATGTCCTG
Hsp70plusdizi AACAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAACAAATAATTAAGTTTACAAAAATGTCCTG

HSP70plusSEQ GAAAATAAAAAAGCTGAAGGAATTGGTATTGGCCAACTGGTGGCCGGCC-----
Hsp70plusdizi GAAAATAAAAAAGCTGAAGGAATTGGTATTGGCCAACTGGTGGCCGGCC-----

XhoI - Hsp70II - Plus (ATG’li 36 bc) - MscI - SexAI (Nokta Mutasyonu) - FseI

EK-39. NGC Fraksiyon ve Pik Entegrasyon Tablosu

Peak Parameters

Run: IMAC HGH, Trace Type: λ 3 (280 nm)

Best Fit:	8	Min Height:	N/A
Slope:	10	Min Width:	N/A
Sensitivity:	Medium	Start Range:	N/A
Size:	N/A	End Range:	N/A

Peak Table

Run: IMAC HGH, Trace Type: λ 3 (280 nm)

#	Start (CV)	End (CV)	Height (mAU)	Area (ml*mAU)	Relative Area (%)	Width At Half Height (ml)	Peak Asymmetry	Fractions	Peak Type	Concentration (mg/ml)
1	-3.96	-3.71	673.65	811.94	2.06	1.22	0.02		Automatic	
2	-3.71	-2.59	803.20	3670.48	9.31	5.59	15.12		Automatic	
3	-2.53	-0.60	768.86	6208.84	15.75	9.64	36.36		Automatic	
4	-0.58	0.07	653.59	1934.60	4.91	3.04	7.29		Automatic	
5	0.10	0.17	3.58	0.86	0.00	0.32	0.98		Automatic	
6	0.20	0.30	116.64	18.86	0.05	0.07	52.60		Automatic	

Run: IMAC HGH, Trace Type: λ 3 (280 nm)

#	Start (CV)	End (CV)	Height (mAU)	Area (ml*mAU)	Relative Area (%)	Width At Half Height (ml)	Peak Asymmetry	Fractions	Peak Type	Concentration (mg/ml)
7	0.31	0.44	223.27	47.09	0.12	0.03	0.04		Automatic	
8	0.44	0.59	3208.02	1498.20	3.80	0.46	0.78		Automatic	
9	0.62	0.78	3249.19	2598.09	6.59	0.81	6.15	A/1	Automatic	
10	0.80	1.16	3313.61	5780.50	14.66	1.78	0.27	A/1 - A/3	Automatic	
11	1.17	2.12	3352.49	8573.36	21.74	2.09	3.73	A/3 - A/5	Automatic	
12	2.12	3.24	1218.98	2831.29	7.18	1.52	5.14		Automatic	
13	3.25	3.35	279.15	131.21	0.33	0.49	0.87		Automatic	
14	6.43	6.56	336.39	165.69	0.42	0.42	0.69		Automatic	
15	6.58	8.72	124.51	466.84	1.18	9.50	108.32		Automatic	
16	9.16	11.61	202.30	854.69	2.17	0.64	10.56		Automatic	
17	11.65	11.78	84.26	37.69	0.10	0.41	3.41	A/6	Automatic	
18	11.79	12.59	15.50	33.21	0.08	0.73	23.79	A/6 - A/10	Automatic	
19	12.60	13.01	68.71	98.52	0.25	1.85	3.27	A/10 - A/12	Automatic	
20	13.40	17.70	918.88	3670.50	9.31	0.69	10.50	A/14 - A/35	Automatic	

