

**İNSAN GEN TERAPÖTİKLERİNDEN  
İNTERFERON BETA (hIFN $\beta$ )'NİN  
*TETRAHYMENA THERMOPHILA*'DA  
REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Doktora Tezi**

**Murat Kaya**

**Eskişehir, 2019**

**İNSAN GEN TERAPÖTİKLERİNDEN İNTERFERON BETA (hIFN $\beta$ )'NİN  
TETRAHYMENA THERMOPHILA'DA REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Murat Kaya**

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Muhittin Arslanyolu

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı

*Bu tez çalışması 114Z839 no'lu TÜBİTAK ve 1410F414 no'lu Anadolu Üniversitesi  
Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.*

Mart, 2019

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Murat Kaya'nın "İnsan Gen Terapötiklerinden İnterferon Beta (hIFN $\beta$ )'nın *Tetrahymena thermophila*'da Rekombinant Üretimi ve Karakterizasyonu" başlıklı tezi 21/03/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	<u>Unvanı/Adı Soyadı</u>	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU	
Üye	: Doç. Dr. Gürler AKPINAR	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Yonca YÜZÜGÜLLÜ KARAKUŞ	
Üye	: Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU	
Üye	: Doç. Dr. Berrin ERDAĞ	

Prof. Dr. Ersin YÜCEL  
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

## ÖZET

# İNSAN GEN TERAPÖTİKLERİNDEN İNTERFERON BETA (hIFN $\beta$ )'NİN *TETRAHYMENA THERMOPHILA*'DA REKOMBİNANT ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

Murat Kaya

Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı  
Anadolu Üniversitesi

Mart 2019

Danışman: Doç. Dr. Muhittin Arslanyolu

Sağlık ve Biyoteknoloji araştırmalarında alternatif protein üretim konakçısı olarak kullanılmakta olan silli tek hücre li *Tetrahymena thermophila* ucuz ve kolay kültüre edilebilmektedir. Anti-kanser monoklonal (rituximab) antikoru, bu organizmada en son üretilen gen törapötigidir. *T. thermophila* ürettiği proteinlere disülfid bağları ile insaninkine benzer küçük yapılı glikozilasyon çatalı eklemesiyle *E. coli*' den farklılaşmaktadır. Multiple Skleroz (MS) oto-immün hastalığının tedavisinde kullanılan insan interferon beta (IFN $\beta$ ) terapötik proteininin *T. thermophila*' da rekombinant üretimi, bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır. *T. thermophila*' ya kodon optimizasyonu gerçekleştirilen hIFN $\beta$ ' nin dizisine, füzyon proteinin C-ucunda sfGFP ve 12xHis afinitik saflaştırma takısı olacak şekilde kodlayıcı diziler eklenerek oluşturulan okuma çerçevesi, kadmiyum ile indüklenen MTT1 promotörü kontrolü altına klonlanmıştır. Floresan mikroskop, SDS-PAGE ve Western blot analizleri, 48 kDa' luk Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteini ile 20 kDa' luk kırılmış Tt-hIFN $\beta$ ' yı *T. thermophila*' nın rekombinant protein olarak ürettiğine işaret etmektedir. Ayrıca afinitik takısız ve GFP' siz hücre dışına salgılatılabilen Tt-hIFN $\beta$  kodlayıcı dizi ısı-şoku promotörü altında gen kaseti olarak pTtAC2 yapay kromozom vektörüne klonlanmıştır. Transformasyon ve antibiyotik seleksiyonu ile pozitif tek hücre klon izolasyonu gerçekleştirilmiş ve rekombinant protein üretimi görüldükten sonra protein saflaştırma ile aktivite analizlerine geçilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Tetrahymena thermophila*, hIFN $\beta$ , rekombinant terapötik protein.

## ABSTRACT

### RECOMBINANT PRODUCTION AND CHARACTERISATION OF HUMAN INTERFERON BETA (hIFN $\beta$ ) THERAPEUTIC PROTEIN IN *TETRAHYMENA THERMOPHILA*

Murat Kaya

Graduate School of Science, Department of Biology, Programme in Molecular Biology  
Anadolu University

March 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhittin Arslanyolu

Unicellular eukaryotic ciliate *Tetrahymena thermophila* has cheap and simple culturing and is used in health and biotechnological studies as alternative protein production host factory. Recently, anti-cancer monoclonal antibody (rituximab) drug has been produced as recombinant protein in this organism. *T. thermophila* is able to add correct disulfide bonds and form human-like small-size glycosylation whereas *E. coli* could not. The capacitive analysis of *T. thermophila* to produce recombinant human IFN-beta protein which is used in treatment of Multiple Sclerosis (MS) disease is the aim of this thesis. Synthesized according to the *frequency of codon usage* in *Tetrahymena* codon-optimised hIFN $\beta$  sequence, coding sequences of sfGFP and 12xHis tag in its C-terminal position of hIFN $\beta$ -TtsfGFP cassette were placed and the fusion protein coding ORF was cloned into the pVGF vector under the control of cadmium inducible MTT1 promoter. Confirmation of the production of 48 kDa Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis fusion protein and 20 kDa broken Tt-hIFN $\beta$  by fluorescence microscopy and Western Blot analysis has showed that hIFN $\beta$  was successfully produced in *T. thermophila* as recombinant protein. Affinitic and GFP tag-free Tt-hIFN $\beta$  gene coding cassette with extracellular secretory sequence was also placed under the heatshock promoter in the pTtAC2 artificial chromosome vector. After the transformation of this vector into *Tetrahymena* cells, antibiotic selection and positive single cell clon isolation has been completed. Western blot analysis showed that tag-free Tt-hIFN $\beta$  recombinant protein was produced.

**Keywords:** *Tetrahymena thermophila*, hIFN $\beta$ , recombinant therapeutic protein.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi aşamalarında, engin bilgilerini esirgemeyerek, tecrübelerini her daim paylaşarak, yol göstererek, destek olarak, karşılaşılan sorunlara pozitif çözüm odaklı yaklaşımlarda bulunarak akademik bir duruş ve kimlik kazanmamda büyük rol oynayan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muhittin Arslanyolu'na teşekkür ederim.

İyi ki onlar vardı... Tüm tecrübe ve bilgilerini benimle paylaşan, bana her türlü yardımı ve desteği gösteren, laboratuvar arkadaşlarım Ayça Fulya Üstüntanır Dede, Erhan Arslan, Nurçin Küçükkoğlu'na minnetlerimi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Açelya Akdamar Kapkaç, Serkan Dereli, Mehmet Çalıseki ve Abdullah Bars'a teşekkür ederim.

Laboratuvar cihazları ve imkanlarından yararlandığım Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne, tez çalışmalarının gerçekleştirilmesindeki ihtiyaçlara finansal destek olan TÜBİTAK'a teşekkür ederim

Doktora tezim TÜBİTAK tarafından: TÜBİTAK 2211-C **Öncelikli Alanlara Yönelik Yurtiçi Doktora Burs Programı** (Sağlık/İlaç, Gıda/Biyoteknoloji, Moleküler Biyoloji ve Genetik) kapsamında kabul edilerek desteklenmiştir. Desteğinden ve sağladığı bursla doktora eğitimime katkısından dolayı TÜBİTAK BİDEB kurumuna teşekkürler.

Gerek okul dışındaki hayatımda gerekse okulla ilgili durumlarda hep yanımda olup destek olan Öztürk ve Selvi ailelerine özellikle Derviş Öztürk, İlhan Öztürk, Ceyhun Öztürk ve Ömür Selvi'ye teşekkürlerimi borç bilirim.

Akademik eğitimim boyunca sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen aileme ve Müşili bir dünya için O'na sonsuz teşekkürler.

Murat Kaya

21/03/2019

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

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 edilen 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 sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Murat Kaya

## İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI .....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Rekombinant Protein Üretim Konakçısı Olarak Kullanılan <i>Tetrahymena thermophila</i> .....	1
1.2. İnterferonlar ve Özellikleri .....	2
1.2.1. İnterferon çeşitleri .....	2
1.2.2. İnterferonların temel biyolojik görevleri.....	3
1.2.3. İnsan interferon beta hormonunun yapısı, biyolojisi ve terapötik kullanımı .....	4
1.3. İnsan İnterferon Beta'nın Rekombinant Üretimi .....	6
1.4. Amaç .....	7
<b>2. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>8</b>
2.1. Kullanılan Besiyerleri ve Hücreler .....	8
2.2. İnsan İnterferon Beta Geminin <i>Tetrahymena thermophila</i> İçin Kodon Uyumunun Yapılması .....	8
2.3. Tez Kapsamında Tt-hIFN $\beta$ İçin Tasarlanan Vektör Sistemleri .....	9
2.4. Oluşturulan <i>T. Thermophila</i> Vektörlerinin Konjugatif Hücrelere Biyolistik Silah ve Elektroporasyon Yöntemi ile Transformasyonu .....	13
2.5. Konjugatif <i>Tetrahymena</i> Hücrelerine Biyolistik Silah Yöntemi ile Transformasyonu Gerçekleştirilen pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP Vektöründen Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırma Analizleri.....	16

2.6. Konjugatif <i>Tetrahymena</i> Hücrelerine Elektroporasyon Yöntemi ile Transformasyonu Gerçekleştirilen pTtAC2-PLA36-Tt-hIFN $\beta$ Vektöründen Elde Edilen Irkların Genomik DNA kontrolleri .....	19
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>20</b>
3.1. <i>T. thermophila</i> 'da hIFN $\beta$ 'nın Füzyon Protein olarak Rekombinant Üretimi, Saflaştırılması ve Protein Analizleri.....	21
3.2. <i>T. thermophila</i> 'da TakıSIZ Dışarı Salgılanabilir hIFN $\beta$ 'nın Rekombinant Üretimi, Saflaştırılması ve Protein Analizleri .....	26
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>30</b>
4.1. Tartışma.....	30
4.2. Sonuç .....	40
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>41</b>
<b>EKLER</b>	
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Tablo 4.1.</b> Rekombinant hIFN $\beta$ üretiminde kullanılan saflaştırma yöntemleri .....	39
<b>Tablo 6.1.</b> pNeo4-TtIFN $\beta$ vektörü dizi analizi sonucunun CLUSTAL O(1.2.1) ile dikey hizalaması .....	55
<b>Tablo 6.2.</b> Kullanılan Primerler.....	68
<b>Tablo 6.3.</b> pVGF-Tt-hIFN $\beta$ hattı biyofaktör çalışmalarından elde edilen peletlerin ağırlıkları.....	77
<b>Tablo 6.4.</b> SDS-PAGE: %12'lik poliakrilamid jel kullanılır .....	89

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1.** IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$  ve IFN- $\lambda$  tarafından aktive edilen sinyal yollarının karşılaştırılması (Vilcek 2003). ..... 3
- Şekil 1.2.** IFN etki mekanizması iki bölümden oluşur: indüksiyon/üretim ve etki..... 4
- Şekil 1.3.** İnsan interferon beta proteinin amino asit dizilimi ve özellikleri. .... 5
- Şekil 2.1.** hIFN $\beta$  geninin *T. thermophila*'ya göre kodon optimizasyonu..... 8
- Şekil 2.2.** pVGF vektörüne klonlanacak kaset bilgisi. .... 10
- Şekil 2.3.** pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP ekspresyon vektörü ile gen kaseti. .... 11
- Şekil 2.4.** pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörünü içeren 14. *E. coli* bakteri kolonisinin - 80 stok muhafazası..... 12
- Şekil 2.5.** pTtAC2 yapay kromozom vektörü ve takısız klonlanacak kaset bilgisi..... 12
- Şekil 2.6.** *T. thermophila* konjugasyonu sırasındaki olaylar..... 14
- Şekil 3.1.** Ekstrakromozomal pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörü içeren *Tetrahymena* hücrelerinin CdCl<sub>2</sub> ile indüklenerek rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon proteininin üretimi, saflaştırılması ve western blot analizleri..... 25
- Şekil 3.2.** pTtAC2 yapay kromozom vektörüne afinitik takısız PLA-Tt-hIFN $\beta$  proteinin kodlayan gen bölgesinin klonlanması ve oluşturulan vektörü içeren pozitif transformantlardan gDNA kontrolleri..... 28
- Şekil 3.3.** pTtAC2 yapay kromozom vektörünü içeren hücrelerin ısı-şoku ile indüklenmesi ve western blot analizi..... 29
- Şekil 4.1.** Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon ve kırıklı bir şekilde üretildiği düşünülen Tt-hIFN $\beta$ 'da görülen ikili (çiftli) proteinlerin bantlarının. .... 33
- Şekil 4.2.** Kodon optimize IFN-beta ve GFP arasına bağlayıcı bir dizi konulması. ... 34
- Şekil 4.3.** *Tetrahymena thermophila* PL36 dışarı salgılatma sinyal peptid dizisinin SignalP biyoformatik programı ile analizi. .... 36
- Şekil 4.4.** Tt-hIFN $\beta$  üretimi için PLA'sız (A) ve PLA36' lı (B) ve PLA36 işlendikten sonra kalan PLA14-Tt-hIFN $\beta$  tasarımları (C)..... 37
- Şekil 6.1.** İndüklenmesi ısı-şoku promotörü ile gerçekleştirilecek olan Tt-hIFN $\beta$  ekspresyon kasetinin *Tetrahymena* Genomuna Entegrasyonu, gDNA, mRNA ve protein üretimi, saflaştırılması ve western blot analizleri. .... 53
- Şekil 6.2.** HSP70.2 promotörü ve sonuna eklenen 36 bç dizi ile Tt-hIFN- $\beta$ 'nın dizi bilgisi. HSP70.2 Promotoruna eklenen 36 bazlık diziyi içeren bölge. .... 63

<b>Şekil 6.3.</b>	pNeo4-HSP70.2 (+36)-Tt-hIFN $\beta$ vektörünün yapısı.....	64
<b>Şekil 6.4.</b>	<i>Tetrahymena thermophila</i> 'da ATG öncesinde ve sonrasında yer alan beşer nükleotidin frekansları. ....	65
<b>Şekil 6.5.</b>	HSP70-2+Tt-PLA+ Tt-hIFN- $\beta$ -6xHis klonlama kasetinin bir araya getirmede kullanılan primerlerin örtüşen PZR için konumları ve klonlama restriksiyon enzim bilgisi.....	65
<b>Şekil 6.6.</b>	pNeo4-HSP70.2-PLA-Tt-hIFN- $\beta$ -6XHis Vektör Yapısı. ....	66
<b>Şekil 6.7.</b>	pVGF vektörüne klonlanacak kasetin temsili gösterimi. pVGF vektöründe CdCl <sub>2</sub> il indüklenebilen MTT1 promotörü kontrolünde eksprese edilecek kaset. GST, GFP, Enterokinaz kesim bölgesi ve sinyalsiz Tt-hIFNB. ....	67
<b>Şekil 6.8.</b>	10XHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$ kaset dizi bilgisi. ....	68
<b>Şekil 6.9.</b>	pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$ Vektörünün Temsili Yapısı. ....	69
<b>Şekil 6.10.</b>	pVGF-MTT1- 10XHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$ vektörünü içeren hücrelerin indüklendikten sonra GFP floresan filtresindeki mikroskopik görüntüleri (Mikroskop kamerasının bulunmadığı dönemde cep telefonu ile çekilmiştir). ....	69
<b>Şekil 6.11.</b>	Rekombinant pVGF-MTT1- 10XHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$ ' hücre hattından yapılan Ni-NTA affinitik saflaştırmaların SDS-PAGE Analizi. .	72
<b>Şekil 6.12.</b>	pVGF-MTT1- 10XHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$ hücre hattından yapılan indükleme, protein izolasyonu ve Ni-NTA saflaştırması sonrasında elde edilen örneklerin enterokinaz ile kesimi ve analizi.....	73
<b>Şekil 6.13.</b>	pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$ ' vektörünü içeren rekombinant hücre hattının indüklenmesi sonucu elde edilen proteinlerin Ni-NTA saflaştırmasının Enterokinaz ile kesimi ve kütle spektroskopisi analizi için hazırlanması. ....	74
<b>Şekil 6.14.</b>	10xHis-GST-GFP-Ent.TtIFNb hattının Biyoreaktör Şartlarında inokülasyon sırasında ve sonrasında belirli saatlerde alınan örneklerin. ....	77
<b>Şekil 6.15.</b>	10xHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$ hattının biyoreaktör şartları.....	78
<b>Şekil 6.16.</b>	TtsfGFP-Tt-hIFN $\beta$ dizi analizi sonucunun karşılaştırılması.....	81
<b>Şekil 6.17.</b>	Meydana gelen nokta mutasyonunun; dizilerin dikey olarak hizalanmasıyla ve gelen pik diagramında eksik olan bazın yerinin gösterilmesi. ....	81
<b>Şekil 6.18.</b>	Sanger dizileme ile yapılan DNA dizi analizi.....	83
<b>Şekil 6.19.</b>	Dizi analizinden gelen sonuçlar ile orijinal vektörün dizileri clustal mega ile dikey olarak hizalanması. ....	84

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>T. thermophila</i>	: <i>Tetrahymena thermophila</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>P. pastoris</i>	: <i>Pichia pastoris</i>
<i>S.cerevisiae</i>	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CHO	:Chinese hamster ovary
IFN	:İnterferon
RNA	:Ribonükleik asit
JAK-STAT	:The Janus kinase/Signal transducers and activators of transcription
T- hücreleri	:Timus hücreleri
NKC	:Natural Killer Cell (Doğal Öldürücü Hücreler)
B-hücreleri	:Lenfositler (Bursa Fabricus)
IFN $\alpha$	:İnterferon alfa
IFN $\beta$	:İnterferon beta
IFN $\epsilon$	:İnterferon epsilon
IFN $\omega$	:İnterferon omega
IFNAR1	:interferon alpha and beta receptor subunit 1
IFNAR2	:interferon alpha and beta receptor subunit 2
IFN $\gamma$	:İnterferon gama
IFN $\lambda$	:İnterferon lambda
IL-29	:Interleukin-29
IL-28A	:Interleukin-28A
IL-28B	:Interleukin-28B
IRF-9	:IFN-regulatory (düzenleyici) faktör 9
ISRE	:IFN-stimulated response element
GAF-AAF	:gamma activated factor – alpha activated factor
GAS	:IFN-gamma activation site
IFN- $\lambda$ R1	:interferon-lambda receptor 1
IL-10R2	:Interleukin 10 Receptor Subunit Beta
pH	:power of Hydrojen
DNA	:Deoksiribonükleik asit
IFN- $\beta$ , IFN-beta	:interferon beta
hIFN $\beta$ , hIFN- $\beta$	:insan interferon beta

Cys	:Sistein (amino asit)
mRNA	:messenger (mesajcı) RNA
E.R.	:Endoplazmik retikulum
a.a.	:amino asit
NCBI	:National Center for Biotechnology Information
NM (NCBI)	:mRNA
MS	:Multipli Sklerozis
Th17	:T Yardımcı Hücreleri (İnterleukin -17)
IFN $\beta$ -1a	:Glikozilasyonlu IFN $\beta$
IFN $\beta$ -1b	:Glikozilasyonsuz IFN $\beta$
CU428	:Cornell University suş no 428 <i>Tetrahymena</i> ırkı
B2086	:20th generation of inbreeding, established in 1986 ( <i>Tetrahymena</i> ırkı)
DH5 $\alpha$	:Doug Hanahan 5 $\alpha$ , <i>E. coli</i> kompetent hücre
LB	:Lysogeny broth
NP (NCBI)	:Protein
Tt	: <i>Tetrahymena thermophila</i>
Tt-hIFN $\beta$	: <i>T. thermophila</i> insan interferon beta (rekombinant)
MTT1	:Metallothionein 1 geni
HSP70	:Heat-shock protein 70 genleri
HSP70.2	:Heat-shock protein 70.2 geni
His-Tag	:Histidin takısı
dH <sub>2</sub> O	:distile su
T. Protein	:Toplam protein
TBS	:Tris Buffered Saline (TBS)
TBS-T	:Tris Buffered Saline, %0.1 Tween içerir.
TtsfGFP	: <i>T. thermophila</i> super folder Green Floresan Protein
CdCl <sub>2</sub>	:Kadmiyum klorür
PZR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
MscI	:Micrococcus species I restriksiyon enzimi
PmeI	:Pseudomonas mendocina I restriksiyon enzimi
FseI	:Frankia species Eul1b I restriksiyon enzimi
ApaI	:Acetobacter pasteurianus sub. pasteurianus I restriksiyon enzimi
bç	:baz çifti ( base pair = bp)
GMP	:Good Manufacturing Practices (iyi üretim uygulamaları)

Lab.	:Laboratuvar
AscI	:Arthrobacter species I restriksiyon enzimi
PLA36	:Tt-phospolipase A, 36 a.a. dışarı salgılatma dizisi
PLA115	:Tt-phospolipase A, 115 a.a. dışarı salgılatma dizisi
PLA22	:Tt-phospolipase A, 22 a.a. dışarı salgılatma dizisi
MAC	:Makro çekirdek
MIC	:Mikro çekirdek
rDNA	:ribozomal DNA (ribozomal RNA geni)
dk.	:dakika
sn	:saniye
Ni-NTA	:Nickel-nitrilotriacetic acid.
SDS-PAGE	:SodiumDoecylSulphat PolyaAcrylamideGelElectrophoresis
TPIST-2	: <i>Tetrahymena</i> Protein İzolasyonu ve Saflaştırma Tamponu -2
FT	:Flow Through (Kolona bağlanmayan proteinler)
12xHis	:12 adet histidin a.a. takısı
HSP70.2	:Heat shock protein 70.2
PLA	:Phospholipase A'nın E.R.'a yönlendiren ve dışarıya salgılatmayı sağlayan N-ucu amino asit sinyal dizisi
cDNA	:complementary DNA (tamamlayıcı=komplementer DNA)

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Rekombinant Protein Üretim Konakçısı Olarak Kullanılan *Tetrahymena thermophila*

Tek hücreli silli *Tetrahymena thermophila* (*T. thermophila*), 18–41 °C sıcaklık aralığında tatlı sularda yaşayan ökaryotik bir organizmadır. Telomer (Blackburn ve Gall, 1978; Yao ve Yao, 1981), telomeraz (Greider ve Blackburn, 1989) ve ribozimin keşfi, dinein motor proteinlerinin basit analizleri (Johnson ve Omoto, 1986) ile histon asetiltransferazların transkripsiyondaki rolü (Brownell vd., 1996), ilk defa *T. thermophila*'nın kullanımı ile raporlanmıştır. Basit ve ucuz kültürizasyon, kısa 1-3.5 saat gibi bölünme zamanı, genom dizisi tamamlanmış makroçekirdek (Eisen vd., 2006) ve mikroçekirdek (Hamilton vd., 2016) ile transkriptomunun bitmiş olması ise *T. thermophila*'yı günümüzde biyolojik ve biyoteknolojik araştırmalarda yaygın kullanılan bir alternatif model organizmaya dönüştürmüştür. Silli bir parazit olan *Ichthyophthirius multifiliis* organizmasının i-antigen proteini (Clark vd., 2001), filogenetik olarak yakın diğer bir tür olan malarya paraziti *Plasmodium falciparum*' un GPI-çapalı sirkumsporozoit (CS) proteini *Tetrahymena*' da aşı üretiminde antijen olarak kullanılmak üzere üretilmiştir (Peterson vd., 2002). İnsan DNase'ı (Weide vd., 2006), alkalın fosfatazı (Aldag vd., 2011), malaria parazit aşısının antijen proteinlerinin rekombinant üretimi (Cowan vd., 2014), anti-kanser monoklonal antikoru rituximab ilacı (Calow vd., 2016), *T. thermophila*'nın alternatif rekombinant protein üretim konakçılığını, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ve hücre kültürü sistemlerine karşı daha da pekiştirmiştir. Özellikle bakteriyel protein üretim konakçılarının posttranslasyonel modifikasyonlardan disülfid bağı gerçekleştirilememesi sorununun, *T. thermophila* ile çözümlenebilmektedir. Maya ekspresyon sistemlerinin rekombinant proteinlere büyük ve çok fazla çatalanmış-glikozilasyon eklerken, *T. thermophila* normal insan glikozilasyon çatalının daha küçüğünü eklemektedir (Weide vd., 2006). Rekombinant insan proteinlerinin üretimi için kontaminasyon riski yüksek olan memeli hücre kültürü sistemleriyle (CHO gibi) kıyaslandığında düşük maliyetli *T. thermophila* biyoreaktör sistemlerinin geliştirilmiş olması ise endüstriyel uygulamalara uygun biyolojik altyapı sağlamaktadır (Kiy ve Tiedtke 1992; Kiy vd., 1996; De Coninck vd., 2000; Weide vd., 2006).

## 1.2. İnterferonlar ve Özellikleri

1957 yılında, interferon hormonunun (IFN) keşfi, grip virüsüyle enfekte olmuş civciv emriyosunda virüse karşı dirençlilik sağlayıcı bir protein olarak yapılmıştır (Isaacs ve Lindenmann 1957). Bakteri, virüs, parazit, mikroorganizma (protozoa, mikoplazma vb.) ile çift zincirli RNA'ya karşı, bağışıklık hücreleri tarafından oluşturulan interferonlar, glikoprotein aile üyesi sitokinler içinde yer alır (Sueltenfuss ve Pollard 1963; Ho 1964; Stinebring ve Youngner 1964; Wheelock 1965; Field vd., 1967). İnterferonlar genelde bir uyaran durumunda, bazı hücre tiplerinde ise sürekli (konstitüf) olarak sentezlenirler. İnterferonlar, bağışıklık sisteminin virüs gibi patojenleri veya tümörleri yok edici savunma sürecini kontrol eden JAK-STAT sinyal yolağını aktifleştirir (Lindahl vd., 1972; Lindahl vd., 1976; Velazquez vd., 1992; Darnell vd., 1994). İnterferonlar, T-hücreleri, makrofajlar, NKC (Doğal öldürücü hücreler)'ler gibi bağışıklık sistemi hücrelerini aktive ederler. B-hücreleri tarafından aktive edilen antikor sentezi ise interferonlar tarafından arttırılabilir veya azaltılabilir.

### 1.2.1. İnterferon çeşitleri

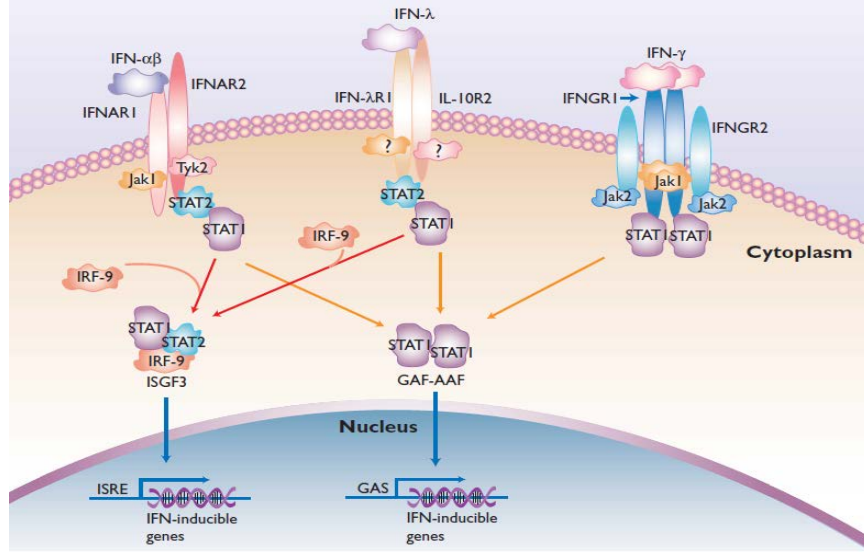
İnterferonlar; aminoasit sekans farklılıkları ve dizilimleriyle bağlandıkları farklı reseptörlere göre Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Tip I interferonlar genel olarak IFN $\alpha$  (alfa) (insanda 22 gen), IFN $\beta$  (beta) (insanda 1 gen), IFN $\epsilon$  (epsilon) ve IFN $\omega$  (omega) şeklinde gruplandırılır (Wheelock 1965; Havell vd., 1975).

**Tip I interferonlar**, spesifik hücre yüzeyi reseptör kompleksi olan ve genellikle IFN $\alpha$  reseptörü olarak da bilinen IFNAR1 ve IFNAR2 zincirlerinden oluşan reseptör kompleksine bağlanırlar (Şekil 1.1).

**Tip II Interferon** IFN $\gamma$  (gama) olarak bilinen tek bir üyeden oluşurlar ve insanın 12. kromozomunda yer alırlar. Aktivitesi mitojenlerle olan T hücreleri ve NK hücrelerinden üretilen sitokinlerdir. Temelde enfeksiyonlara karşı koruma görevinin yanında yüksek hassasiyet reaksiyonlarında ve otoimmün hastalıklarında görev yaparlar. Bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonu ve bağışıklık cevapların oluşmasında rol alan sitokinler olarak bilinirler (Wheelock 1965; Carnaud vd., 1999; Pestka vd., 2004). IFNGR-I ve IL-10R2 zincirlerinden oluşan reseptör kompleksine bağlanırlar (Kotenko ve Langer, 2004).

**Tip III İnterferon** adı altında sınıflandırılan IFN $\lambda$  (lambda) bağışıklık sistemindeki görevleri açısından Tip I interferonlara benzerdir, sentezlendikleri dokuların sayısı daha

azdır. Hastalıklardan korunmadaki görevleri ile ilgili çok fazla veri bulunmamaktadır lakin antiviral etkileri daha özgündür. Kendi arasında da IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A), IFN- $\lambda$ 3'i (IL-28B) içeren alt grublara ayrılarak adlandırılmaktadır (Sheppard vd., 2002; Kotenko vd., 2002). IL10R2 ve IFNLR1 zincirlerinden oluşan reseptör kompleksine bağlanırlar (Uzé ve Monneron, 2007).



**Şekil 1.1.** IFN- $\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$  ve IFN- $\lambda$  tarafından aktive edilen sinyal yollarının karşılaştırılması (Vilcek, 2003). IFN- $\alpha/\beta$  (tip I IFN'lar) ve IFN- $\gamma$  (tip II IFN) özgül ve farklı heterodimerik reseptörlere bağlanırlar. IFN- $\alpha$  veya IFN- $\beta$ 'nin reseptörüne bağlanması iki reseptör-ilişkili tirozin kinaz ile Jak1 ve Tyk2'nin aktivasyonuna yol açar, devamında STAT1 ve STAT2'nin tirozin fosforilasyonu gerçekleşir. Fosforile olan STAT1 ve STAT2 IRF-9 (IFN-regulatory (düzenleyici) faktör 9) ile bir araya gelir ve trimerik ISGF-3 kompleksini oluşturur. Bu kompleksin nükleusa transfer olması üzerine, IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$ -duyarlı genlerin birçoğunda bulunan *cis* elementi ISRE (IFN-stimulated response element = IFN-uyarılmış karşılık elementi)'ye bağlanır. Diğer tarafta IFN- $\gamma$ 'nin reseptörüne bağlanması Jak1 ve Jak2 tirozin kinazların tirozin fosforilasyonuna yol açar bu da STAT1'in fosforilasyonu ile sonuçlanır ama STAT2 fosforile olmaz. Fosforile STAT1 GAF-AAF oluşturmak için homodimerleşir ve nükleusa giderek, IFN- $\gamma$ -uyarılabılır genlerin birçoğunda bulunan IFN- $\gamma$  aktivasyon bölgesi elementine (GAS) bağlanır. IFN- $\gamma$  gibi, IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  sinyal yolağı da GAF-AAF kompleksi oluşumuna ve GAS düzenleyici elementine bağlanmasına yol açabilir. IFN- $\lambda$  proteinleri (IL-28A, IL-28B and IL-29 olarak da isimlendirilmiş olan) daha önce bilinmeyen IFN- $\lambda$ R1 alt ünitesi ile IL-10R2'den oluşmuş heterodimerik reseptör kompleksine bağlanır. IFN- $\lambda$  tarafından aktive edilmiş tirozin kinazlar henüz tanımlanmamış olmasına rağmen eldeki veriler hem STAT1 hem de STAT2'nin aktive edildiğine işaret etmektedir. Devamındaki sinyal yollarının aktive edilmesi IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$  tarafından aktive edilenden ayırt edilemez gibi görünmektedir.

### 1.2.2. İnterferonların temel biyolojik görevleri

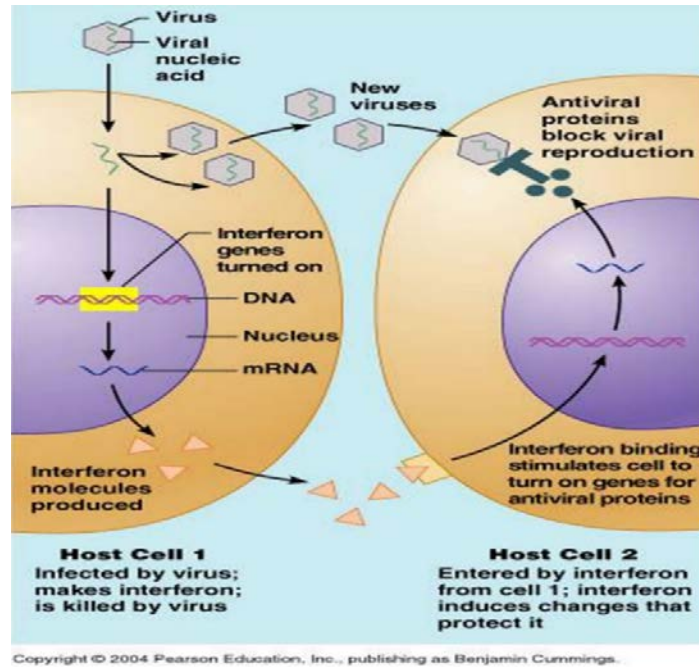
1) **Antiproliferatif etki;** normal hücrede dönüşümlü, neoplazik hücrede ise dönüşümsüz sitostazı indükler, böylece hücrelerin bölünmesini durdurur (Paucker vd.,

1962).

2) **İmmünomodülatör etki;** hücrelerin yüzey majör histokompatibilite antijenlerinin ekspresyonu ile doğal öldürücü (natural killer cell) hücre aktivitesini artırmaktadır (Isaacs ve Lindenmann, 1957).

3) **Antiviral etki;** hücre içine giren virüsün viral RNA ve protein sentezini inhibe etmektir (Isaacs ve Lindenmann, 1957). İnterferonların antiviral etkisi rekombinant üretilen interferon proteinlerinin biyoaktivite tayininde kullanılmaktadır.

4) **Antibakteriyel etki;** asidik pH şartlarında *Staphylococcus aureus* bakterisini öldürebilme eklenmiştir (Kaplan vd., 2018).



Şekil 1.2. IFN etki mekanizması iki bölümden oluşur: indüksiyon/üretim ve etki (Marieb ve Katja, 2016). Virüs hücre içine girer, DNA veya RNA sını açığa çıkarır. Yeni virüs partikülleri oluşur. Viral nükleik asit hücrenin çekirdeğine sinyal gönderir. IFN serbest kalır (veya prekürsör IFN virüsün girmesinden mütevellit IFN ye dönüşür. IFN komşu hücrelerin hücre membranına gelir veya özümser. Hücre nükleusuna sinyal gönderilir. Bir veya daha fazla protein sentezlenir. Viral replikasyon yok edilir.

### 1.2.3. İnsan interferon beta hormonunun yapısı, biyolojisi ve terapötik kullanımı

İnsan IFN $\beta$ 'sı 22.5 kDa büyüklüğünde olup %20 şeker içerir ve ilk 21 amino asit dizisi endoplazmik retikuluma (E.R.) yönlendirici sinyal peptid görevi üstlenir, 21 a.a (amino asit) sinyal dizisiyle birlikte toplamda 187 a.a asit uzunluğunda bir glikoproteindir. *İn-vitro* şartlarda biyolojik aktivitesi için glikozilasyona ihtiyaç duymamasına rağmen glikozilasyonlu formunun biyolojik aktivitesinin daha yüksek



seviyeleri, IFN $\beta$ -1b'nin deri-altı tedavi seviyelerine göre daha düşüktür (Tremlett vd., 2004). Ayrıca IFN $\beta$ -1b ile tedavi olan hastalarda hormonu baskılayıcı antikor oluşma riski bulunmakta (Polman vd., 2010) olup IFN $\beta$ -1a ile tedavi olan hastalarda bu risk oranı IFN $\beta$ -1b'ye göre çok daha düşüktür ve zamanla azalma eğilimindedir (Grossberg vd., 2011; Hegen vd., 2012). MS hastalık tedavisinde, IFN $\alpha$ 'nın bu yan etkileri ile IFN $\gamma$ 'nın (gama) yüksek atak seviyesi ilaç olarak kullanımlarının sonlanmasına neden olmuştur (Panitch vd., 1987).

### 1.3. İnsan Interferon Beta'nın Rekombinant Üretimi

1979 yılında, Taniguchi ve vd. ilk defa insandan IFN $\beta$  izole ederek, cDNA'sını üretmişlerdir. Knight ve vd. (1980) ile Zoon ve vd. (1980) ise insan IFN $\beta$  proteinin saflaştırılması ve kısmi dizileme işlemini raporlamışlardır. Rekombinant olarak *E. coli* hücrelerinde ürettirilen glikozilasyonsuz IFN $\beta$ -1b'lerin biyolojik aktivitesi bulunmaktadır. CHO hücrelerinde glikozilasyonlu IFN $\beta$ -1a'ların rekombinant üretimi, *E. coli* üretimine göre daha yüksek maliyetli, uzun zaman alan ve iş yoğun bir sürece sahiptir.

MS tedavisinde kullanılmak üzere IFN $\beta$  rekombinant olarak ilk defa *E. coli*'de 18.5 kDa büyüklüğünde, bir Alman ilaç şirketi olan Schering AG tarafından patentlenmiş ve Betaferon/ Betaseron interferon-1b (1993) adı altında üretilerek, pazara sunulmuştur (The IFN $\beta$  Multiple Sclerosis Study Group. 1993). Betaferon glikozilasyon içermediği gibi 17. sistein amino asiti yerine serin amino asiti içermektedir ve 1. metiyonin amino asiti silinmiştir. IFN $\beta$ 'nin 17., 31., ve 141. amino asit pozisyonlarında sistein bulunması ve bu sisteinlerin bir veya birkaçının inaktif dimer veya oligomer ile intermoleküler disüfid bağı oluşturmalarından dolayı 17. sistein silinmiştir. Bu nedenle; Betaferon/ Betaseron interferon-1b proteini sadece iki sistein aminoasiti içerir. Böylelikle sadece bir tane intramoleküler disüfid bağı yapabilir, yani dimer ve oligomer oluşturabilecek boşta sülfidril grubu bulunmamaktadır (Mark vd., 1984).