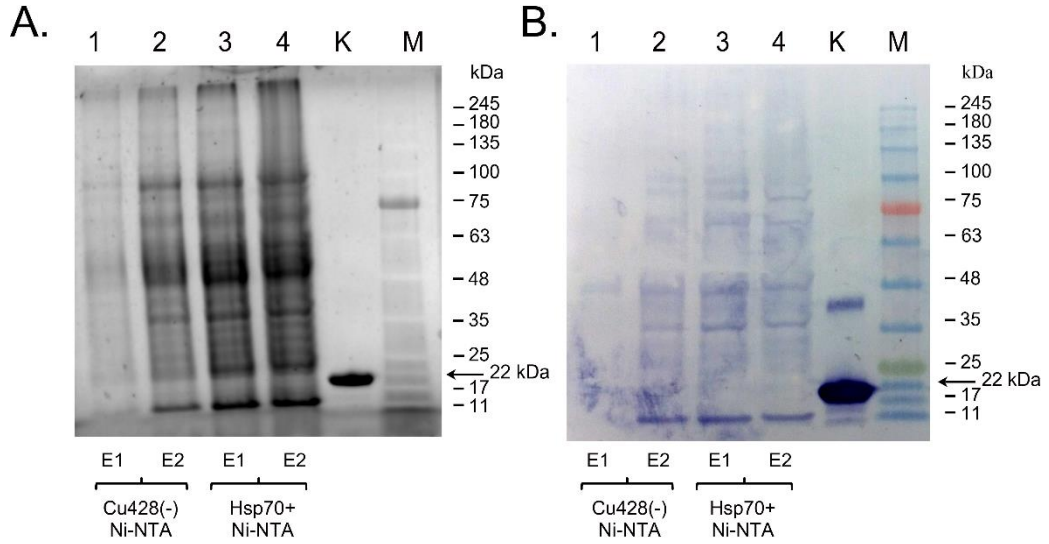
Fractions Table - λ 3 (280 nm)

#	Rack/Tube	Tube Location	Start (CV)	End (CV)	Collected Volume (ml)	Area (mI*mAU)	Relative Area (%)	Extinction Coefficient ((mg/ml) ⁻¹ cm ⁻¹)	Concentration (mg/ml)	Molecular Mass (kDa)	Molarity (μM)	Amount (mg)
1	A/1	1	0.63	0.84	1.05	3363.93	17.31					
2	A/2	2	0.84	1.04	1.00	3239.95	16.67					
3	A/3	3	1.04	1.24	1.00	3278.48	16.87					
4	A/4	4	1.24	1.44	1.00	3314.90	17.06					
5	A/5	5	1.44	1.64	0.99	2337.37	12.03					
6	A/6	6	11.63	11.83	1.00	47.87	0.25					
7	A/7	7	11.83	12.03	1.00	12.52	0.06					
8	A/8	8	12.03	12.23	1.00	9.31	0.05					
9	A/9	9	12.23	12.43	1.00	5.82	0.03					
10	A/10	10	12.43	12.63	1.00	3.40	0.02					
11	A/11	11	12.63	12.83	1.00	57.54	0.30					
12	A/12	12	12.83	13.03	1.00	45.23	0.23					
13	A/13	13	13.03	13.23	1.00	31.60	0.16					
14	A/14	14	13.23	13.44	1.00	18.60	0.10					
15	A/15	15	13.44	13.64	1.00	38.89	0.20					
16	A/16	16	13.64	13.84	1.00	289.42	1.49					
17	A/17	17	13.84	14.04	1.00	576.00	2.96					
18	A/18	18	14.04	14.24	1.00	346.54	1.78					
19	A/19	19	14.24	14.44	1.00	302.05	1.55					
20	A/20	20	14.44	14.64	1.00	259.21	1.33					
21	A/21	21	14.64	14.84	1.00	244.38	1.26					
22	A/22	22	14.84	15.04	1.00	226.32	1.16					
23	A/23	23	15.04	15.24	1.00	208.31	1.07					
24	A/24	24	15.24	15.44	1.00	190.14	0.98					
25	A/25	25	15.44	15.64	1.00	173.18	0.89					
26	A/26	26	15.64	15.84	1.00	156.12	0.80					
27	A/27	27	15.84	16.04	1.00	139.35	0.72					
28	A/28	28	16.04	16.24	1.00	122.60	0.63					
29	A/29	29	16.24	16.44	1.00	106.45	0.55					
30	A/30	30	16.44	16.64	1.00	89.52	0.46					
31	A/31	31	16.64	16.84	1.00	73.10	0.38					
32	A/32	32	16.84	17.04	1.00	56.04	0.29					
33	A/33	33	17.04	17.25	1.00	39.62	0.20					
34	A/34	34	17.25	17.45	1.00	22.96	0.12					
35	A/35	35	17.45	17.63	0.93	6.90	0.04					