Terapötik pazar payı daha yüksek olan ve daha etkin bir ilaç olduğu görülen IFN $\beta$ -1a üretiminde konakçı olarak bir memeli hücresi olan CHO (Chinese hamster ovary cells)'lar kullanılmıştır. Bu bağlamda Fransız ilaç şirketi Biogen 1996 yılında rekombinant olarak interferon betayı CHO hücrelerinde üreterek, Avonex adı altında patentlemiştir. Glikozilasyonlu olan doğal insan IFN $\beta$ -1a'sı 22-24 kDa'luk büyüklüktedir (Jacobs vd., 1995). Türkiye' de %8 lik pazar payına sahip ve beşinci en çok ihtiyaç

duyulan terapötik protein olan interferon  $\beta$ , 2015 yılı tahmini terapötik sektör pazar dağılımında altıncı sırada bulunmaktadır (Kiper, 2013).

#### 1.4. Amaç

2001 yılında Bilim ve Teknoloji Yüksek Kurulu tarafından hazırlanıp yayımlanan ve 2004 yılında güncellenen Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesi'ne ve 2004 yılında "VİZYON 2023 PROJESİ BİYOTEKNOLOJİ ve GEN TEKNOLOJİLERİ STRATEJİ GRUBU tarafından yayımlanan rapora göre "Sağlık Biyoteknolojisi ve Gen Teknolojileri" alt ana başlığında yer alan "Türkiye'nin sağlıkta biyoteknoloji ve gen teknolojileri kapsamındaki somut hedefleri"nden "**TERAPÖTİK PROTEİN İLAÇLAR** (Patent-Sonrası Terapötik Proteinler Başta Olmak Üzere Terapötik Proteinlerin Üretimi)" kapsamında katma değeri yüksek olan ilaçlardan "terapötik proteinler" (rekombinant proteinler ve monoklonal antikorlar)'in rekombinant protein üretim teknikleri yoluyla Türkiye'de üretilebilmesi ve bilimsel altyapının oluşturularak bu alanda donanımlı yetkin araştırmacıların yetiştirilmesi hedefleri doğrultusunda bu tez çalışması gerçekleştirilmiştir.

Vizyon 2023 kapsamında; *E. coli*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae* ve CHO (Çin hamsteri ovaryum) hücre kültürü sistemleri gibi hücre hatlarına alternatif rekombinant üretim fabrikası *T. thermophila*' da insan hIFN $\beta$  proteininin üretimi, tez çalışmasının ana amacını oluşturmaktadır. Üretilen proteininin aktivitesinin ticari olarak satılan insan muadil ilaç hormonlar ile karşılaştırmalı olarak tanımlanması, çalışmanın ikincil hedefidir.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Kullanılan Besiyerleri ve Hücreler

*T. thermophila* CU428-VII ve B2086-II ırkları Cornell Üniversitesi, *Tetrahymena* Stok Merkezi'nden sağlanmıştır. Hücreler deneyin amacına göre SPP (%2 proteoz peptone %0.1 yeast extract %0.2 glukoz, 33 µM FeCl<sub>3</sub>) ya da NEFF (%0.25 proteoz peptone, %0.25 yeast extract %0.5 glukoz, 33.3 µM FeCl<sub>3</sub>) besiyerinde gece boyunca logaritmik faza ulaşıncaya kadar 30 °C' de petrilere/erlenlerde büyütülmüştür (Gaertig ve Gorovsky, 1992). Klonlama deneylerinde *E. coli* suşlarından: DH5α [*F*<sup>-</sup>*Δlac U169* (*Φ80 lacZ ΔM15 supE44 hsdR17 recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1*)] (Invitrogen, 18265-017) kompetent hücreleri kullanılmış LB broth veya LB agar besiyerlerinde 37 °C' de gece boyunca büyütülmüştür.

### 2.2. İnsan Interferon Beta Geminin *Tetrahymena thermophila* İçin Kodon Uyumunun Yapılması

*T. thermophila*'da insan hIFNβ geninin (NCBI gen ve protein erişim numaraları: NM\_002176.4 ve NP\_002167.1) rekombinant olarak yüksek verimde üretiminin yapılabilmesi için ilk adım; proteinin amino asit dizilimini değiştirmeksizin gen düzeyinde *T. thermophila*'ya kodon uyumlu hale getirmektir. hIFNβ geni üzerinde Şekil 2.1'de gösterilen mutasyonlar belirlenmiş(Salim vd., 2008), genler Shinegene (Çin) firmasına sentetik olarak ürettirilmiştir.

	M T N K C L L Q I A L L L C F S T T A L S
Tt.IFN-β	ATG ACT AAC AAA TGC TTA TTA CAA ATT GCT TTA TTA TTA TGC TTC TCT ACT ACT GCT TTA TCT 63
H.IFN-β	ATG ACC AAC AAG TCT CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTC CTG CTG TGC TTC TCC ACC ACA GCT TTA TCC 63
	M S Y N L L C F L Q R S S N C Q C Q K L L
Tt.IFN-β	ATG TCT TAC AAC TTA TTA GCT TTC TTA CAA AGA TCT TCT AAC TGC CAA TGC CAA AAA TTA TTA 126
H.IFN-β	ATG AGC TAC AAG TTG CTT GCA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TCT CAG TCT CAG AAG CTG CTG 126
	W Q L N G R L E Y C L K D R R N F D I P E
Tt.IFN-β	TGG CAA TTA AAG GCT AGA TTA GAA TAG TGC TTA AAA GAC AGA AGA AAC TTG GAG ATT GCT GAA 189
H.IFN-β	TGC CAA TTG AAT GCG ACG CTT GAA TAG TGC CTC AAG GAC ACG ACG AAC TTT GAC ATC CCT GAG 189
	E I K Q L Q Q F Q K E D A A V T I Y E M L
Tt.IFN-β	GAA ATT AAA CAA TTA CAA CAA TTC CAA AAA GAA GAC GCT GCT ACT ATT TAG GAA ATG TTA 252
H.IFN-β	GAG ATT AAG CAG CTC CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC GCG GCA GTG ACC ATC TAT GAG ATG CTC 252
	Q N I F A I F R Q D S S S T G W N E T I V
Tt.IFN-β	CAG AAC ATT TTT GCT ATT TTT AGA CAA GAG TCT TCT ACT GGT TGG AAG GAA ACT ATT GTT 315
H.IFN-β	CAG AAC ATG TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TGA TGG AGC ACT GGC TGG AAG GAG ACT ATT GTT 315
	E N L L A N V Y H Q R N H L K T V L E E K
Tt.IFN-β	GAA AAC TTA TTA GCT AAG GTT TAC CAG CAA AGA AAC CAG TTA AAA ACT GTT TTA GAA GAA AAA 378
H.IFN-β	GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG AGA AAC CAT CTG AAG ACA GTC CTG GAA GAA AAA 378
	L E K E D F T R C K R M S S L H L K R Y Y
Tt.IFN-β	TTA GAA AAA GAA GAG TTT ACT AGA GCT AAA AGA ATG TCT TCT TTA CAC TTA AAA AGA TAT TAC 441
H.IFN-β	CTC GAG AAA GAA GAT TTC ACC ACG GCA AAA GCG ATG AGC AGT CTC CAG CTC AAA AGA TAT TAT 441
	G R I L H Y L K A K E D S H C A W T I V R
Tt.IFN-β	GCT AGA ATT TTA CAG TAC TTA AAA GCT AAA GAA GAC TCT CAC TGC GCT TGG ACT ATT GTT AGA 504
H.IFN-β	GCG AGC ATT CTC CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG GAC AGT CAC TCT GCG TGG ACC ATA GTG AGA 504
	V E I L R N P Y V I N R L T G Y L R N *
Tt.IFN-β	GTG GAA ATT TTA AGA AAC TTG TAC GAT ATT AAC AGA TTA ACT GGT TAC TTA AGA AAC TGA 564
H.IFN-β	CTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT TAC CTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC GGA AAC TGA 564

Şekil 2.1. hIFNβ geninin *T. thermophila*'ya göre kodon optimizasyonu. Tt.IFN-β: *T. thermophila* uyumlu interferon β, H.IFN-β: İnsan interferon β. Koyu gri ile renklendirilen

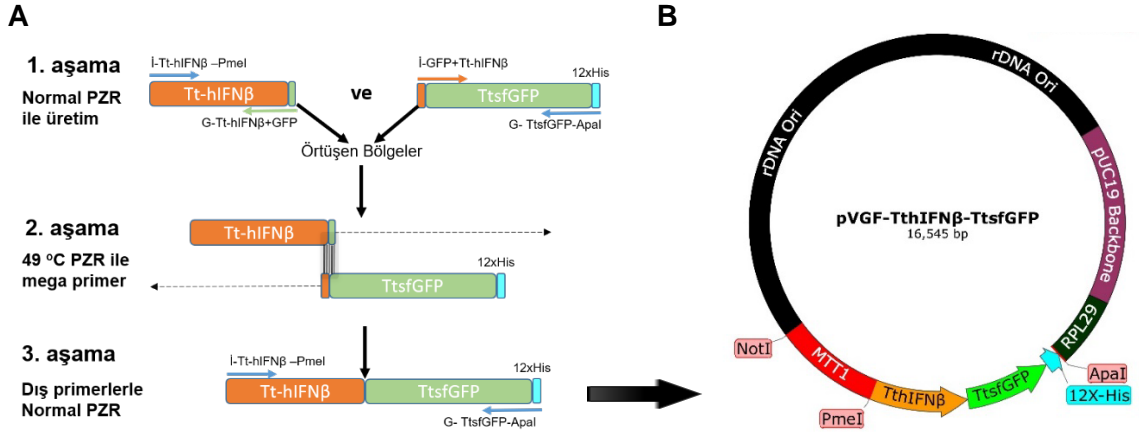
nükleotidlerde değişim yapılmıştır. hIFN $\beta$  nükleotidlerinden %28' lik kısmı mutasyon ile değiştirilmiştir.

### 2.3. Tez Kapsamında Tt-hIFN $\beta$ İçin Tasarlanan Vektör Sistemleri

hIFN $\beta$  proteininin, sitoplazmik rekombinant üretimi için insan sinyal dizisi uzaklaştırılmış ve hIFN $\beta$  geninin C-terminaline *T. thermophila*'ya kodon uyumu yapılmış TtsfGFP kodlayıcı gen dizisi (Yılmaz ve Arslanyolu, 2014) ilave edilmiştir (Şekil 2.2). Oluşturulan bu füzyon geninin *T. thermophila*'da ekspresyonu için CdCl<sub>2</sub> ile indüklenebilir MTT1 promotörü içeren 9000 kopya orijinli (transient) pVGF (pIGF -1) (Malone vd., 2005, Haddad vd., 2002) vektörü kullanılmıştır (Şekil 2.3.B). Vektörün içerisine klonlanacak füzyon protein kaseti, örtüşen PZR (Pogulis vd., 1996) yöntemi kullanılarak (Şekil 2.3.A) aşağıdaki adımlarda oluşturulmuştur.

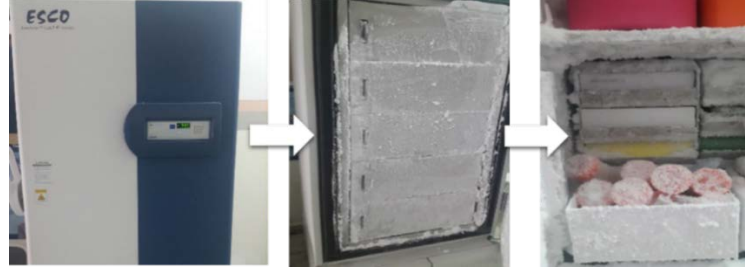
Sinyalsiz Tt-hIFN $\beta$  MscI ve PmeI restriksiyon enzim kesim dizilerini içeren ileri primer (AAAGTTTAAACTGGCCAATGTCTTACAACCTATTAGGTTTCTTAC) ve TtsfGFP'nin 5' bölgesinden 12 baz içeren (örtüşen PZR için) Tt-hIFN $\beta$ +TtsfGFP geri primeri (CTTCACCTTTAGAGTTTCTTAAGTAACCAGTTAATCTGTTAATG) ile ~528 bç DNA bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır. *T. thermophila* için kodon optimize edilmiş TtsfGFP'den tasarlanan ileri primer (içerisinde örtüşen PZR için kullanılan Tt-hIFN $\beta$  3' bölgesinden 14 baz yer almaktadır) (GTTACTTAAGAACTCTAAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGTG) ve 12x-histidin takılı TtsfGFP'den FseI ve ApaI restriksiyon enzim kesim dizilerini içeren geri primer ile (AAAGGGCCCGGCCGCCTCATCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG) ~784 bç lik DNA bölgesi üretilmiştir. Üretilen bu bölgeler örtüşen PZR yönteminde mega primer olarak kullanılarak örtüştürülmüş ve 1285 bç büyüklüğünde bir kalıp DNA üretilmiştir. Üretilen bu DNA örtüşen PZR yönteminin diğer aşamasında kalıp olarak kullanılmış ve ileri Tt-hIFN $\beta$  ve geri TtsfGFP primerleri ile çoğaltılarak kaset oluşturulmuştur (Şekil 2.3).





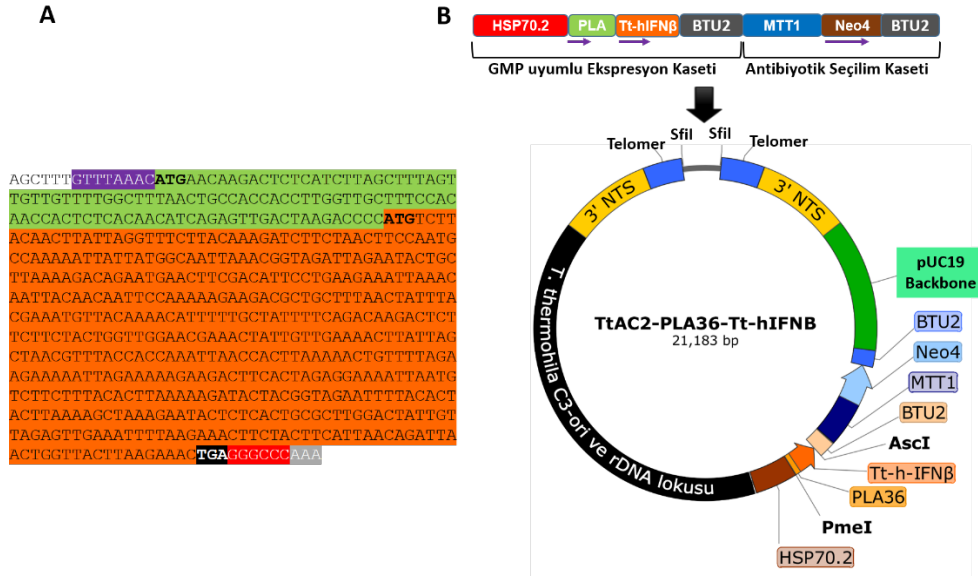
**Şekil 2.3.** pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP ekspresyon vektörü ile gen kaseti. A) pVGF- Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP ekspresyon kasetinin örtüşen PZR ile şematik gösterimi. pVGF vektöründe CdCl<sub>2</sub> ile indüklenebilen MTT1 promotörü kontrolünde eksprese edilecek kaset; Tt-hIFN $\beta$ -GFP-12xHis 1. aşamada Tt-hIFN $\beta$  ve TtsfGFP-12xHis DNA dizileri ilgili primerlerle ayrı ayrı üretilirler ve jelden saflaştırılırlar. Jelden saflaştırılan DNA'lar 2. aşamada örtüşen PZR yönteminde 49 °C'de 7 döngü boyunca primer eklenmeksizin reaksiyona alınırlar. Bu aşamada örtüşen bölgelere sahip DNA'lar birbirleriyle hibridize olduklarında DNA polimeraz bu kalıpları çoğaltır. Yani reaksiyona konulan büyük DNA parçaları mega-primer gibi davranır. Örtüşen PZR'ın sonraki aşamasında ise dış primerler reaksiyona eklenerek oluşan kaset kalıp olarak kullanılır ve DNA polimeraz bu kaseti çoğaltır. Çoğaltılan parça yine jelden saflaştırılır. Jelden saflaştırılan Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis kaseti PmeI-ApaI enzimleriyle kesim reaksiyonuna alınır. Kesildikten sonra da saflaştırılarak pVGF vektörüne klonlanır B) pVGF- Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörünün temsili yapısı. 8-10 bin kopyaya çıkabilen vektör sistemi ile ekstrakromozomal (transient) protein ekspresyonu CdCl<sub>2</sub> ile indüklenebilen MTT1 promotörü kontrolünde gerçekleştirilir. Bu vektör içerisinde; promotordan sonra *Tetrahymena thermophila*'ya kodon optimize insan interferon beta geninin (E.R. sinyalsiz) stoplazmik protein üretimi gerçekleştirecek dizi, sonrasında yeşil ışımaya yapan TtsfGFP protein kodlayan dizi ve devamında da saflaştırmada kullanılabilecek Histidin takısı yer almaktadır.

Bu kasetin 5' ucunda bulunan *PmeI* ve 3' ucunda bulunan *ApaI* restriksiyon kesim bölgeleri ile pVGF (pIGF-1) vektörüne klonlama yapılmıştır (Şekil 2.3.B). Bu şekilde sitoplazmik protein üretimi gerçekleştirilebilecektir. Oluşturulan vektör **pVGF- Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP** olarak isimlendirilmiş ve *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) kompetent hücrelerine ısı-şoku yöntemiyle transforme edilmiştir. Elde edilen koloniler restriksiyon kesim kontrolleriyle teyit edilmiştir. Pozitif kolonilerden 14. koloniden 4 adet -80 °C bakteri kültürü stoğu yapılmış ve -80 °C dolabında yukarıdan 2. kat soldan 1. sepetin içinde "Murat Kaya Interferon Beta -5" kutusuna yerleştirilmiştir (Şekil 2.3). Aynı zamanda 14. koloniden elde edilen plazmid DNA'sının içeriğinde interferon betanın olduğu ve GFP ile devam ettiği dizi analizi ile de teyit edilmiştir (Ek-1).



Şekil 2.4. pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörünü içeren 14. *E. coli* bakteri kolonisinin -80 °C stok muhafazası.

GMP uyumlu bir rekombinant protein üretimi gerçekleştirebilmek adına takısız olarak üretilip kromatografik yöntemlerle saflaştırılabilmesi için Tt-hIFN $\beta$  geninin 5' bölgesine PLA36 (sinyal dizisi) eklenmiştir (Şekil 2.5-A). Takı içermeyen 166 amino asitlik Tt-hIFN $\beta$  kodlayan kodon optimize gen pTtAC2 *Tetrahymena* yapay kromozom vektörüne PmeI-AscI yapışkan uçları ile atılarak tez çalışmasında GMP' ye uygun HSP70.2 (ısı-şoku) (Yu vd., 2012) promotörü kullanılarak ısı ile indüklenebilecek tasarım oluşturulmuştur (Şekil 2.5-B).



Şekil 2.5. pTtAC2 yapay kromozom vektörü ve takısız klonlanacak kaset bilgisi. A) Takısız klonlanacak kaset dizi bilgisi. pTtAC2 vektörüne PmeI-AscI restriksiyon enzimleri kesim bölgesinden klonlanacak olan turuncu renk ile gösterilen, kendi sinyal dizisi çıkartılmış (Tt-hIFN $\beta$ = 166 amino asitlik insan interferon beta proteinini kodlayan 498 bç gen dizisi) ve N-terminal bölgesine yeşil renk ile gösterilen TtPLA (PLA36= 36 amino asitlik dışarı salgılatma sinyalini kodlayan 108 bç DNA dizisi) takılmış kasetin DNA bilgisi. B) TtPLA-Tt-hIFN $\beta$  (takısız) DNA dizisi ve pTtAC2 yapay kromozom vektörüne klonlanmış hali. GMP uyumlu Ekspresyon kaseti, ısı ile indüklenebilen HSP70.2 promotörü, PLA36 dışarı salgılatma sinyal dizisi ve rekombinant üretilen Tt-hIFN $\beta$  proteinini kodlayan gen dizisi ve transkripsiyon sonlandırma dizisi olan BTU2'den oluşmaktadır. pTtAC2 vektörü içerisinde antibiyotik seçimini sağlayacak olan MTT1 promotörü kontrolündeki Neomisin direnç geni ve BTU2 yer almaktadır.

#### **2.4. Oluşturulan *T. thermophila* Vektörlerinin Konjugatif Hücelere Biyolistik Silah ve Elektroporasyon Yöntemi ile Transformasyonu**

Biyolistik silah, vektör DNA'larıyla kaplanan altın taneciklerinin belirli basınç altında, hücre içerisine gönderilmesi, hücreden geçerken de vektör DNA'larının hücre kısımlarından özellikle çekirdeğe transferidir.

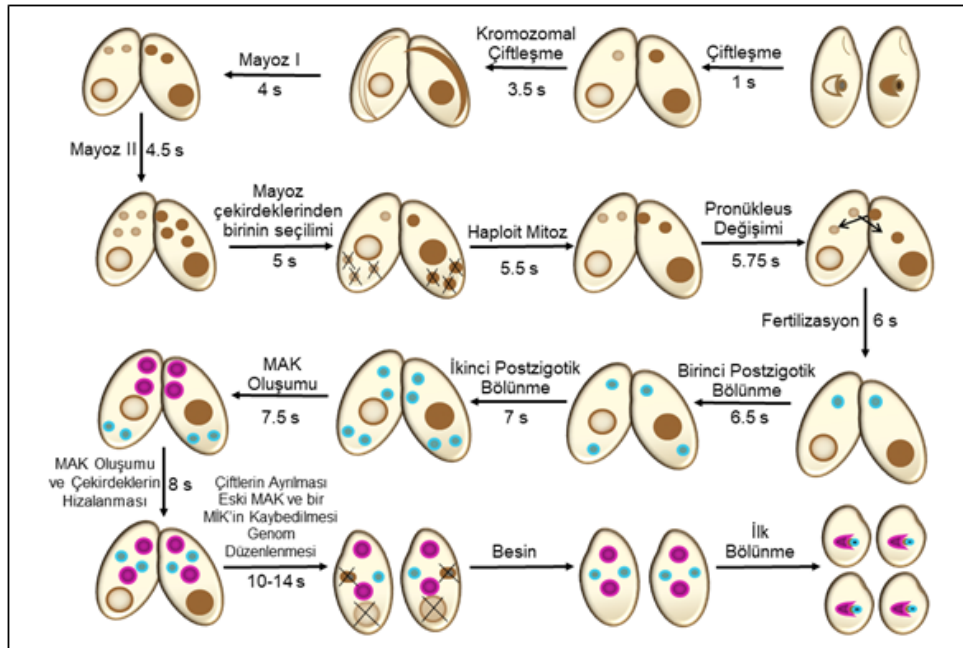
Elektroporasyon ise, kısa süreli yüksek voltaj (elektriksel alan) verilerek hücre zarında DNA'nın geçebileceği boyutlarda (nm) geçici porlar meydana getirilmesi ile hücre tarafından yabancı DNA'nın hücre içine alınmasını sağlayan bir gen aktarım yöntemidir.

Biyolistik silah ile konjugatif transformasyon için, *T. thermophila* CU428-VII ve B2086-II ırkları büyütülmüş, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile açılığa alınmış ve açılığın 48. saatinde eşit hücre sayısına ve eşit hacimde karıştırılarak konjugasyona alınmıştır. Konjugasyonun 9. saatinde ateşleme ile vektör DNA bağlı altın partikülleri hücelere transforme edilmiştir.

Ateşleme adımları 1 µL' de 1 µg DNA olacak şekilde konsantrasyon ayarlanır, hazırlanan altın partiküllerinden 10 µl alınarak (Biorad 165-2262-0.6 µm çaplı altın partikülü; 40 µg/mL) 3 µg DNA, 10 µL 2.5 M CaCl<sub>2</sub> ve 4 µL spermidin eklenerek DNA ve altın partiküllerinin birbirlerine bağlanması sağlanmıştır. Vektör DNA'sı bağlı altın partikülleri 100 µL %70'lik ve %100'lük etanol serisi ile yıkandıktan sonra %100'lük 10 µL etanolde makrotaşıyıcı haznesindeki yerine yerleştirilmiştir. 2x10<sup>5</sup> hücre/mL yoğunluğunda ve açlık tamponundaki 50 (veya 100 mL)'lik konjugatif hücreler konik dipli bir tüpte 1000 g'de 2 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve böylelikle her bir ateşleme için 10 milyon hücre elde edilmiştir (Cassidy-Hanley vd., 1997). Süpernatant uzaklaştırılıp, bir ateşleme için 10 milyon hücre 500 µL 10 mM Tris-HCl (pH7.5) içerisinde çözülmüştür. 1 cam petri tabağına (100 mm) yerleştirilmiş dairesel steril "whatmann 50" filtre kağıdı daha önceden steril edilmiştir. Filtre kağıdı, 1 mL'lik açlık tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) ile nemlendirilmiş ve üzerine, 500 µL açlık tamponunda çözülen hücreler filtre kağıdına yayılmıştır. Hücreler ve DNA örnekleri hazır olduğunda biyolistik silahla (BIO-RAD, Helios® gene gun and PDS-1000/He Sistemi, Fransa) ateşleme adımları gerçekleştirilmiştir. Hücreleri kurumaktan korumak için üzerlerine 10 mL 30 °C' de SPP (veya NEFF besiyeri) eklenmiş ve 30 °C' de inkübasyona bırakılmıştır.

Konjugatif hücreler için konjugasyonun tamamlanma süresi olarak ~20 saat beklenmiş, ardından 100 µg/mL konsantrasyonunda paromomisin sülfat eklenmiş ve seleksiyona başlanmıştır. Yukarıda anlatıldığı şekilde antibiyotik miktarı arttırılarak seçim yapılmıştır. Transformant hücreler sıvı nitrojen stoğu ile saklanmıştır.

Elektroporasyon yönteminde konjugant elektrotransformasyonun en önemli aşaması, hücrelerin elektrotransformasyon esnasında doğru safhada yakalanmasıdır. Aynı açlık ortamında bulunan farklı tipteki hücreler ortalama bir saat içinde çiftleşmeye başlar. Konjugasyonun 4. saatine gelindiğinde mayoz I tamamlanmış olur. Mayoz II'nin tamamlanmasıyla 4 haploit çekirdek oluşur, bir çekirdek hücre anterioruna ilerleyerek mayoz çekirdeğini oluştururken, diğer üçü posteriorda kalır ve parçalanır. Bu evre crossing-over'in gerçekleştiği evredir. mikroçekirdeğin mitoz geçirmesi ile identik iki mikroçekirdek oluşur, oluşan iki çekirdekten posteriordaki göç eder, diğeri gamet pronükleusu olarak kalır. Konjugasyonun 6. saatinde göç edecek olan çekirdeklerin karşılıklı olarak değiştirilmesi ve yeni çekirdeğin eskisiyle birleşmesi ile zigotun oluşturulması sonucu fertilizasyon adımı tamamlanmış olur.



Şekil 2.6. *T. thermophila* konjugasyonu sırasındaki olaylar. *T. thermophila* konjugasyonu sırasındaki olaylar. Konjugasyonun 10-14. saatler arasına denk gelen süreçte gerçekleştirilecek vektör transformasyonu sonucunda hücredeki MAC farklılaşması fazının bir sonucu olarak rDNA vektörlerinde kopya sayısında artış meydana gelir (Asai ve Forney 1999; Miao vd. 2009).

Zigot çekirdeğin iki mitoz geçirmesiyle 4 identik diploit çekirdek oluşur. Anterior çekirdekler makroçekirdek farklılaşırken posteriordakiler diploit mikroçekirdek olarak

kalır. Bu basamakta DNA düzenlenmeleri ve MAC'a bağlı eşey tipi belirlenmesi gerçekleşir ve bu süreç konjugasyonun 7,5 saatinden başlayarak 6-7 saat devam eder. Mikroskopta yeni mikroçekirdeğin (anlagen) %50'den fazla çiftte görülmesinden (7,5 -8 saat) 1,5 saat sonra transformasyon için en uygun zamanlamadır. Konjugasyonun 14. saatinde ekzokonjugantlar ayrılır, eski makroçekirdek ve mikroçekirdeklerden biri parçalanır. Ekzokonjugantların ilk hücre bölünmesi ile 4 karyonid hücre oluşturur. Bağımsız olarak farklılaşmış yeni makroçekirdek ve fonksiyonel mikroçekirdeğin mitotik kopyasını taşıyan her bir karyonid, ikiye bölünerek vejetatif olarak çoğalır.

**Transformasyon Protokolü:** *T. thermophila* CU428-VII ve B2086-II ırkları büyütülmüş, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile açlığa alınmış ve açlığın 48. saatinde eşit hücre sayısı ve eşit hacimde karıştırılarak konjugasyona alınmıştır. Konjugatif hücrelerin hangi aşamada oldukları Hoechst boyaması ile takip edilmelidir.

*500 µl hücre üzerine 10 µl Hoechst eklenir ve hücreler yaklaşık 0.5 µl fiksatif ile fiske edilir ve yaklaşık 10 dk. sonra floresan mikroskopta DAPI filtresinde inceleme yapılır (Li vd., 2005).*

Mikroskobik incelemelerde transformasyon için en uygun zamanda, yeni mikroçekirdeğin (anlagen) %50'den fazla çiftte görülmesinden (7,5 -8 saat) 1,5 saat sonra (Asai ve Forney 1999; Miao vd., 2009) hücreler peletlenerek eşit hacimde 10 mM HEPES (0,2 µm'lik filtre ile steril edilmiştir) ile yıkanır ve tekrar santrifüj edilerek 1 mL HEPES ile çözülerek hücre sayısı  $3.10^7/ml$ 'ye çıkarılır (Asai ve Forney 1999; Gorovsky vd., 2009). Yaklaşık 15 µg Plazmit DNA'nın hacmi HEPES ile 50 µl'ye tamamlanır. Plazmit DNA'nın hacmine uygun hacimde hücre DNA üzerine eklenerek karıştırılır ve elektroporasyon küvetine aktarılır. *Hücre + DNA hacmi toplamda 250 µl olmalıdır (Asai ve Forney 1999, Gorovsky vd., 2009).* Hücre ve DNA karışımı bir arada fazla bekletilmeden, hızlıca elektroporasyon küvetine aktarılarak elektroporasyon Bio-Rad Elektroporasyon cihazında 440 V, 25 µF, 200 Ω, 4 mm küvet şartları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

DNA ve hücre karışımının uzun süre beklemesi, plazmitlerin hücrelerin salgıladığı DNaz'lar aracılığı ile parçalanmasına ve transformasyon verimliliğinin düşmesine sebebiyet verir (Asai ve Forney 1999). Elektroporasyondan ~1 dk. sonra hücrelerin üzerine 1 mL pen-strep içeren SSP medyum eklenir daha sonra da besiyerindeki hücreler 30 mL SSP'ye aktarılır ve 18-24 saat sonra seçici antibiyotik

baskısı kurulur (nem çemberinde, 30°C sıcaklıkta). Seçici antibiyotik baskısı 100 µg/mL ile başlanır. Kadmiyumla indüklenebilir promotordan antibiyotik direnci sağlanacağı için, besiyerine 1 µg/mL CdCl<sub>2</sub> eklenir. 2-3 gün sonra 200 µg/mL'ye çıkarılır. Antibiyotik baskısı her pasajlamada (~2 günde bir) arttırılarak 1 mg/mL'ye ulaşıldığında, hücreler 2 hafta yaşamaya devam ediyorlar ise pozitif transformant oldukları söylenebilir (Gorovsky vd., 2009).

Biyolistik silah ile yapılan transformasyonda Tt-sfGFP takılı Tt-hIFN $\beta$  hatlar için antibiyotik oranı 600 µg/mL çıkartılarak pozitif transformantlar elde edilmiş rekombinant ırkların kontrolü; CdCl<sub>2</sub> ile indüklendikten sonra floresan mikroskobu (Olympus IX53 mikroskop, Olympus U-HGLGPS Floresan ataçmanı) GFP filtresinde incelenerek GFP ışınması gösterdiği teyit edilmiştir. Ortamda ışık veren ve ışık vermeyen hücreler bulunduğundan ışık veren hücreler seçilerek tek hücre klonları elde edilmiş ve bu tek hücre klonlarından sıvı azot stoğu yapılmıştır.

## **2.5. Konjugatif *Tetrahymena* Hücrelerine Biyolistik Silah Yöntemi ile Transformasyonu Gerçekleştirilen pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP Vektöründen Rekombinant Protein Üretimi ve Saflaştırma Analizleri**

**Protein İzolasyonu:** Mikroskopi incelemelerinde, Tt-hIFN $\beta$  içeren transformant hatlar indüklendikten sonra GFP ışınması gösterdiği görülen 2 farklı tek hücre klonundan protein izolasyonu ve Ni-NTA saflaştırması yapmak için 100'er mL ekim yapılmış, negatif kontrol olarak 100 mL *Tetrahymena* B2086+Cu428 konjugatif ırkından ekim yapılmıştır. Yaklaşık 3 gün çalkalamasız bir şekilde 30 °C'de büyütülen hücrelerden indüklemeye başlamadan önce ve 2 µg/mL CdCl<sub>2</sub> ile indüklendikten 3 saat, 6 saat ve 9 saat sonra örnekler alınmıştır. Kültürler 1500 g'de 3 dk. santrifüjlenerek pelletler elde edilmiştir.

**Toplam protein ön-kontrolleri:** Hızlı bir şekilde kontrol yapabilmek adına tüm örneklerden aynı zamanda sadece 1'er mL'den elde edilen pelletler de alınmış ve bunlardan GFP ışınmasını direk inceleyebilmek için hücre lizatı  $\beta$ -merkaptoetanol içermeyen Laemmli yükleme taponunda kaynatma yapılmadan parçalanmış ve elde edilen karışım direk olarak SDS-PAGE jelinde koşturulmuştur (Şekil 3.1-C). Koşturulan SDS-PAGE jeli BIO-RAD Gel Doc™ EZ görüntüleme sisteminde, Mavi tabla (Blue Sample Tray) ile görüntülenmiştir. Bu tablanın özelliği SYBR® Green, SYBR® Safe, SYBR® Gold ve Gel Green görüntülemeler için uygun olmasıdır. GFP proteininin

eksitasyon/emisyon aralığı ise bu tablanın vermiş olduğu eksitasyon emisyon aralığına (430-460, max 440 nm) yakın olmasıdır. Bu özelliğinden yararlanılarak, yapılan analizde SDS-PAGE jelinde doğal GFP ışımalarının olup olmadığı gözlemlenmiştir.

Peletler TPIST-2 (*Tetrahymena* Protein İzolasyonu ve Saflaştırma Tamponu -2) ile liziz edildi (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 10 mM İmidazol, %1 Triton X-100, 2 mM PMSF, 1XPIC pH 7.8) ve 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine bölündükten sonra buzda 15 dk. ara ara vortekslenerek inkübe edildi, sonra 7 devirde 5 dk. süreyle Bullet Blender'da 0,2 mM'lik çelik bilyelerle parçalama işlemi yapıldı. Tekrar buzda 10 dk. inkübe edildikten sonra 4 derece soğutmalı santrifüjde 13000 rpm de 20 dk. santrifüjlendi. Süpernatant toplam protein izolasyonu olarak ayrı tüplere alındı, pelet ise TPIST-2 ile yeniden çözülerek ayrı saklandı.

SDS-PAGE (Tris-Glisin) analizlerini yapabilmek için 150'şer µL örnekler 50'şer µL 4X Laemmli yükleme tamponu [(BioRad 4X Laemmli = 277,8 mM Tris-HCl pH 6.8 %44,4 gliserol %0,02 Brom Fenol Blue, %4,4 SDS) %10 β-merkaptotanol] ile karıştırıldı ve 6-7 dk. kaynatılarak denatüre edildi.

**Ni-NTA saflaştırması:** QIAGEN Ni-NTA Agaroz Tanecikleri (#30230, Almanya) kullanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir. Ni-NTA boncukları alkolün uzaklaştırılması için 600 g'de 1 dk. santrifüjlenmiştir. Üzerlerindeki sıvı atılmış ve su ile birkaç kez yıkanmıştır.

- Kültürlerden izole edilen ~1.2'şer mL toplam protein, 300'er µL Ni-NTA tanecikleriyle g/b +4 °C' de hafif çalkalamalı tablada inkübe edildi. Ertesi gün çalışmalar +4 derece dolap içerisinde yapılmaya devam edildi.

- Havada asılı duracak şekilde düzenek hazırlandı ve filtreli kolonlara Ni-NTA ile bağlanan örnekler konuldu, kolonların altlarına tıplar takıldı ve 2-3 dk. beklenildi, sonra tıplar açıldı ve kolonda tutulmayan kısım Flow Through (Bağlanmayan Proteinler) buza gömülü şekilde duran ayrı tüplere alındı.

**1. yıkama:** 1.5 mL Yıkama Tamponu (= 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 20 mM İmidazol) ile yapıldı. Benzer şekilde tıplar kapatıldı 2-3 dk. beklenildi, sonra tıplar açılarak buz içerisine gömülü olan 15 mL'lik santirfüj tüplerine kolondan yıkamalar alındı.

**2. Yıkama:** 1.5 mL Yıkama Tamponu (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 20 mM İmidazol) ile benzer şekilde yapıldı.

**1. Elüsyon:** Tıplar kapalıyken elüsyon tamponundan (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 250 mM İmidazol) 200 µL eklendi ~15 dk. beklenildi, sonra elüe edildi.

**2. Elüsyon:** 200 µL eklendi ~15 dk. beklenildi, sonra elüe edildi.

Tüm bu Flow Through, Yıkamalar ve Elüsyonlardan SDS-PAGE için örnekler hazırlandı ve kalanlar -80 °C'e kaldırıldı. Toplam proteinlerin miktarları BRADFORD yöntemiyle hesaplandı ve jele toplam proteinlerin SDS-PAGE jeline tüm örneklerden eşit miktarda yüklenmesine özen gösterildi.

Glisin SDS-PAGE jeli elektoroforez işleminin ardından towbin tampon (western transfer tampon) (25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20' lik Metanol) içerisinde 30 dk. bekletilmiştir. Blotting kağıtları (extra thick, P4681 SIGMA) ve membran (Immobilon-PSQ Membrane, PVDF, 0,2 µm Cat No: ISEQ00010) jelin son boyutuna uygun olarak kesilip, yarı ıslak olacak şekilde sandviç (2 whatman, membran, jel, 2 whatman) hazırlandı. BioRad Turbo Blotter cihazında 25V, 2 A (Sabit), 25 dk. şeklinde blotlama gerçekleştirilmiştir. 1x TBS (1 L için 6,05 g Tris ve 8,76 g NaCl pH 7,5)' de yıkanmıştır. TBS-T içerisinde hazırlanmış %5'lik süt tozu ile hazırlanan bloklama solüsyonundan ~15 mL içerisinde 1 veya 2 saat oda sıcaklığında bloklama yapılmıştır. Ardından %0,1' lik Tween içeren 1x TBS (1x TBS-T) ile 5 kere 5 dk. orbital çalkalayıcıda membran yıkanmıştır. Yıkamalar sonunda membran 10 mL %0,1'lik 1X TBS-T içerisine alınmış, 10 mL solüsyona birincil antikor eklenerek gece boyu 4 °C' de orbital çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ertesi gün %0,1'lik 1X TBS-T ile 5 kere 5 dk. orbital çalkalayıcı membran yıkanmış ve 10 mL %0,1'lik 1X TBS-T içerisinde (1:5000) 2 µL anti-rabibit veya anti-mouse ikincil antikor eklenmiş (Santa Cruz Mouse anti-rabbit IgG-HRP sc: 2357) ve 1 saat oda sıcaklığında orbital çalkalayıcı'da bekletilmiştir. Bu işlemin ardından membran her biri 5 dk. olacak şekilde 3 kere 1x TBS-T, 2 kere 1x TBS ile yıkanmıştır. TMB ile görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir (Sigma Aldrich, T0565).