EK-40. *T. thermophila* CU428 pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT / H3 Kodlu Transformant Klonundan Elde Edilen Protein Bulguları

pNeo4 genom entegrasyon sistemiyle üretilen bir önceki transformant *T. thermophila* B10 klonundan elde edilen protein verilerinin aynı vektör ve hücre sistemle farklı bir klon üretilerek, sınanması için *T. thermophila* H3 klonu analize alınmıştır. Bu transformant hücreden T100B izolasyon tamponu ile gerçekleştirilen toplam çözünür

protein saflaştırması sonrası toplam proteinden Ni-NTA afinitik saflaştırması gerçekleştirilmiş ve elde edilen elüsyon fraksiyonları Amicon ile konsantre edilerek, SDS jeline yüklenerek Stain-Free (BioRad -4568039) olarak görüntülenmiştir (Şekil EK-40.1-A). Elde edilen jel görüntüsüne göre, pozitif kontrolün 22 kDa büyüklüğündeki bandına yakın veya hipotez açısından anlamlı denk bir bant belirlenememiştir. Bu jelin tamamı anti-HGH antikoru kullanılarak Western Blot analizine alındığında (Şekil EK-40.1-B) membran sonucuna göre fazla sayıda bandın antikolar ile yüksek olasılıkla nonspesifik olarak bağlandığı anlaşılmıştır. SDS-PAGE jelinde deney grubuna ait 3. ve 4. kuyularda elde edilen her bir bant için negatif kontrol olan 2. kuyuda da denk bantlaşmalar görüldüğünden hedef proteine ait bantlar seçici olarak belirlenememiştir. Bu sebeple, bu transformant grubunun protein analizlerinde rekombinant bandı temsil edebilecek veya hipotezi destekleyecek bir bulgu elde edilememiştir.