SDS-PAGE'de yürütülen örnekler hem GFP poliklonal (#AB10145 Merck, Almanya) (sonuçlar verilmemiştir) hem de İnterferon beta monoklonal (#SC53968 Santa Cruz, ABD) antikoruna ile westren blot analizi yapılmıştır.

## **2.6. Konjugatif *Tetrahymena* Hücrelerine Elektroporasyon Yöntemi ile Transformasyonu Gerçekleştirilen pTtAC2-PLA36-Tt-hIFN $\beta$ Vektöründen Elde Edilen Irkların Genomik DNA kontrolleri**

Elektroporasyon ile transformasyon işlemi yapıldıktan ~5 saat sonra hücreler antibiyotik baskısına (antibiyotik olarak, bir neomisin türevi olan paromomisin kullanılmıştır) alınırken aynı zamanda 96 kuyucukla plakalara da her bir kuyucuğa seyreltilerek ekim yapılarak tek hücre klonu seçilimi sağlanmıştır. Hücreler 30 °C nem çemberinde inkübasyondan 3 gün sonra paromomisin 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ye çıkartılmıştır. Antibiyotik baskısının 6. gününde plakada canlı hücrelerin görüldüğü ve sağlıklı ve temiz olanlardan 5 kuyucuk seçilmiş ve antibiyotik baskısına bu hücreler üzerinden devam edilmiştir. Paromomisin oranı 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  çıkarıldıktan sonra ikişer günlük inkübasyonları takiben antibiyotik oranı 1000, 2000, 5000, 7000 ve 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  çıkartılmışı ve paromomisin miktarı 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'ye çekilerek hücreler pasajlanmaya devam edilmiştir. Burada organizmada (bir hücrede) 45 kopya ile temsil edilen her bir MAC kromozomunun pozitif (genom entegrasyon kasetini içine alması) olması amaçlanmıştır. Yaklaşık bir ay süre ile antibiyotik baskısında tutulan hücrelerden gDNA izolasyonu; Wizard® Genomic DNA purification kit (A1120 Promega, ABD) ile bitki dokularından genomik DNA izolasyonu protokolüne göre, birinci adım atlanarak gerçekleştirilmiştir.

## **2.7. Tt-Pttac2-PLA36-Tt-Hıfn $\beta$ Rekombinant Hücrelerinin Isı-Şoku ile İndüklenmesi, SDS-PAGE ve Western Blot Analizleri**

Genomda varlıkları gösterilen 5 pozitif transformanttan 2. ve 5. klon hücreleri büyütüldükten sonra 38 °C su banyosunda yaklaşık 6 saat inkübe edilerek indüklendi sonra 30 °C etüve alınarak 6 saat daha inkübasyon gerçekleştirildi (recovery). Süre sonunda hücreler peletlendi ve protein izolasyonu yapıldı. Protein izolasyonu sonucunda çözümlü toplam protein ve çözümlü olmayan toplam protein (peletler) elde edildi. PLA36 dışarı salgılatma dizisi ile dışarı salgılatılması beklenen proteinlerin incelenmesi için dış ortamlardan 5'er mL'si filtrelendi (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit 10.000 KO, Millipore). Tüm örnekler %10'luk SDS-PAGE jelinde koşturulduktan sonra western blot analizi mouse monoklonal anti-interferon beta antikoru ile gerçekleştirildi (Şekil 3.3).

### 3. BULGULAR

Tez çalışmasının amacı; tek hücreli silli ökaryot *Tetrahymena thermophila*'nın biyolojik kapasitesi kullanılarak, insan interferon- $\beta$  geninin kodladığı proteininin üretimidir. Tez çalışması kapsamında, öncelikle insan interferon- $\beta$  proteinini kodlayan okuma çerçevesi *Tetrahymena* alanında yaygın kullanılan ağır metal kadmiyum ( $CdCl_2$ ) ile indüklenen MTT1 (Metalotiyonin 1 geni) promotörü kontrolü altında Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteini üretim deneyleri gerçekleştirilmiştir. Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin rekombinant hücre içi üretimi flaskta kültürizasyon ile yapılmıştır. Ayrıca GMP'ye uyum çerçevesinde, MTT1 promotörü yerine sıcaklık ile indüklenen HSP70.2 promotörü yerleştirilmiş ve takısız Tt-hIFN $\beta$ 'nin hücre dışına salgılanan formunun rekombinant üretim altyapısı tek hücre klonları oluşturularak gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında 45 kopyalı makroçekirdek genomuna entegrasyonda kullanılan orijinsiz pNeo4 vektörü (Mochizuki vd., 2008), 9.000 kopyalı ekstrakromozomal pVGF vektörü ve son olarak *T. thermophila* için grubumuz tarafından tasarlanmış 2.000-5.000 kopyalı ekstrakromozomal pTtAC2 yapay kromozom vektörü kullanılmıştır. Ayrıca saflaştırmayı kolaylaştırmak ve üretim kapasitesini sürekli kılmak amacıyla; *Tetrahymena* Fosfolipaz A geninin (PLA, Phospholipase A gene) dışarıya salgılatma sinyal takısının literatürde kullanılan ve patentlenmiş ilk 115 amino asit dizisi (PLA115) ile PLA105 takıları yerine, PLA36 ve/veya PLA22 dizileri dışarı salgılatmada kullanılmıştır. Hedef hormonların takısız formlarının üretiminde; GMP kuralları gereği transformasyona takiben antibiyotik seleksiyonu gerçekleştirildikten sonra kültürizasyon esnasında antibiyotik kullanımı gerçekleştirilmemesi gerekmektedir. Bu nedenle rekombinant protein üretim platformunun vektörel altyapısı, grubumuz tarafımızdan geliştirilen ve patent başvurusu yapılmış olan ve iki yıla kadar kararlılığı gösterilmiş 2.000-5.000 kopyalı *Tetrahymena* makroçekirdek yapay kromozomu 2 (pTtAC2)'ye kaydırılmıştır. Hücre içinde üretilen Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteini, 12xHis afinitik takı yardımıyla saflaştırılmış, SDS-PAGE ve Western Blot ile analizleri yapılarak, *T. thermophila*'nın hIFN $\beta$ 'yi ürettiği gösterilmiştir. Takısız hIFN $\beta$  proteinin üretilmesi ve yüksek saflıkta elde edilmesi için gen kaset tasarımları, klonlamalar, transformasyon ve antibiyotik seleksiyonu ile tek hücre klonlarının oluşturulma deneyleri tamamlandıktan sonra, önce genomik DNA varlıkları gösterilmiştir. Daha sonra indükleme de gerçekleştirilerek rekombinant protein üretiminin olduğu western blot

analizi ile gösterilmiştir. Elde edilen bulgularda rekombinant proteinler, çözümler toplam protein ve çözümler olmayan toplam protein içerisinde görülmüştür. Dış ortam örneklerinde net bir protein varlığı görülmemiştir. Bu çalışmalar halen devam etmektedir.

### **3.1. *T. thermophila*'da hIFN $\beta$ 'nın Füzyon Protein olarak Rekombinant Üretimi, Saflaştırılması ve Protein Analizleri**

*T. thermophila*'ya kodon optimizasyonu yapılmış insan interferon- $\beta$  kodlayan DNA dizisi, bu proteinin E.R. sinyalinini kodlayan dizisi olmaksızın (kısaca Tt-hIFN $\beta$ ) sentetik olarak ürettirilmiş ve uygun PZR primerleri ile çoğaltılmıştır. Tt-hIFN $\beta$  ile örtüşen bölge içeren primerler kullanılarak TtsfGFP'de PZR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılmış Tt-hIFN $\beta$  ile TtsfGFP gen dizileri agaroz jelden saflaştırılmış ve örtüşen PZR yöntemi ile PZR'da birleştirilmiştir. Birleştirilmiş Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon geni, agaroz jelden saflaştırılarak, pVGF vektörü içerisine, CdCl<sub>2</sub> ile indüklenebilen MTT1 promotörü kontrolünde olacak şekilde ligasyonla klonlanmıştır. Oluşturulan pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörü, *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) kompetent hücrelerine ısı-şoku yöntemiyle transforme edilmiştir. Pozitif kolonilerden 14. koloni restriksiyon enzimi ile kesime alınarak, klonlama doğrulanmıştır (Şekil 3.1-B). Şekil 3.1-A'da ise bu vektörün yapısı görülmektedir. DNA dizi analizi yöntemi ile bu koloniden elde edilen vektör içindeki klon, dizi analizi ile kontrol edilmiş, interferon beta proteinini kodlayan DNA dizisinin herhangi bir mutasyon içermediği teyit edilmiştir (EK-1). hIFN $\beta$ 'yı kodlayan DNA dizisi sonrasında TtsfGFP'yi kodlayan dizinin geldiği görülmüştür .

Ekstrakromozomal pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörünün konjugatif *Tetrahymena thermophila* B2086 ve CU428 ırklarına aktarımı biyolistik silah ile gerçekleştirilmiştir (Cassidy-Hanley vd., 1997). Transformasyon sonrası pozitif transformantların seçilimi 100  $\mu$ g/mL ile başlayıp 600  $\mu$ g/mL'ye kadar çıkarılan antibiyotik baskısıyla gerçekleştirilmiştir. Pozitif transformantların seçilimi, MTT1 promotörü kontrolündeki Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon geninin 2  $\mu$ g/mL CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesinden sonra floresan mikroskopu altında ışık hücresinin gözlemlenmesiyle mümkün olmuştur. Ortamda ışık hücresinin ve ışık hücresinin birlikte bulunduğu GFP ışık hücresinin gösteren hücreler, mikroskop altında tek hücre izolasyonu ile belirlenmiş ve tüp stoğu yapılmıştır. Bu tek hücre klonlarından C2 ve C6 klonları seçilerek saf tek hücre klonu olarak, üretim analizinde kullanılmıştır.

Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon proteinini, C2 ve C6 klonlarının hücre içi olarak üretip

üretmediğini kontrol edebilmek için indüklenmiş kültürlerin 1'er mL'sinden hücre peletleri santrifüj ile toplanmıştır.

- C2 600.000 hücre/mL'den 1mL Pelet, 180 µL 10 mM Tris-HCl + 60 µL 4X Laemlli
- C6 500.000 hücre/mL'den 1mL Pelet, 150 µL 10 mM Tris-HCl + 50 µL 4X Laemlli

SDS-PAGE'de GFP ışınmasını direk görebilmek için  $\beta$ -merkaptoetanol içermeyen Laemlli yükleme tamponu hücre peletlerine eklenerek, kaynatma yapmaksızın parçalama gerçekleştirilmiş ve elde edilen toplam hücre karışımı direk olarak SDS-PAGE jeline yüklenmiş (~20'şer µL) ve koşturulmuştur. Koşturulan SDS-PAGE jeli BIO-RAD Gel Doc™ EZ görüntüleme sisteminin Mavi tablası (Blue Sample Tray) ile görüntülenmiştir. pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörü içeren C2 ve C6 hücre klonlarından indüklemeye önce ve indükledikten sonra elde edilen peletlerinin GFP ışınmasına sahip olup olmadığını kontrol etmek için yapılan analizde, hem C2 hem de C6 ırklarında GFP ışınması görülmüştür (Şekil 3.1-C). Şekil 3.1-C'nin 1. kuyusunda C2 ırkının indüklenmemiş kontrolünde GFP ışınması beklenildiği gibi görülmemektedir. Aynı şartlarda indüklemesi gerçekleştirilen içerisinde pVGF vektörü (interferon beta ve GFP bulundurmayan) olmayan negatif kontrol hücrelerinde ise beklenildiği gibi bir ışınma bulunmamaktadır (Şekil 3.1-C, 5. kuyu). İndüklemenin 3., 6. ve 9. saatlerinde ise GFP ışınmasının her iki rekombinant klonda da zamanla arttığı görülmektedir (Şekil 3.1-C, kuyu 2, 3 ve 6). Rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin tahmini büyüklüğü ~48 kDa'dur. Tek başına Tt-hIFN $\beta$  ~20 kDa civarında olup GFP ise tek başına yaklaşık ~27 kDa civarındadır. Doğal şartlarda,  $\beta$ -merkaptoetanolüzsüz ve kaynatmasız olarak yüklenen proteinlerin SDS-PAGE jelinde hareketleri  $\beta$ -merkaptoetanol ve kaynatma uygulanarak yürütülen protein örneklerinden yaklaşık 8 kDa civarında farkla koşmaktadır. Bu yüzden tam bir büyüklük analizi yapmak kullanılan markör'e göre mümkün görünmediği için sadece ışınmanın olduğu ve bu ışınmanın kuvvetinin indükleme saatine bağlı olarak arttığı protein bantlarına odaklanılmıştır. GFP ışınması görülen protein bantlarının en güçlüsü kullanılan markör'e göre 40 kDa olup sırasıyla daha zayıf ışınma veren 45 kDa, 50 kDa ve 65 kDa büyüklüklerinde protein bantları da bulunmaktadır. Rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin tahmini büyüklüğü olan ~48 kDa'da bu büyüklükler arasındadır. Işınma veren 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa ve 65 kDa protein bantları, boyut olarak ~27 kDa TtsfGFP monomerinkinden (protein markör'ünün

içine eklenmiştir) daha büyüktür (Şekil 3.1-C, kuyu 7). Bu klonların çözünür toplam proteinleri ile çözünür olmayan toplam proteinleri ve anti-hIFN $\beta$  antikorları kullanılarak yapılan western blot analizinde ise 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa ve 65 kDa protein bantlarından sadece 50 kDa'un hemen altında yer alan (beklenen füzyon büyüklüğü olan 48 kDa) sadece bir protein bant dimeri (Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis) net olarak görülmüştür. *T. thermophila*'nın sitoplazmik Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteinini başarı ile ürettiği buradan anlaşılmaktadır (Şekil 3.1-C).

Rekombinant *T. thermophila* C2 ve C6 klonlarından sitoplazmik Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteini üretimi için Negatif Kontrol Hücreleri ile bu klonlar ~ 500.000/600.000 hücre/mL olacak şekilde büyütülmüş ve 2  $\mu$ g/mL CdCl<sub>2</sub> ile indüklendikten sonra 3., 6. ve 9. saatlerde hücre örnekleri alınmıştır. Bu örneklerin sitoplazmik Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteini üretimi floresan mikroskop (Şekil 3.1-D) ve Western Blot (Şekil 6-E-F) analizleriyle incelenmiştir.

İndüklenen hücrelerin floresan mikroskop analizleri GFP filtresi altında incelendiğinde, Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininden kaynaklanan floresan ışımaların zamanla hücre sayısı ve floresan ışımaya yoğunluğunun C2 ve C6 klonlarından her ikisinde de arttığı görülmüştür (Şekil 3.1-D). Mikroskopik görüntülerin floresan ışımaya açısından incelemesi, C2 klonunun C6 klonuna göre daha fazla ışığı ve ışık hücre sayısına sahip olduğu göstermiştir. Rekombinant *T. thermophila* C2 ve C6 klonlarından PLA'sız (sitoplazmik) Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteini üretimi için indüklendikten sonra 3., 6. ve 9. saatlerde alınan hücre örneklerinden Western blot analizi için çözünür toplam protein izolasyonu, aşağıda verilen adımlarla *Tetrahymena* liziz ve saflaştırma tamponu ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1-D; kuyu 1, 2, 3, 4 ve 5).

• **Protein izolasyonu:** 10'ar milyon hücre içeren peletlerin ~2 mL Liziz Tamponu (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM İmidazol, %1 Triton X-100, 2 mM PMSF, 1XPIC, pH 7.8) ile ~15 dk. buzda inkübasyon, 7 devir ile 5 dk. Bullet Blender ile muamele, 10 dk. buzda inkübasyon, 15 dk. 4 °C 13-14.000 g santrifüjleme.

Toplam protein izolasyonundan kalan peletler ise 10 mM Tris-HCl ile yeniden çözülmüştür (Şekil 3.1-D; kuyu 7, 8, 9, 10). Bu çözünür toplam protein izolatlarından Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin saflaştırılması, C-ucu 12xHis afinitik takısı yardımı ile Ni-NTA tanecikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çözünür toplam protein izolatları ile peletlerden elde edilen izolatlar (Şekil 3.1-E), afinitik olarak saflaştırılan Tt-

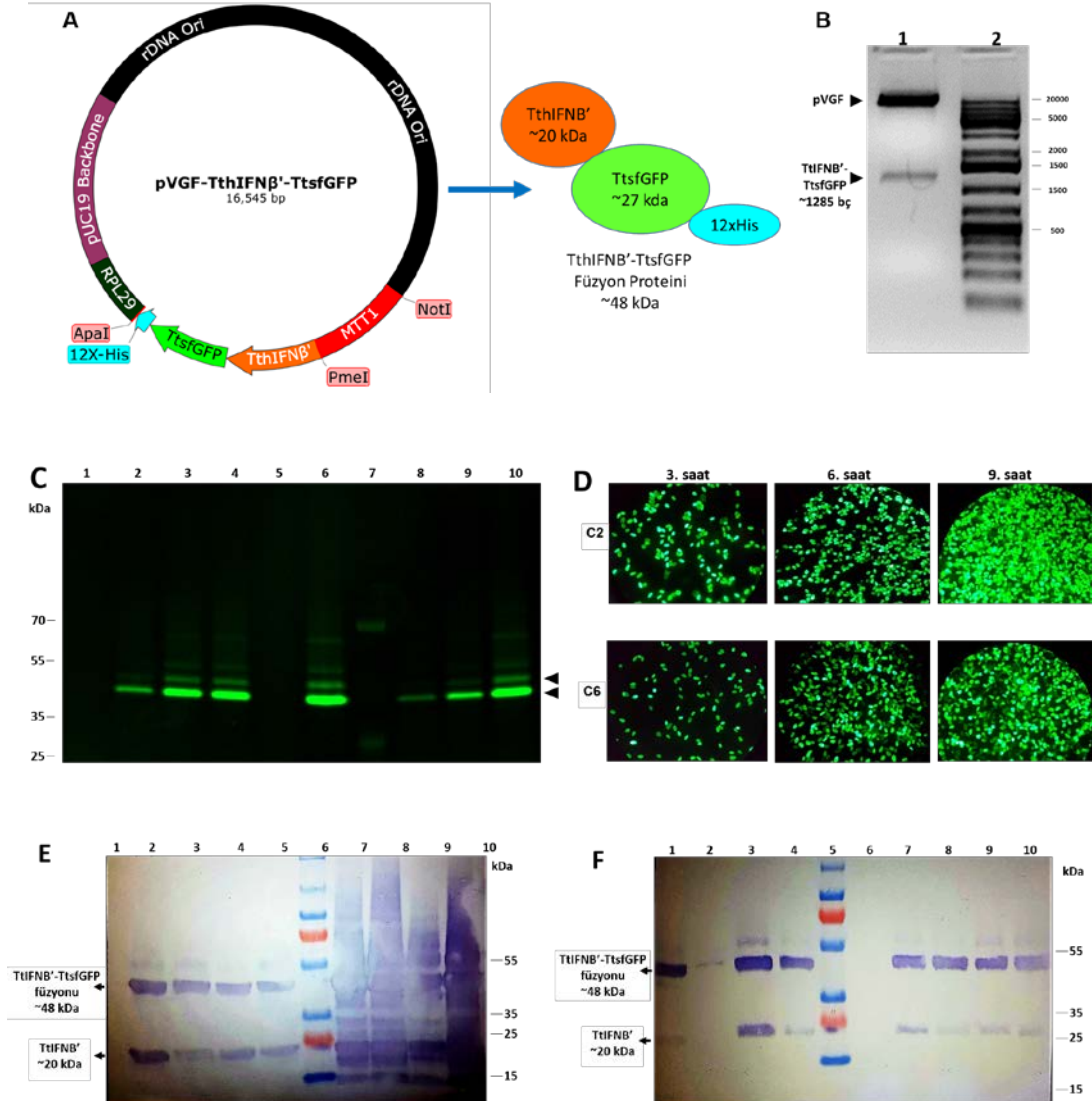
hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteinlerin içeren kolon elüentleri (Şekil 3.1-F) ile birlikte Western Blot analizine alınmıştır.

- **Ni-NTA Saflaştırması (Qiagen):**

- Her 1.2 ml örnek için 300'er  $\mu$ L Ni-NTA slury kullanılmıştır.
- **Yıkama Tamponu** (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.65 ): 1.5 mL x 2 kez
- **Elüsyon Tamponu-1** (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7.8): 200  $\mu$ L x 2 kez
- **Elüsyon Tamponu-2** (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazol, pH 7.8): 200  $\mu$ L x 2 kez

Anti-hIFN $\beta$  antikorları kullanılarak yapılan Western Blot analiz bulguları; hem çözünür toplam protein ve çözünmeyen protein pelet örneklerinde hem de afinitik saflaştırılmış elüentlerde, sitoplazmada beklenen 48 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin var olduğunu göstermiş ve yani üretimin gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 3.1-C ve D). Ayrıca beklenmedik bir şekilde, anti-hIFN $\beta$  antikorları 20-22 kDa'luk bir protein bandına, hem çözünür toplam protein, hem çözünür olmayan toplam protein hem de afinitik saflaştırılmış elüent örneklerinde bağlanmıştır. Anti-hIFN monoklonal antikorlarının bağlandığı 20-22 kDa'luk protein, Western antikor kontrolü olan ticari 18-20 kDa'luk hIFN $\beta$  proteini ile aynı büyüklüktedir (Şekil 3.1-E ve F, kuyu 6 ve 5). Büyüklük ve Western blot antikor spesifikliğinin kontrolü olarak, 18-20 kDa'luk ticari hIFN $\beta$  proteini, Şekil 3.1-E'nin kuyu 6'sında ve Şekil 6-F'nin ise kuyu 5'inde protein markör'ünün içine az miktarda eklenerek pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Anti-hIFN monoklonal antikor ise bu kontrol proteinini görerek, hIFN $\beta$ 'ye spesifik çalıştığını göstermiştir. Şekil 3.1-E'nin 1. kuyusunda ise C2 klonunun indüklenmemiş (negatif) hücre kontrolünden saflaştırılan çözünür toplam proteininde, anti-hIFN $\beta$  antikoruna herhangi bir proteine bağlanmamış, böylelikle sızıntılı bir rekombinant protein üretimi olmadığını ve diğer kuyulardaki füzyon protein üretiminin indüklemeye bağlı olduğunu işaret etmektedir. Şekil 3.1-E'nin 7., 8., 9. ve 10. kuyularında C2 ve C6 klonlarının çözünmeyen proteinlerini içeren peletler ile yapılan western blot analizleri, büyük miktarda sitoplazmik (PLA'sız) Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteini ile kırılmadan kaynaklanan Tt-hIFN $\beta$ 'nin olasılıkla yüksek miktarda üretiminden dolayı çözünmeyen formda veya yetersiz (her 10 milyon hücre peletine/ ~2 mL Liziz Tamponu) liziz tamponu kullanımından dolayı izolasyonda agregat olarak görüldüğü anlaşılmıştır. Şekil 3.1-F'nin 1. kuyusunda bulunan 48 kDa'luk sitoplazmik çözünür Tt-hIFN $\beta$ -

TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin Ni-NTA kolonuna bağlanmaksızın (Flow Through ile) kolondan uzaklaşmış olması, Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin yüksek oranda üretildiğini ve kullanılan Ni-NTA boncuk (300'er  $\mu$ L Ni-NTA slury) miktarının 1.3 ml'lik çözünür toplam protein içinde yer alan tüm füzyon proteinlere bağlanmakta yetersiz kaldığını işaret etmektedir.



Şekil 3.1. Ekstrakromozomal pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörü içeren *Tetrahymena* hücrelerinin CdCl<sub>2</sub> ile indüklenerek rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon proteininin üretimi, saflaştırılması ve western blot analizleri. A) Ekstrakromozomal pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektör yapısı. Vektöre CdCl<sub>2</sub> indüklenebilen MTT1 promotörü kontrolünde Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon proteinini kodlayan DNA dizisi klonlanmıştır. B) pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -GFP vektör kesim reaksiyonu. *E. coli* DH5a'nın 14. kolonisinden saflaştırılan plazmid DNA'sı PmeI-ApaI restriksiyon enzim kesim reaksiyonuna alınmıştır; 1. beklenildiği gibi 1285 bç büyüklüğünde Tt-hIFN $\beta$ -GFP füzyon proteinini kodlayan DNA salınmıştır. C) pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörünü içeren *Tetrahymena* hücrelerinin CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesiyle rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon protein üretiminin GFP ışması ile SDS-PAGE jel analizi. Hücreler SDS-PAGE yükleme tamponu ile kaynatmaksızın ve  $\beta$ -merkaptoetanol

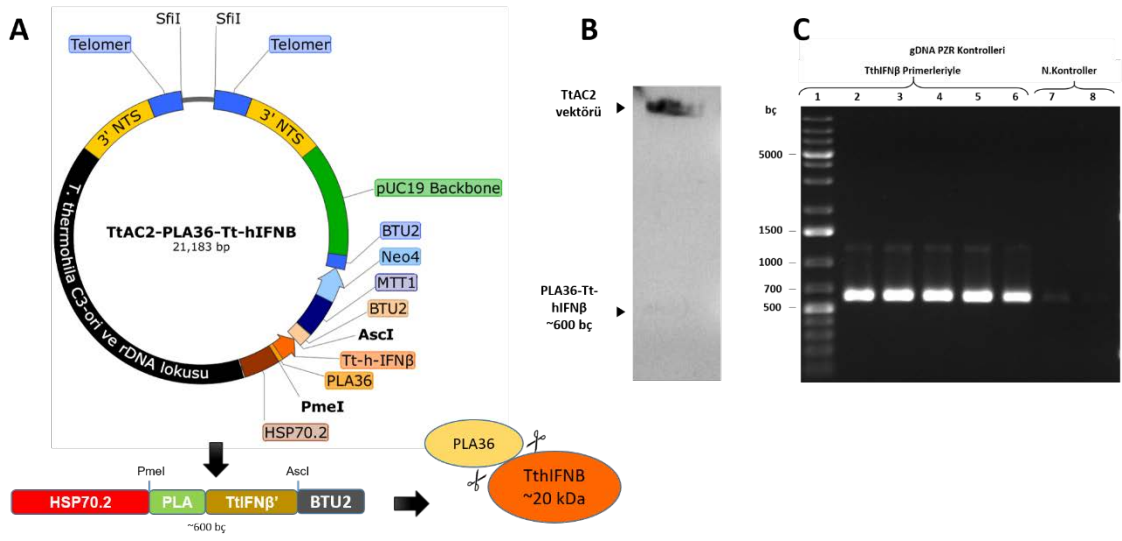
eklenmeksizin parçalanarak direk yüklenmiştir. 1: indüklenmemiş C2 ırkı proteinleri, 2: 3 saat indüklenmiş C2 proteinleri, 3 ve 4: 6 saat indüklenmiş C2 proteinleri, 5: 6 saat indüklenmiş negatif kontrol hücre proteinleri, 6: 9 saat indüklenmiş C2 proteinleri, 7: GFP pozitif kontrol (~27 kDa) proteini eklenmiş protein markör'ü (Page Ruler, #26616 – Thermo), 8: 3 saat indüklenmiş C6 proteinleri, 9: 6 saat indüklenmiş C6 proteinleri, 10: 9 saat indüklenmiş C6 proteinleri. D) pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörünü içeren *Tetrahymena* C2 ve C6 tek hücre klonlarının CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesiyle rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon protein üretiminin floresan mikroskop ile zamana bağlı GFP ışımaya analizi. Mikroskop görüntüleri, U-HGLGPS floresan ataçmanlı Olympus IX53 mikroskobu ile 10x'lik objektif (Olympus, CPlanFL N) ve oküler (WH15X/14) kullanılarak cep telefonu (Samsung Galaxy Alpha) ile çekilmiştir. E) pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörü içeren *Tetrahymena* C2 ve C6 tek hücre klonlarının CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesiyle rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon protein üretiminin çözünür toplam protein ve çözünür olmayan pelet proteinleriyle western blot analizi. Western blot analizlerinde birincil antikor olarak fare (mouse) monoklonal anti-IFN $\beta$  (#SC53968 Santa Cruz, ABD) antikor ve ikincil antikor olarak goat anti-mouse (Genescript, A00160) antikor kullanılmıştır. 1: indüklenmemiş C2 ırkından elde edilen çözünür toplam protein izolatu, 2: 6 saat indüklenmiş C2 ırkından elde edilen çözünür toplam protein izolatu, 3: 9 saat indüklenmiş C2 ırkından elde edilen çözünür toplam protein izolatu, 4: 6 saat indüklenmiş C6 çözünür toplam protein izolatu, 5: 9 saat indüklenmiş C6 çözünür toplam protein izolatu, 6: Ticari hIFN $\beta$  pozitif kontrol proteini (~20-22 kDa, 10704-HNAS Sino Biological, Çin) eklenmiş protein markör'ü (Page Ruler, #26616 –Thermo), 7: 6 saat indüklenmiş C2 çözünmeyen toplam pelet proteinleri, 8: 9 saat indüklenmiş C2 çözünmeyen toplam pelet proteinleri, 9: 6 saat indüklenmiş C6 çözünmeyen toplam pelet proteinleri, 10: 9 saat indüklenmiş C6 çözünmeyen toplam pelet proteinleri. F) pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP vektörü içeren *Tetrahymena* C2 ve C6 tek hücre klonlarının CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesiyle rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon protein üretiminin çözünür toplam protein izolatlarından Ni-NTA afinitik saflaştırmasının western blot ile analizi. Western blot analizlerinde birincil antikor olarak fare (mouse) monoklonal anti-IFN $\beta$  (#SC53968 Santa Cruz, ABD) antikor ve ikincil antikor olarak goat anti-mouse (Genescript, A00160) antikor kullanılmıştır. 1: 9 saat indüklenmiş C2 klonunun kolona bağlanmayan proteinleri (FT = flow through), 2: 9 saat indüklenmiş C2 klonunun Ni-NTA kolon yıkaması, 3: elüsyon-1: 9 saat indüklenmiş C2 klonu, 4: elüsyon-2; 9 saat indüklenmiş C2 klonu, 5: Ticari hIFN $\beta$  pozitif kontrol proteini (~20-22 kDa, 10704-HNAS Sino Biological, Çin) eklenmiş protein markör'ü (Page Ruler, #26616 –Thermo), 6: elüsyon -1; 6 saat indüklenmiş Negatif kontrol, 7: elüsyon-1; 6 saat indüklenmiş C6 klonu, 8: elüsyon-2; 6 saat indüklenmiş C6 klonu, 9: elüsyon-1; 9 saat indüklenmiş C6 klonu, 10: elüsyon-2; 9 saat indüklenmiş C6 klonu.

### 3.2. *T. thermophila*'da Takısız Dışarı Salgılanabilir hIFN $\beta$ 'nın Rekombinant Üretimi, Saflaştırılması ve Protein Analizleri

Tez çalışmasının afinitik takısız Tt-hIFN $\beta$  proteininin üretimi kapsamında; endüstriyel üretime daha uygun dış ortama salgılatma ve kromatografik yöntemlerle direk saflaştırılabilmesi için Tt-hIFN $\beta$  geninin 5' bölgesine PLA36 (dışarıya salgılatma sinyal dizisi) amino asit dizisini kodlayıcı DNA dizisi eklenmiştir (Şekil 3.2-A). GMP'ye uyum kapsamında ayrıca daha kararlı ve ısı-şoku indüksiyonuna sahip HSP70.2 promotörünü içeren pTtAC2 yapay kromozom vektörüne geçişe gerek duyulmuştur. pTtAC2 *Tetrahymena* yapay kromozom vektörü, grubumuzun BAP projeleri ile üretilen ve halen patent değerlendirmesi altında olan özgün bir vektördür. Bu vektör hem dairesel hem de SfiI enzim kesimiyle doğrusal formda, kullanılabilir. pTtAC2 vektörünün rDNA

orijini taşımasından dolayı hem konjugatif hücrelerde, hem de transformasyon kolaylığı sağlayan vejetatif hücrelerde transformasyon yapılabilir. pTtAC2 vektörü, antibiyotik baskısı ile vejetatif hücrelerin makroçekirdeklerinde 2.000-5.000 kopya sayısına erişip hücre içinde 2 yıl gibi uzun bir süre kararlı olarak kalarak, transgenik hücreler uzun bir raf ömrü kazanmaktadır. pTtAC2'nin yapısında bulunan rDNA genlerini kodlayan gen lokusları ise *T. thermophila*'nın vektörü makroçekirdek içinde uzun süre tutmasını, kopya sayısı muhafaza mekanizması yardımıyla sağlamaktadır. pTtAC2 vektörüne geçiş yapmamızın ana nedenlerinden birisi, 9.000 kopyalı ekstrakromozomal pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis vektörü ile sitoplazmik Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteinin yüksek miktarda üretiminin mümkün olduğunun gösterilmesidir. pTtAC2 ile pVGF vektörleri ekstrakromozomallik ve kopya sayısı açısından birbirlerinin muadili olmasına karşılık, pVGF vektörünün ağır metal kadmiyum ile indüklenir MTT1 promotoruna sahip olması nedeniyle GMP'ye uyumlu değildir. Ayrıca, *Tetrahymena* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildikten ve antibiyotik seçilimini tamamladıktan sonra yaklaşık 2 aylık kararlılık süresine sahip olması da bir dezavantajdır. PLA'lı ve afinitik takı içermeyen 166 amino asitlik kodon optimize PLA36-Tt-hIFN $\beta$  kodlayan gen dizisi, pTtAC2 *Tetrahymena* yapay kromozom vektörünün PmeI-AscI restriksiyon kesim bölgesine klonlanarak, GMP uyumlu HSP70.2 (ısı-şoku) promotörü kontrolünde bir PLA36-Tt-hIFN $\beta$  gen kasetine dönüştürülmüştür (Şekil 3.2-A). Böylelikle pVGF vektöründe tespit edilen bu eksiklikler, pTtAC2 vektörünün kullanılmasıyla çözüme kavuşmuştur. Antibiyotik seçilimi 10000  $\mu$ g/mL paromomisin baskısına kadar çıkılarak gerçekleştirildikten sonra tek hücre hatlarından 5 adet seçilmiş ve bunlardan gDNA izolasyonu; Wizard® Genomic DNA purification kit (A1120 Promega, ABD) ile bitki dokularından genomik DNA izolasyonu protokolüne göre, birinci adım atlanarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen gDNA'lar F-TtPLA-PmeI (5' AGCTTTGTTTAAACATGAACAAGACTCTCATCTTAGC 3') ve R-Tt-hIFNB-ApaI (5' AAAGGGCCCTCAGTTTCTTAAGTAACCAGTTAATCTGTTAATGAAG 3') primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir (PrimeStar DNA polimeraz, #R010A, TAKARA). Beklenen büyüklük ~630 bp'dir (Şekil 3.2-C). Tek hücre klonlarından seçilen 5 adet klonun genomunda interferon beta geni bulunduğu görülmüştür. Şekil 3.2-C'de 2-6. kuyular deney grubu PLA36-interferon beta gen kasetini bantları beklenildiği gibi 630 bp civarında görülmektedir. 7. kuyu içerisinde PLA36-interferon beta kaseti olmayan negatif *Tetrahymena* hattı ile yapılan kontrol grubu olup PZR reaksiyonunda

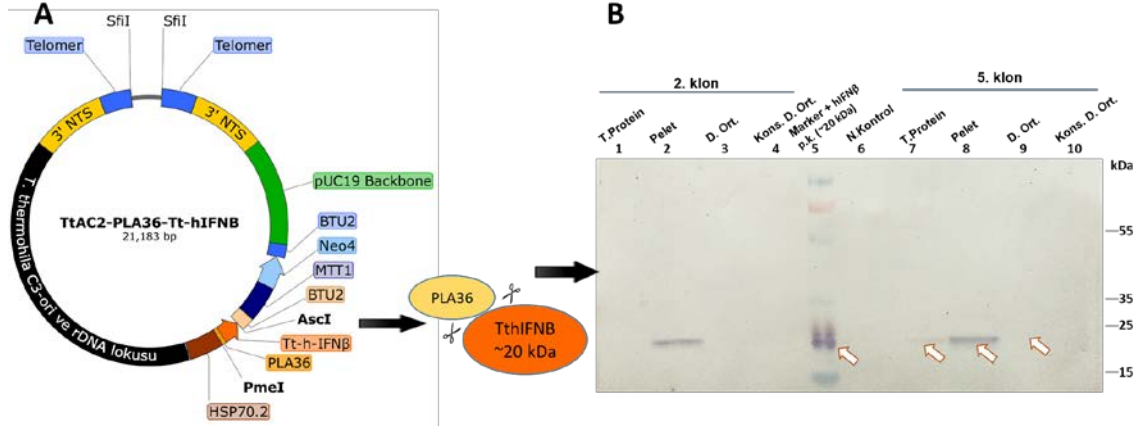
kullanılan primerler deney grubundaki gibi bir bant oluşumuna needn olmadığı görülmektedir. 8. kuyu ise PZR reaksiyonunda herhangi kullanılan solüsyonlarda bir kalıp kontaminasyonu olup olmadığını kontrolüdür. PZR reaksiyonu içerisine PLA-36- interferon beta gen kasetinin olduğu bir kalıp konulmamıştır. Beklenildiği gibi reaksiyonda kullanılan solüsyonlarda herhangi bir kontaminasyon olmadığı için primerler bir ant üretmemiştir. Bu da yapılan deneyde kullanılan primerlerin ürettiği bantların tek hücre klonlarından geldiğini göstermektedir.