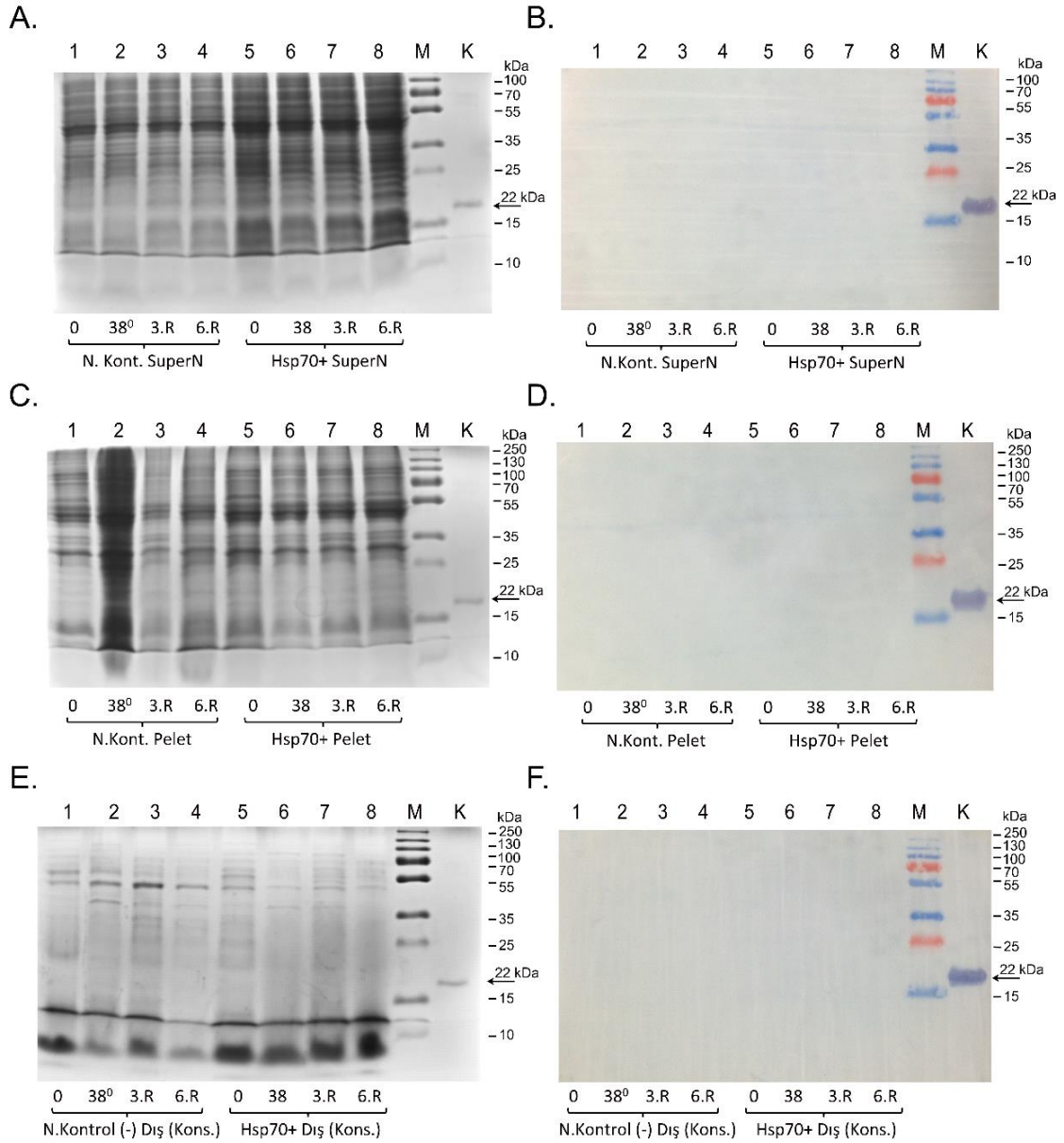
Şekil EK-40.1. *pNeo4-Hsp70.2(minus)-hGH-MTT / H3 Klonunda İndüklemeye Bağlı Toplam Protein Havuzundan Ni-NTA Saflaştırması ile Elde Edilen Fraksiyonların Analizi A. Elüsyonların SDS-PAGE Analizi. 1: Negatif Kontrol CU428 Süpernatant Konsantre 1. Elüsyon. 2: Negatif Kontrol CU428 Süpernatant Konsantre 2. Elüsyon. 3: Deney Grubu Süpernatant Konsantre 1. Elüsyon. 4: Deney Grubu Süpernatant Konsantre 2. Elüsyon. K. Pozitif Kontrol Humatrope Büyüme Hormonu-2 µg. M: Blue Elf Prestained Marker PS-105. Örnekler 1:1 hacimde yükleme tamponu ile karıştırılarak 10'ar dakika kaynatılmış ve 20 µl eşit hacimde yüklenmiştir. Yürütme 80V, Boyama: 1 s. Comassie Blue. B. Elüsyonların Western Blot Analizi. 1.cil Antikor: Anti-HGH Poliklonal 1:200 1 saat oda sıcaklığı. 2.cil Antikor: 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit 1 saat oda sıcaklığı. Görüntüleme: TMB Substratı ile 15 dk.*

EK-41. *T. thermophila* CU428 pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT / D Kodlu Klonunun Protein İfade Analizi

Hsp70.2 promotor dizisinin 3' bölgesinde yer alan ve ATG dahil 26 aminoasitlik açık okuma dizisi meydana getiren 78 bazlık nükleotid kısmının IRES elementi olarak görevi gördüğü düşünülerek vektöre geri eklenmesi ve rekombinant üretimin analizlerinin 3' parçası çıkarılmamış Hsp70.2(plus) promotorlu pNeo4 vektörü kullanılarak gerçekleştirilmesini sağlayarak hipotezi sınamak için vektör oluşturma ve transformasyonu işlemleri tamamlanmıştır. Plus promotorlu hGH kasetli vektörün transforme edildiği ve pozitif tek hücre transformant klonu olarak belirlenen ve DNA-RNA analizleri tamamlanan D kodlu hücrelerden indüklemeye bağlı protein analizlerine göre, 3 saatlik ısı şoku ile indüklendikten sonra 6 saat süre ile recovery uygulanan hücrelerden T100B izolasyonu ile elde edilen çözünür toplam protein (Supernatant), çözünür olmayan proteinler (pelet) ve dış ortam konsantre örnekler SDS-PAGE ve Western Blot ile analiz edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre CU428 indüklenmemiş negatif kontrol protein örnekleriyle birlikte analize alınan deney gruplarında SDS-PAGE verilerine göre belirgin bir rekombinant bant oluşumu görülmemiş olup negatif kontrol ve deney grubu örneklerinde her 3 protein grubu için bir farklılaşma tespit edilememiştir (Şekil EK-41.1-A, C ve E). Aynı jellerin Western Blot analizlerine göre pozitif transformanta ait Çözünür protein, Pelet ve Dış ortam örneklerinde antikorun görebildiği rekombinant bir bant oluşumu yoktur (Şekil EK-41.1-B, D ve F). Pozitif kontrol büyüme hormonu antikor tarafından görülebildiği için, genom entegrasyon vektörü ile Hsp70.2(plus) promotoru ve hipoteze ait rekombinant kaseti içerdiği bilinen bu transformant grubunda rekombinant protein üretimi açısından pozitif bulgular elde edilememiştir.