**Şekil 3.2.** pTtAC2 yapay kromozom vektörüne afinitik takımsız PLA-Tt-hIFN $\beta$  proteinin kodlayan gen bölgesinin klonlanması ve oluşturulan vektörü içeren pozitif transformantlardan gDNA kontrolleri. A) GMP uyumlu PLA-Tt-hIFN $\beta$  ekspresyon kasetini içeren pTtAC2 vektör yapısı. Bu kaset içerisinde 38 °C ısı-şoku ile indüklenerek HSP70.2 promotör dizisi, *Tetrahymena*'nın PhosphoLipaz A dışarıya salgılatma dizisi (PLA36), dışarıya salgılatılacak olan interferon beta dizisi (Tt-hIFN $\beta$ ) ile transkripsiyon sonlandırma dizisi olan BTU2 yer almaktadır. B) pTtAC2-PLA-Tt-hIFN $\beta$  vektörünün PmeI-AscI restriksiyon enzimleriyle kesimi. C) pTtAC2-PLA-Tt-hIFN $\beta$  vektörünü içeren *Tetrahymena* pozitif tek hücre klonlarının genomik DNA kontrolleri. Antibiyotik seçiminden sonra 5 tek hücre klonundan yapılan gDNA izolasyonu yapıldı. gDNA'lar içerisinde PLA36-Tt-hIFN $\beta$  gen bölgesi (~630 bp) bu bölgeye özgü primerler kullanılarak PZR ile kontrol edildi. 1. GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo, SM0313) 2-6. kuyular 5 adet tek hücre klonundan elde edilen sonuçlar. 7. Negatif kontrol, 8. Kalıpsız PZR kontrolü (pozitif kontrol)

1'er milyon hücre içeren peletler Liziz Tamponu (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM İmidazol, %1 Triton X-100, 2 mM PMSF, 1XPIC, pH 7.8) ile ~15 dk. buzda inkübasyon, 0,2  $\mu$ m'lik çelik bilyeler kullanılarak 7 devirde 5 dk. Bullet Blender ile muamele edildi, 10 dk. buzda inkübasyon, 15 dk. 4 °C 13-14.000 g santrifüjleme yapıldı. Süpernatant çözünür toplam protein olarak saklandı. Toplam protein izolasyonundan kalan peletler ise 10 mM Tris-HCl ile yeniden çözüldü ve çözünür

olmayan toplam protein (pelet) olarak kullanıldı. Çözünür toplam proteinler ve çözünür olmayan toplam proteinlerden örnekler ve indüklemenin ardında elde edilen hücrelerin dış ortamlarından ~20µL, konsantre edilmiş dış ortamlardan da ~20 µL yükleme tamponuyla birlikte SDS-PAGE jeline yüklendi ve Western Blot deneyi yapıldı (Şekil 3.3-B).



Şekil 3.3. pTtAC2 yapay kromozom vektörünü içeren hücrelerin ısı-şoku ile indüklenmesi ve western blot analizi. A) GMP uyumlu PLA-Tt-hIFNβ ekspresyon kasetini içeren pTtAC2 vektör yapısı. B) pTtAC2-PLA-Tt-hIFNβ vektörünü içeren *Tetrahymena* pozitif tek hücre klonlarından 2. ve 5. Klonun indüklenmesi sonrası elde edilen proteinlerin western blot analizi. 1. 2. 3. ve 4. kuyular 2. klonu ait ve sırasıyla çözünür toplam protein, çözünür olmayan toplam protein, dış ortam ve konsantre dış ortam. 2. kuyuda beklenen büyüklükte bant var. 3. ve 4. kuyuda bant yok, 1. kuyuda zayıf bir bant var. 5. kuyu markör ve pozitif kontrol, pozitif kontrol örneğine antikor bağlanmış ve bant oluşumu okla gösterildiği gibi gerçekleşmiştir. 6. kuyu negatif kontrol grubu, beklenildiği gibi bant yok. 7. 8. 9. ve 10. kuyular 5. klonu ait ve sırasıyla çözünür toplam protein, çözünür olmayan toplam protein, dış ortam ve konsantre dış ortam. 1. ve 2. kuyuda beklenen büyüklükte bant var. 3. kuyuda çok az bir bant var 4. kuyuda bant yok

Yapılan western blot analizinde ticari pozitif kontrolümüz olan interferon beta proteinine kullanılan anti interferon beta antikoruna bağlanmıştır, bu western blot deneyinin doğru bir şekilde çalıştığını ve güvenilir olduğunu göstermektedir. 6. kuyudaki negatif kontrolde antikor bir protein bandına bağlanmamıştır. Özellikle 5. klonun 1. ve 2. kuyularında net bir şekilde görülen protein bantları, pTtAC2 vektöründen ısı-şoku ile interferon beta'nın rekombinant olarak *Tetrahymena*'da üretildiğini göstermektedir.

## 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 4.1. Tartışma

Ökaryotik silli tek hücre li *T. thermophila*' da rekombinant Tt-hIFN $\beta$  terapötik proteininin üretilmesi ve aktivite karakterizasyonu, tez çalışmasının araştırma amacıdır. Bu amaç doğrultusunda planlanan deneyler gerçekleştirilmiş fakat son 6 aylık döneme kadar Tt-hIFN $\beta$  'nin rekombinant olarak üretilmesi gösterilememiştir (EK'ler). Çünkü tez çalışmasının ilk aylarında, Tt-hIFN $\beta$ 'yi kodlayan dizi hizmet alımı yoluyla sentetik ürettirilmiştir ve ShineGene firması (Çin) tarafından yapılan, sonrasında tarafımızdan tekrarlanan (Yeni Nesil) DNA dizi analizleri (EK-1) uyumlu olduğu için kullanıma alınmıştır. Tez aşamasının ilk 2,5 yıllık araştırma deneyleri esnasında Tt-hIFN $\beta$  'nin rekombinant olarak üretilmesi değişik yaklaşımlar ve tasarımlar ile gerçekleştirilemeyince, gen kasetinde Tt-hIFN $\beta$ 'yi kodlayan bölge tekrar Sanger DNA dizi analizine, ShineGene firmasının dizisi ile birlikte alınmış ve 55. nükleotitte de bir baz silinme mutasyonu bulunduğu tespit edilmiştir (Not: bu mutasyon ShineGene firması tarafından gönderilen sentetik interferon beta dizisinde bulunmamıştır). Tt-hIFN $\beta$ 'yi kodlayıcı okuma çerçevesinin 55. nükleotitteki (19.kodonda) bir baz silinme mutasyonu, kodlama çerçevesinin kaymasına neden olmuş ve devamında oluşan yeni çerçevenin 26. kodonunu DUR (TGA) kodonuna dönüştürmüştür. Bu durum ise Tt-hIFN $\beta$  kodlayıcı dizinin translasyonunun erkenden durmasına ve Tt-hIFN $\beta$ 'nin üretilmemesiyle sonuçlanmıştır (DNA dizi analizleri raporu EK-1'de verilmiştir). Problemin tespitinden sonra ShineGene firmasının orijinal Tt-hIFN $\beta$  kodlayıcı dizisi tekrar PZR ile çoğaltılarak, pVGF vektör altyapısına klonlanarak Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin kodlayıcı gen kasetinde kullanılmıştır. Rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin PLA36 sinyal peptid dizi olmaksızın sitoplazmada üretimi (Şekil 3.1-A), hem Western blot deneyindeki saflaştırılmış toplam çözünür proteinler ve çözünür olmayan pelet proteinleriyle hem de floresan mikroskop altında *in-vivo* olarak GFP ışınmasıyla teyit edilmiştir (Şekil 3.1-C-D).

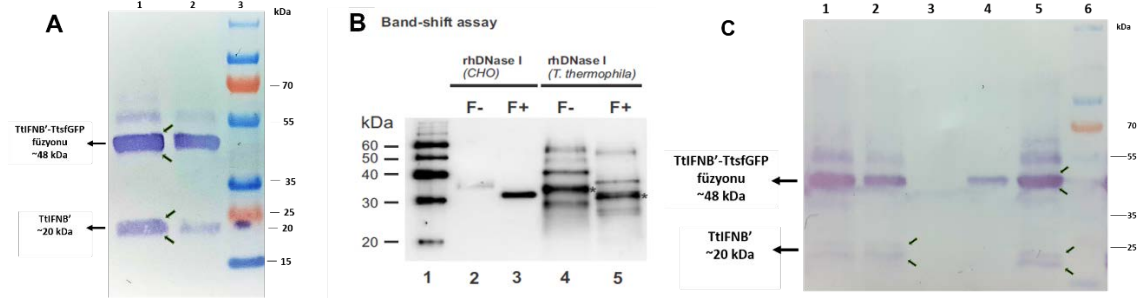
Transformatlar arasından tek hücre izolasyonu ile oluşturulan pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis vektörü içeren C2 ve C6 tek hücre klonları ile monoklonal anti-hIFN $\beta$  antikoru kullanılarak gerçekleştirilen western blot analizi, Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin büyüklüğünün beklenildiği gibi ~48 kDa olarak belirlemiştir (Şekil 3.1-E ve F). Ayrıca monoklonal anti-hIFN $\beta$  antikoru, ~48 kDa füzyon proteininin altında kalan Tt-hIFN $\beta$ 'nin beklenen büyüklüğü olan ~20 kDa'luk bir protein daha olduğunu

göstermiştir. Üretimi beklenilmeyen ~20 kDa'luk bu protein bandının olasılıkla ~48 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin kırılmasıyla, oluşan Tt-hIFN $\beta$  olduğu düşünülmektedir. ~20 kDa'luk proteinin Tt-hIFN $\beta$  olduğunu destekleyen iki durum söz konusudur; **ilki**, Tt-hIFN $\beta$  ile TtsfGFP-12xHis'in birleşme noktasına kaset tasarlanırken kırılmayı engelleyici esnek bir amino asit bağlayıcı (adapter) dizisinin yerleştirilmemiş olması, **ikincisi** ise Şekil 6-E'de saflaştırılmış toplam çözünür proteinlerinden ve çözünür olmayan pelet proteinleriyle yapılan western blot verileri, ~20 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$ 'nin her iki klonda da yüksek oranda bulunduğunu göstermesidir (Şekil 3.1-E). Kırılma söz konusu ise bu kırılan ~20 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$ 'lerin 12xHis afinitik takı içermemesinden dolayı Ni-NTA saflaştırmalarında bulunması beklenmezken Şekil 3.1-F'de ~20 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$ 'lerin afinitik saflaştırılmalarının yıkama kısmında hiç bulunmadığı fakat elüsyonlarda çok (kuyu 4, 5) veya az miktarda (kuyu 7, 8 ve 9'da) bulunduğu görülmektedir. Buna karşılık; afinitik takı içeren ~48 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininin yüksek miktarda saflaştırıldığı yine bu kuyularda görülmektedir. Bu durumda; "az miktarda görülen ~20 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$ 'ler olasılıkla kolona bağlanan ~48 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteinlerinden elüsyon esnasında kırılmakta ve elüe olmaktadır", sonucuna varılmıştır. Şekil 3.1-E'nin 6. kuyusunda ve 6-F'nin 5. kuyusunda bulunan protein belirteçleri içine western blot için eklenen pozitif kontrol proteini, ticari hIFN $\beta$ 'nin ~20 kDa'luk büyüklük seviyesini (belirtecin alt kırmızı protein bandının hemen altında yer alan küçük mavi protein bandı) göstermekte olup ~20 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$  olduğu düşünülen protein ile aynı büyüklükte görülmektedir. Bu görüşümüzün kesinliğe kavuşturulması ancak bu protein bantlarının kesilerek MS/MS MALDI-TOF analizine alınmasıyla çözümlenebilir.

Afinitik takısız Tt-hIFN $\beta$  proteininin üretimi kapsamında; GMP'ye uygun üretim için yapılan çalışmalara bakıldığında, dış ortama salgılatma ve kromatografik yöntemlerle direk saflaştırılabilmesi için Tt-hIFN $\beta$  geni PLA36 dışarı E.R. sinyal peptid dizisi ile birlikte oluşturulduktan sonra *Tetrahymena* hücrelerine transforme edildi ve yapılan indüklemenin ardında özellikle 5. klonda hem çözünür hem de pelette rekombinant interferon beta üretimi görüldü (Şekil 3.3-B). *Tetrahymena thermophila*'da 2 farklı promotor ve bu iki farklı promotörün bulunduğu iki farklı ekstrakromozomal vektör sistemleriyle yapılan üretimlerde interferon beta rekombinant olarak üretilmiştir.

pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis vektöründe indükleme ile yapılan rekombinant protein üretimi analizlerinde elde edilen sonuçlara göre Şekil 4.1 incelendiğinde, western blot analizinde füzyon protein olan ~48 kDa büyüklüğüne tekabül eden kalın 1. ve 2. elüsyon bantlarının aslında birbirine yakın iki bant olduğu düşünülmektedir (Şekil 4.1-A ve C). Rekombinant olarak üretilen protein bantlarının glikozilasyonlu ve glikozilasyonsuz versiyonları arasında fark olduğu Weide ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gösterilmiştir (Weide vd., 2006). Bu çalışmada PNGaz F enzimi ile muamele edilen rekombinant insan DNaz I proteininin SDS-PAGE jelinde enzim uygulanmamış olan protein bandı ile karşılaştırıldığında daha aşağıda koştığı görülmüştür. Glikozilasyonu ve glikozilasyonsuz üretim arasında bu şekilde bir büyüklük farkı bulunmaktadır. Elde ettiğimiz rekombinant Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon proteinindeki ve interferon beta büyüklüğüne denk gelen 20 kDa civarındaki kırıklı üretimdeki çift bant şeklinde görülen proteinlerin de glikozilasyonlu ve glikozilasyonsuz versiyonlarının olabileceği öngörülmektedir (Şekil 4.1-C, 1. 2. ve 5. kuyulardaki ok ile gösterilen en alt bantlar). Çift bant şeklinde görülen bu proteinlerinde, organizma tarafından hem glikozilasyonlu hem de glikozilasyonsuz veya düşük glikozilasyonlu şeklinde bir üretimden kaynaklanmış olmasını olası bulmadığımız bir üretim sistemi kullanmıştık. Sitoplazmik bir şekilde üretilen Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon proteininde E.R. sinyal dizisi bulunmadığı için normal şartlarda bir glikozilasyon beklenilmez. Fakat 1983 yılında Levy-Wilson yaptığı bir çalışmada histon proteinlerinin glikoprotein yapıda olduklarını göstermişlerdir. Histon proteinleri E.R. ve Golgi aygıtına gitmeden sitoplazmada sentezlenip çekirdeğe giderler. Glikoprotein yapısını sentezlendikten sonra sitoplazmada veya nükleusta glikan yapılarının eklenmesi ile kazanırlar. Enzimatik veya nonenzimatik glikozilasyonlu histon proteinlerinin keşfi ile histonlarda fukoz ve mannoz residülerinin olduğu gösterilmiş (Levy-Wilson, 1983). CHO'da ve *E. coli*'de üretilen IFN-betaların AGE (Advanced Glycation End Product) ile modifiye edildiğini belirtmişlerdir (Bozhinov vd., 2012). AGE'ler, proteinler, lipoproteinler ve/veya nükleik asidlerde bulunan azotlu grupların, indirgeyici şekerlerin karbonil grupları ile non-enzimatik glikasyonu sonucu oluşan heterojen bileşiklerdir. Glikasyon, proteinler üzerindeki birincil amino gruplarıyla glukoz gibi indirgeyici şekerler arasındaki kimyasal bir reaksiyon sonucu ortaya çıkan yaygın bir posttranslasyonel modifikasyondur (Baynes 2002). Bu veriler ışığında üretilen füzyon proteininde ve kırıklı üretimle görülen ve interferon beta olduğunu düşündüğümüz

proteinde glikan yapısı şeklinde şeker gruplarının eklenmiş olabileceği tahmin edilmektedir.



**Şekil 4.1.** Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon ve kırıklı bir şekilde üretildiği düşünülen Tt-hIFN $\beta$ 'da görülen ikili (çiftli) proteinlerin bantlarının. A) Western blot ile rekombinant üretimi gösterilen interferon beta B) Weide ve arkadaşlarının 2006 da *Tetrahymena*'da yaptıkları rekombinant insan DNaz I geninin glikozilasyon paterni. C) Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis hattıyla yapılan son western blot ile rekombinant üretimi gösterilen interferon betadaki çiftli bantlar.

Yüksek Lisans eğitimim sırasında rekombinant DNA ve rekombinant protein üretimi ile ilgili deneysel bir çalışma yapmamış olmam ve bu konulardaki tecrübemi ilk defa şu an tez çalışmalarımı sürdürmekte olduğum laboratuvarıda öğreniyor olmamın getirmiş olduğu bazı sıkıntılar ortaya çıkmıştır. Bunlardan bir tanesi de Rekombinant füzyon protein üretim stratejilerinde gözden kaçırdığım bir nokta olan üretilecek iki farklı protein arasında bir bağlayıcı (adapter/linker) dizi koymayı düşünmemiş olmamdır. Bağlayıcı bir dizinin olmaması, hem IFN-beta'nın hem de GFP'nin stabilitesini etkilediği ve doğru katlanma yapamamasına neden olduğu; bu nedenle bir kısmında kırılma meydana geldiği düşünülebilir. Böylelikle oluşan füzyon proteinlerinin bir kısmı agregat oluşturmakta ve çözünemeyen formda kalmaktadır (Calow vd., 2012; Arai vd., 2010.; Chen vd., 2013). Glikozilasyon IFN-beta'nın çözünürlüğünde önemli bir yere sahiptir. Glikozilasyona uğramayan interferon beta'lar agregat oluşturma ve çökme eğilimindedirler. (Runkel vd., 1998) Protein ikincil yapısının oluşumunda çok önemli görevi olmayan, yan zincirleri bulunmayan küçük yapıli amino asitlerden oluşan "GlyGlyGlySer" amino asit bağlayıcı dizisi, genellikle iki protein füzyon proteini oluşturulmak istenildiğinde, yapısal kararsızlık ve katlanamama problemlerini en aza indirmek için iki protein arasına esnek bağlayıcı olarak eklenmektedir (Calow vd., 2012). Bu durumda; Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteinin ~48 kDa'luk kırılmaz bir versiyonunun üretimi için "GlyGlyGlySer" (*Tetrahymena*'ya kodon uyumu (GGTGGTGGTTCT) gibi bir esnek amino asit adapter dizisini kodlayan DNA dizisi,