Hsp70.2(Plus) promotorlu kaseti içeren transformant grubunda, ATG'li 26 nükleotidlik parçası çıkarılan minus promotorlu transformant deneylerinde eksik olan dış ortam örnekleri ve tüm iç ortam protein örnekleri (süpernatant – pelet grubu) bu grupta analizlere dahil edilmiş ve hücrelere ekstradan recovery (hücrelerin ısı şokundan kurtarılması) aşaması uygulanmıştır. Literatürde, Hsp70.2 promotorunun eCFP proteinini üretimindeki davranışı RNA açısından analiz edildiğinde promotorun indüklenmesi ile 6 saat süre indüklemeye süresi boyunca hedef proteine ait RNA bantlarının Northern Blot analizlerinde elde edildiği görülmüştür [38]. Elde edilen bu RNA verisinin Western Blot analizi ile protein üretimi açısından uyumlu olduğu ve rekombinant proteinin hücrelerde üretildiği gösterilmiştir. Bu literatür verilerinden yola çıkılarak, aynı tasarımla bu çalışmaya entegre edilen Hsp70.2 promotorlu (3' ATG dizisi çıkarılmamış) rekombinant

pNeo4 vektörünün transforme edildiği hücrelerde, RNA açısından indüklenme saatinde pozitif cDNA verisi elde edilebilmişken protein seviyesinde sonuç elde edilememesi transformant klonunun antikorun görebileceği hedef rekombinant protein & proteinlerinin üretilmediğini işaret etmektedir

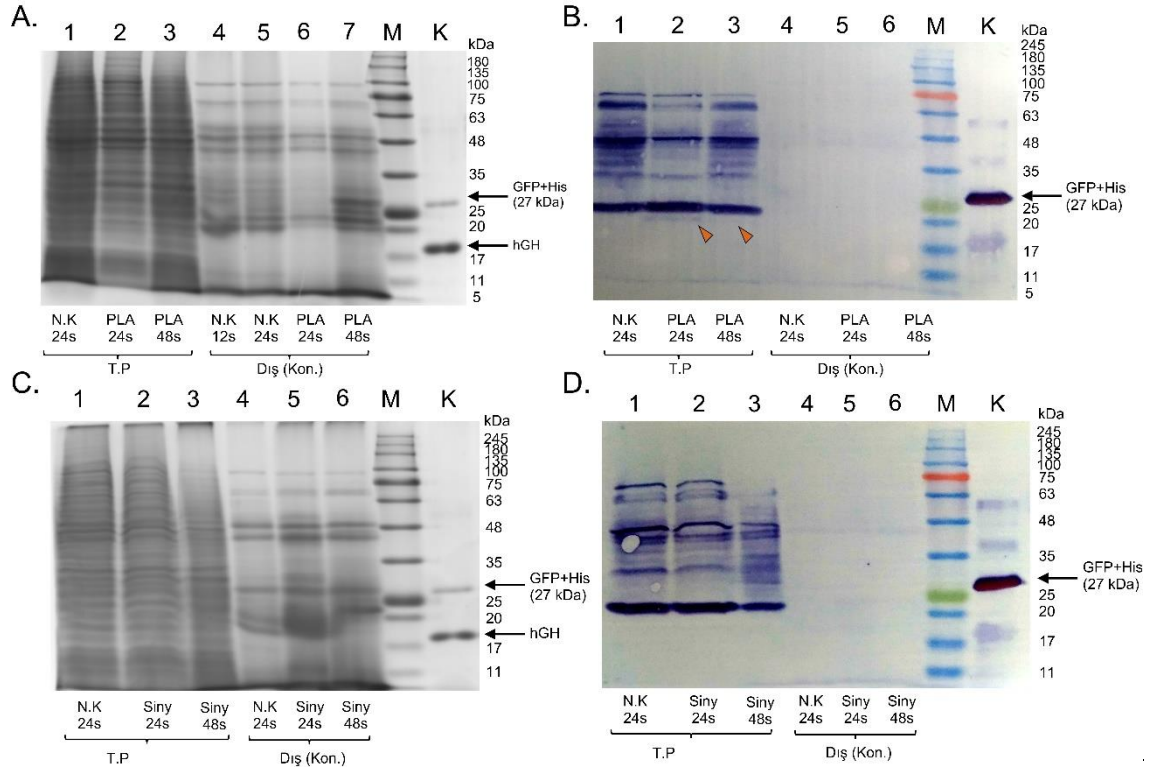


Şekil EK-41.1. pNeo4-Hsp70.2(plus)-hGH-MTT D1 Transformant Klonunda Protein Bulguları **A.** Çözünür Toplam Protein (Süpernatant) Örneklerinin SDS-PAGE Analizi. 1. Negatif Kont CU428 Süpernatant indüklenmemiş (-). 2. Negatif Kontrol 38 derece- 3 saat indüklenmiş. 3. Negatif Kontrol 30 derece- 3 saat recovery. 4. Negatif Kontrol 30 derece- 6 saat recovery. 5. Deney Grubu 38 derece- 3 Saat İndüklenmiş. 6. Deney Grubu 30 derece- 3 saat recovery. 7. Deney Grubu 30 derece- 3 saat recovery. 8. Deney Grubu- 6 saat recovery. M: Blue Elf Prestained Marker PS-105. K: Pozitif Kontrol (Humatrope Büyüme Hormonu, 1 µg). **B.** Çözünür Toplam Protein (Süpernatant) Örneklerinin Western Blot Analizi. **C.** Pelet Örneklerinin SDS-PAGE Analizi. 1. Negatif Kont CU428 Süpernatant İndüklenmemiş (-). 2. Negatif Kontrol 38 derece- 3 saat indüklenmiş. 3. Negatif Kontrol 30 derece- 3 saat recovery. 4. Negatif Kontrol 30

(Şekil EK-41.1. Devam) derece- 6 saat recovery. 5: Deney Grubu 38 derece- 3 saat indüklenmiş. 6: Deney Grubu 30 derece- 3 saat recovery. 7: Deney Grubu 30 derece- 3 saat recovery. 8: Deney Grubu- 6 saat recovery. M: Blue Elf Prestained Marker PS-105. K: Pozitif Kontrol -Humatrope Büyüme Hormonu, 1 µg. D. Pelet Örneklerinin Western Blot Analizi. E. Konsantre Dış Ortam Örneklerinin SDS-PAGE Analizi. 1. Negatif Kont CU428 Süpernatant indüklenmemiş (-). 2: Negatif Kontrol 38 derece- 3 saat indüklenmiş. 3: Negatif Kontrol 30 derece- 3 saat recovery. 4: Negatif Kontrol 30 derece- 6 saat recovery. 5: Deney Grubu 38 derece- 3 saat indüklenmiş. 6: Deney Grubu 30 derece- 3 saat recovery. 7: Deney Grubu 30 derece- 3 saat recovery. 8: Deney Grubu- 6 saat recovery. M: Blue Elf Prestained Marker PS-105. K: Pozitif Kontrol- Humatrope Büyüme Hormonu, 1 µg. F: Konsantre Dış Ortam Örneklerinin Western Blot analizi. Tüm SDS Örnekleri 1:1 hacimde yükleme tamponu ile karıştırılarak 10'ar dakika kaynatılmış ve 20 µl eşit hacimde yüklenmiştir. Yürütme 80V, Boyama: 1 s. Comassie Blue. Western Blot Uygulamaları: 1.cil Antikor: Anti-HGH Poliklonal 1:1000, 1 saat oda sıcaklığı. 2.cil Antikor: 1:10000 HRP Konjuge Anti-Rabbit 1 saat oda sıcaklığı. Görüntüleme: TMB Substratı ile 15 dk.

EK-42. Ekstrakromozomal pIGF-PLA1-hGH Vektörlü *T. thermophila* Konjugatif Transformantlarında Anti-Histidin Antikoru Western Blot Analizi

Büyüme hormonu antikoru (Anti-hGH) kullanılarak hedef proteinin üretiminin sınıdığı ve hipotez açısından anlamlı bantlar elde edilen ekstrakromozomal PLA1 ve hGH Sinyal transformant hücrelerinde analiz edilmiş olan protein örnekleri, rekombinant hedef proteinde bulunan C-terminal 6x Histidin takısı hedeflenerek anti-hGH antikoru ile gerçekleştirilen deneylerle aynı kompozisyonda SDS-PAGE jeline yüklenmiş ve Anti-Histidin antikoru ile Western Blot analizine alınarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. İlk aşamada PLA1 grubunda gerçekleştirilen Western Blot analizinde, hücre içi toplam proteinleri temsil eden negatif kontrol (1) ve deney grubunda (2, 3) Anti-Histidin antikoru ile çok fazla bant oluşumu gözlenmiştir. Toplam protein grubundaki protein örnekleri içerisinde sadece PLA'lı deney grubunda 23 kDa'lık bir protein, zayıf olarak toplam protein örneği içinde saptanmıştır (Şekil EK-42.1-B, Turuncu ok). Diğer grup hGH-Sinyalli örneklerde ise aynı zayıf bantların, hemen hemen aynı pozisyona yakın kalın bantlar tarafından maskeleniyor olabileceği değerlendirilmiştir. Her iki transformanta ait dış ortam örneklerinde ise Anti-hGH antikoruyla elde edilen 25 kDa civarı bant veya bantlar Anti-Histidin antikoru kullanılarak elde edilmemiştir (Şekil EK-42.1-B ve C). Bu nedenle Anti-hGH Western analizinde elde edilen tüm bantların kesin olarak hedef rekombinant proteine ait olup olmadıkları teyit edilememiştir.



Şekil EK-42.1. PLA1 ve E.R Sinyal-HGH-6xHistidin-pIGF Vektörlü Bulk Transformantlarda İlave Protein Analizleri. **A.** PLA1 transformant grubu örnekleri SDS-PAGE 1: Negatif kontrol (24s) T.P. 2: PLA1 -24 saat indükleme T.P. 3: PLA1 -48 saat indükleme T.P. 4: Negatif kontrol (24s) dış (k). 5: PLA1 -24 saat indükleme dış (k). 6: PLA1 48 saat indükleme dış (k). T.P. M: Blue Elf Prestained Marker PS-105. K: Pozitif Kontrol (Humatrope Büyüme Hormonu, 1 µg). Analizi **B.** PLA1 transformant grubu örneklerinin Anti-Histidin antikoruna ile Western Blot Analizi. K: Pozitif Kontrol (GFP + Humatrope hGH). Bloklama: %5 Süttozu ile Gece Boyu, 1.cil Antikor: 1:3000, Anti-Histidin Thermo MA1-21315, Mouse Monoklonal, +4 derecede gece boyu, 2.cil antikor 1:10.000 Genescript A00160 Goat Anti-Mouse HRP Conjugated, 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon. Görüntüleme: TMB Substratı ile 15 dk. **C.** hGH Sinyal transformant grubu örnekleri SDS – Western Blot Analizi 1: Negatif kontrol (24s) toplam protein (T.P). 2: Sinyal -24 saat indükleme T.P. 3: Sinyal - 48 saat indükleme T.P. 4: Negatif kontrol (24s) dış (k). 5: PLA1 -24 saat indükleme dış (k). 6: PLA1 48 saat indükleme dış (k). T.P. M: Blue Elf Prestained Marker PS-105. K: Pozitif Kontrol (GFP + Humatrope hGH). **D.** Sinyal transformant grubu örneklerinin Anti-Histidin antikoruna ile Western Blot Analizi. Bloklama: %5 Süttozu ile Gece Boyu, 1.cil Antikor: 1:3000, Anti-Histidin Thermo MA1-21315, Mouse Monoklonal, +4 derecede gece boyu, 2.cil antikor 1:10.000 Genescript A00160 Goat Anti-Mouse HRP Conjugated, 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon. Görüntüleme: TMB Substratı ile 15 dk.