örtüşen primer-PZR yöntemiyle bu iki proteini kodlayan diziler arasına eklenmeli ve rekombinant füzyon proteinin üretimi bu şekilde gerçekleştirilmelidir. Böylelikle hem Tt-hIFN $\beta$  kırılarak ayrılması hem de çözünmeyen agregat olarak Tt-hIFN $\beta$  füzyonunun kaybı önlenebilecektir (Şekil 4.2).

```

gactcatgatttaaactcatgagtcacacctaactaattttcaaaattcttctattctaaaa -241
tatagatgtgattcttgaatctctcttgaatataaaagtaattttttatattttctgatata -181
attccttagctacgtgattcacgatttatacaatgatccatataaaaataatgtaaatagtg -121
tataatataatattcgtcttttttattctttatataatttaaaaaaattaaaaaaatta -61
ataagctctaataaaaataaataaataactaaactaaaataaaagtttaaactggcca -1
atgtcttacaacttattagggtttcttacaagatcttctaactccaatgccaaaaatta 60
M S Y N L L G F L Q R S S N F Q C Q K L
ttatggcaattaaacggtagattagaatactgctttaaagacagaatgaacttcgacatt 120
L W Q L N G R L E Y C L K D R M N F D I
cctgaagaaattaaacaattacaacaattccaaaaagaagacgctgctttaaactatttac 180
P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A L T I Y
gaaatgttacaaaacatttttgcattttcagacaagactcttcttctactggttggaac 240
E M L Q N I F A I F R Q D S S S T G W N
gaaactattgttgaaaaacttattagctaacgtttaccaccaaattaaaccttaaaaact 300
E T I V E N L L A N V Y H Q I N H L K T
gttttagaagaaaaattagaaaaagaagacttcactagaggaaaattaatgtcttcttta 360
V L E E K L E K E D F T R G K L M S S L
cacttaaaaagataactacggtagaattttacactacttaaaagctaaagaatactctcac 420
H L K R Y Y G R I L H Y L K A K E Y S H
tgcgcttggactattgttagagttgaaattttaaagaaacttctacttcattaacagatta 480
C A W T I V R V E I L R N F Y F I N R L
actggttacttaagaaaggagggtgtctcttaaagggaagaattattcactgggtgtt 540
T G Y L R N G G G S S K G E E L F T G V
gttctatttttagttgaattagacggtagcgttaacgggtcacaattctctgttagaggt 600
V P I L V E L D G D V N G H K F S V R G
gaagggtgaaggtagcgtactaacggtaaatattaaattcatttgcactactgggt 660
E G E G D A T N G K L T L K F I C T T G T
aaattacctgttcttggcctctttagttactactttaaacttacgggtgttcaatgcttc 720
K L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F
tctagataccctgaccacatgaaaagacacgacttcttcaaactgctatgctgaaggt 780
S R Y P D H M K R H D F F K S A M P E G
tacggtcaagaagaactattttcttcaaagacgacggtagcttacaacttagagctgaa 840
Y V Q E R T I S F K D D G T Y K T R A E
gttaaattcgaaggtagacttttagttaacagaattgaattaaaaggattgacttcaa 900
V K F E G D T L V N R I E L K G I D F K
gaagacggtaacatttttaggtcacaattagaatacaacttcaactctcacaacgtttac 960
E D G N I L G H K L E Y N F N S H N V Y
attactgctgacaaaacaaaacgggtattaaagctaacttcaaatttagacacaacggtt 1020
I T A D K N G I K A N F K I R H N V
gaagacgggttctgttcaattagctgaccactaccaacaaaacactcctattggtagcgg 1080
E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G
cctgttttattacctgacaaccactacttatctactcaatctgttttattctaaagacct 1140
P V L L P D N H Y L S T Q S V L S K D P
aacgaaaaaagagaccacatggttttattagaattcggttactgctgctgggtattcac 1200
N E K R D H M V L L E F V T A A G I T H
ggtaggacgaattatacaaaacaccaccaccaccaccaccaccaccaccaccaccaccctga 1260
G M D E L Y K H H H H H H H H H H H H H -
tgaggccggccgggcccaaaaacaacaaccaacaaaacttctattcataaattatact 1320
aaactatagctcatatatcacaataatcatatatttttaaatgccatataatgtgc 1380
gtgtactttattaaatttttaactcaaaactattttcatataaaacttattcattcttc 1440
cctataacttaacaacaacgaaaaaaaataacttctcaaatattcaaaaacaatatt 1500
tttacatttttctaattccaatacaaaatgtaaacaaatattcaaaatttttaataaa 1560

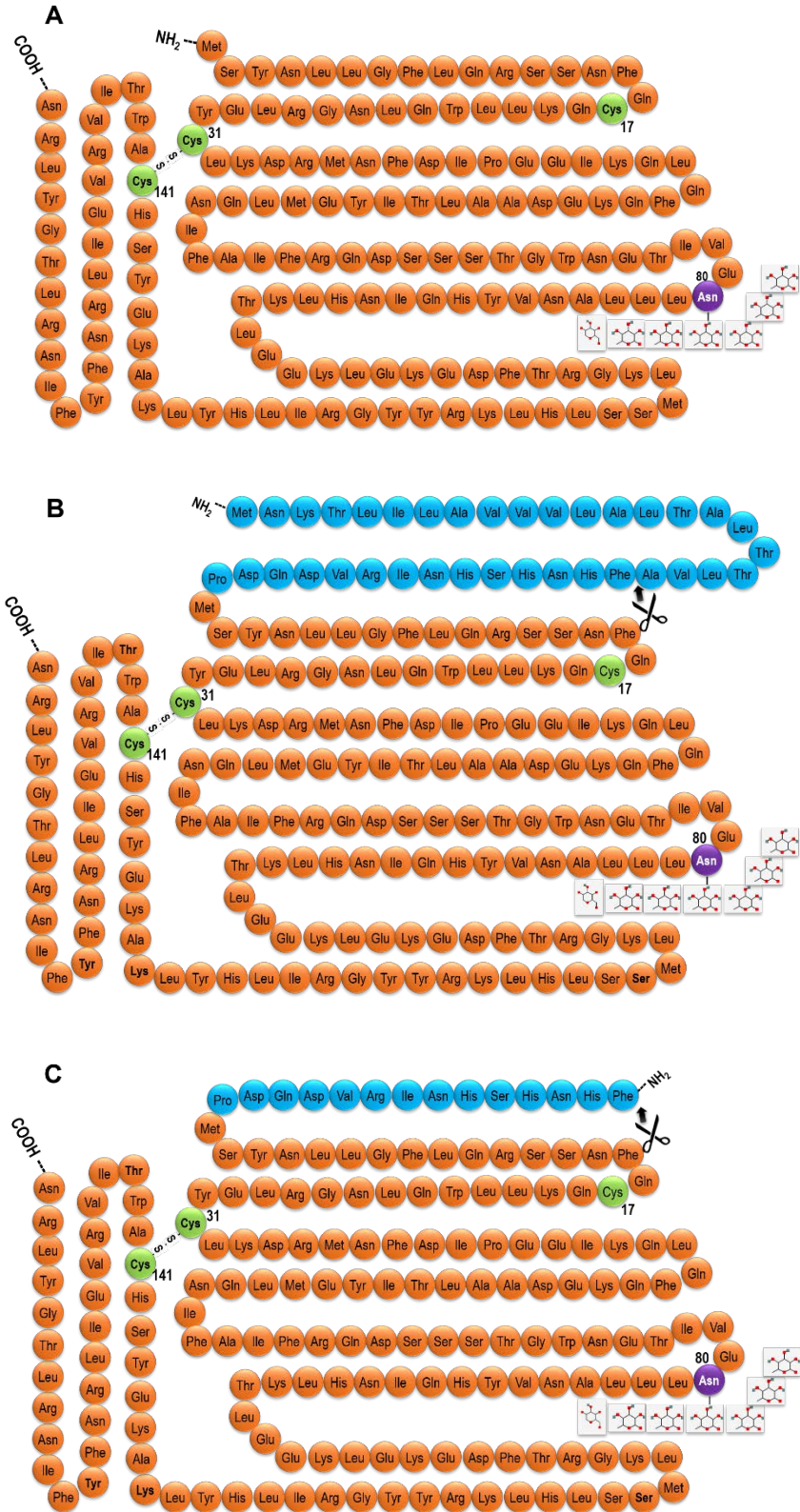
```

Şekil 4.2. Kodon optimize IFN-beta ve GFP arasına bağlayıcı bir dizi konulması. *Tetrahymena*'da ürettirilecek Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP füzyon proteinini kodlayan DNA dizisine bağlayıcı dizi olan GlyGlyGlySer dizisinin eklenmiş hali. Turuncu renk ile gösterilen interferon beta ile yeşil renk ile gösterilen GFP arasında mavi renkli olarak kırmızı çerçeve içerisinde gösterilmiştir.

Tez çalışması kapsamında 45 kopyalı makroçekirdek genomuna entegrasyonda kullanılan orijinsiz pNeo4 vektörü (Mochizuki vd., 2008), 9.000 kopyalı ekstrakromozomal pVGF vektörü ve son olarak *T. thermophila* için grubumuz tarafından tasarlanmış 2.000-5.000 kopyalı ekstrakromozomal pTtAC2 yapay kromozom vektörü kullanılmıştır. Ayrıca saflaştırmayı kolaylaştırmak ve üretim kapasitesini sürekli kılmak amacıyla; *Tetrahymena* Fosfolipaz A geninin (PLA, Phospholipase A gene) dışarıya salgılatma sinyal takısının literatürde kullanılan ve patentlenmiş ilk 115 amino asit dizisi (PLA115) ile PLA105 takıları yerine, PLA36 dizisi dışarı salgılatmada kullanılmış olup çalışmalar devam etmektedir. Oluşturulan vektör *Tetrahymena* hücrelerine transform edilmiş antibiyotik baskısı 10.000 µg/mL'ye kadar çıkılarak 5 adet tek hücre klonu elde edilmiştir. Elde edilen 5 hücre klonundan yapılan PZR ile genomik DNA analizinde genom içerisinde PLA36-Tt-hIFNβ gen kasetinin varlığı bu kasete özgü primerler kullanılarak gösterilmiştir. pTtAc2- PLA36-Tt-hIFNβ vektörüyle protein çalışmaları devam etmektedir. Dışarı salgılatmada kullanılan PL36 sinyal peptid dizisi SignalP programı ile analiz edildiğinde (SignalP: Almagro Armenteros vd., 2019) 22. ve 23. amino asitler olan Alanin ve Fenil Alanin arasından kesmekte olduğu görülmektedir (Şekil 4.3). Sinyal peptid analizi aynı zamanda <http://www.predisi.de/> web sitesinde de gerçekleştirilmiş ve aynı sonuç elde edilmiştir. Buna göre PLA36 sinyal dizisi 22. amino asitten sonra kesildiği varsayıldığında rekombinant interferon beta proteininde 12 amino asitlik bir kalıntı bırakacaktır (Şekil 4.4-C). IFN-beta'nın takısız ve kalıntısız bir şekilde üretimi söz konusu olduğunda (Şekil 4.4-A) *Tetrahymena*'nın dışarıya salgılatma dizisinin yeniden tasarlanması ve deneylerin gerçekleştirilmesinin daha doğru olacağı düşünülmektedir. Hem PLA36 hem de PLA22 (MNKTLILALVVVLALTATTLVA) sinyal dizileriyle yapılacak çalışmalardan elde edilecek proteinlerin amino asit analizleri (EDMAN Degredasyonu) ile tespti edilerek hangi sinyal peptid dizisinin kullanılmasının daha uygun olduğu belirlenmelidir.

Hedef hormonların takısız formlarının üretiminde; GMP kuralları gereği transformasyonu takiben antibiyotik seleksiyonu gerçekleştirildikten sonra kültürizasyon esnasında antibiyotik kullanımı gerçekleştirilmemesi gerekmektedir. Bu nedenle rekombinant protein üretim platformunun vektörel altyapısı, grubumuz tarafımızdan geliştirilen ve patent başvurusu yapılmış olan ve iki yıla kadar kararlılığı gösterilmiş 2.000-5.000 kopyalı *Tetrahymena* makroçekirdek yapay kromozomu 2 (pTtAC2)'ye kaydırılmıştır. Bu vektör altyapısı kullanılarak hali hazırda PLA36-Tt-hIFNβ (Şekil 4.4-





**Şekil 4.4.** Tt-hIFN $\beta$  üretimi için PLA'sız (A) ve PLA36' lı (B) ve PLA36 işlendikten sonra kalan PLA14-Tt-hIFN $\beta$  tasarımları (C). Turuncu: Tt-hIFN $\beta$  beta aminoasit dizisi, Mavi: PLA36 aminoasit dizisi. 80. Aminoasit olan Asn' de beklenen bir glikozilasyon mevcuttur. 31. -141. sisteinler arasında disülfid bağı oluşumu vardır. Makas ile gösterilen kısımdan T.

*thermophila*'nın kesim yaptığı biyoenformatik SignalP programı ile analiz edilerek öngörülmüştür.

Maruyama ve vd. (2004) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; takısız hIFN $\beta$  ile hIFN $\beta$ -DsRed2 ve hIFN $\beta$ -EGFP takılı füzyon proteinlerinin biyoaktiviteleri karşılaştırılmıştır. Kırmızı ve yeşil floresan protein içeren hIFN $\beta$ 'ların füzyon proteinlerinin aktivitesinin eşit düzeyde var olduğu gösterilmiş fakat takısız hIFN $\beta$ 'ya göre de %25 daha düşük bulunduğu raporlanmıştır (Maruyama, vd., 2004). Saflaştırılmış Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteini ile takısız Tt-hIFN $\beta$  (Şekil 4.1) proteinlerinin biyoaktivite testleri, hizmet alımı yoluyla Amerika'da PBL Assay Science firmasına (PBL Assay Science <https://www.pbl assaysci.com/assay-services/cytopathic-effect-inhibition-assay-service>) Avrupa farmakopisine uygun bir şekilde insan akciğer karsinoma A549 hücrelerinin encephalomyocarditis (EMC) virüsün enfeksiyonuna karşı Tt-hIFN $\beta$ 'nın koruma kabiliyetini ölçme şeklinde, hizmet alımı yoluyla yaptırılacaktır. Maruyama ve vd. (2004) verilerine göre rekombinant ürettiğimiz ve saflaştırdığımız Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteininde, TtsfGFP takısıyla birlikte hIFN $\beta$  hormon aktivitesi göstereceği, beklenmektedir.

Rekombinant insan İnterferon beta üretimi için literatürde kullanılan konakçılar ve saflaştırma yöntemleri Tablo 1'de verilmiştir. Terapötik protein üretim konakçısı olarak bakteriyel kaynaklı bir organizmanın kullanılmasının, protein üretimi, izolasyonu ve saflaştırılması aşamalarının çok daha uzun olmasına neden olduğunu görülmektedir. Özellikle hIFN $\beta$ 'yı çözünür formda olmayan inklüzyon cisimcikleri şeklinde üreten *E. coli* konakçısından saflaştırılması, çözünmeyen rekombinant proteinlerin önce denatüre şartlarda çözünmesini ve tekrar renatüre/aktif hale getirilmesini gerektirmektedir (Romanov vd., 2011; Krishna vd., 2009; Argamante vd., 2003;). Ayrıca elde edilen renatüre proteinlerin *E. coli* orijinli yabancı (toksik) protein ve maddelerden temizlenmesi ve saflaştırılması, uzun ve uğraştırıcı bir süreç içermektedir. Bakteri kültürlerinin çok hızlı çoğalması, elde edilen protein miktarının fazla olmasını belirleyici özelliklerden biridir. Fakat *E. coli* glikozilasyon çatalını ekleme işlemini gerçekleştirememesinden dolayı saflaştırılan rekombinant proteinlerin biyoaktivitesi, glikozilasyonlu versiyonlara göre daha düşük kalmaktadır. Ökaryotik konakçılardan mayaların kullanılması ise aşırı glikozilasyonlu insanın glikozilasyonuna göre daha fazla çatalanma içerebilen interferon beta üretilmesiyle sonuçlanmakta ve daha kolay saflaştırma adımları kullanılmasına rağmen saflaştırılan proteinlerin biyoaktivitesi düşük kalmaktadır (Madhavan ve

Sukumaran 2016;). Bu nedenlerle günümüzde hIFN $\beta$ 'nın en iyi üretim konakçısı memeli hücre hatlarından CHO kültür sistemleridir (Rodriguez vd., 2005; Rodriguez, vd., 2010).

Tablo 4.1'den görüleceği üzere, rekombinant olarak üretilen hIFN $\beta$ 'nın saflaştırma adımları Hi-Trap Blue kolon afinite kromatografisi ile diyaliz içermektedir. hIFN $\beta$  proteinleri aromatik anyonik bölgeleri ile Hi-Trap Blue kolonunun elektrostatik ve/veya hidrofobik etkileşim ile bağlanarak, afinitik olarak saflaştırılabilir. CHO hücrelerinden elde edilen saf proteinin biyoaktivitesi insan interferon betasıyla aynıdır. Memeli hücre kültürü sistemlerinin kullanılmasının dezavantajı ise kullanılan tüm malzemelerin çok pahalı olması, deneysel süreçlerin oldukça hassas ve kontaminasyona açık olmasıdır. Bu nedenle hIFN $\beta$  terapötik protein üretimi için alternatif konakçı arayışları sürmektedir. Tez çalışması kapsamında ise takısız hIFN $\beta$  formunun *T. thermophila*'dan saflaştırılması Hi-Trap Blue kolon afinite kromatografisi ile gerçekleştirilecektir.

**Tablo 4.1. Rekombinant hIFN $\beta$  üretiminde kullanılan saflaştırma yöntemleri**

Konakçı	Saflaştırma 1	Saflaştırma 2	Saflaştırma 3	Konsantrasyon mg/L (veya U/L)
<i>E. coli</i> Sitoplazmik rhIFN $\beta$ -1b	İyon-Değişim Kromatografisi DEAE-sepharose FF. ve SP-sepharose FF.	Jel filtrasyonu sephadex G-50 ile tuzdan zaklaştırma	Ters-Faz HPLC Protein saflığı > %90	8 g inklüzyon cisimciklerinden 20 mg elde edilmiş 0,32 mg/mL
<i>E. coli</i> Sitoplazmik rhIFN $\beta$ -1b	Size-exclusion Sıvı Kromatografisi	Jel filtrasyonu sephadex G-75 ile tuzdan zaklaştırma ve saflaştırma	Ters-Faz HPLC Protein saflığı > %99	(%34) 432 mg hücre peletinden 149 mg saf protein
<i>Pichia</i> rhIFN $\beta$ -1a Süpernatant	Hi-Trap IMAC ve diyaliz	Ultrafiltrasyon Ve konsantrasyon	Ters-Faz HPLC Protein saflığı > %80	12mg/mL
<i>K. lactis</i> rhIFN $\beta$ -1a Süpernatant	Konsantre süpernatantlar Native şartlarda Ni-NTA kolonuyla	Dializ ve liyofilizasyon	-	Biyolojik aktif 1 mg/mL (Bradford)
CHO rhIFN $\beta$ -1a Süpernatant	Hi-Trap Blue column Afinite kromatografisi ve gece boyu (g/b) diyaliz	Konsantrasyon Ultrafree-4 Centrifuge	-	-
CHO rhIFN $\beta$ -1a Süpernatant	Hi-Trap Blue column Afinite kromatografisi ve gece boyu (g/b) diyaliz	Konsantrasyon Ultrafree-4 Centrifuge	-	16 günlük kültürden 178 $\times$ 10 <sup>9</sup> units/16 L

## 4.2. Sonuç

Tez çalışması kapsamında *T. thermophila*'da Tt-hIFN $\beta$ 'nın rekombinant protein olarak üretiminin başarı ile gösterilmesi, tez çalışmasının amacına gerçekleştirilebileceğini işaret etmektedir. İlaç olarak kullanılacak affinitik takımsız PLA36-Tt-hIFN $\beta$  formlarının üretimi için tasarımlar tamamlanmış, konjugatif *T. thermophila* CU428 ve CU427 hücrelerinin içine halkasal pTtAC2-PLA36-Tt-hIFN $\beta$  vektörü elektroporasyon ile transform edilmiştir ve antibiyotik seleksiyonu ile tek hücre klonları oluşturulmuştur. Isı-şoku indüksiyonu *T. thermophila* CU428/CU427-halkasal pTtAC2-PLA36-Tt-hIFN $\beta$  ırklarında yapılmış ve western blot analizi ile rekombinant protein üretimi gösterilmiştir. Böylelikle, alternatif protein üretim fabrikası *T. thermophila* ile uyumlu vektörel altyapı GMP'ye uygun hale getirilmiştir. Bulgular ve literatür değerlendirmesi, Tt-hIFN $\beta$  takımsız ve Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP-12xHis füzyon proteinlerinin aktif olabileceğini gösterdiğinden dolayı virüs ile enfekte edilmiş *in-vitro* insan hücre kültürü aktivite deneylerinin yapılmasını önermektedir.

## KAYNAKÇA

- 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.
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., ... Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*.
- Antonetti, F., Finocchiaro, O., Mascia, M., Terlizze, M. G., Jaber, A. (2002). A comparison of the biologic activity of two recombinant IFN- $\beta$  preparations used in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of interferon & cytokine research*, 22(12), 1181-1184.
- Arai, R., Ueda, H., Kitayama, A., Kamiya, N., & Nagamune, T. (2001). Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Engineering Design and Selection*, 14(8), 529–532.
- Argamante, B., Tisminetzky, S. G., Gli $\check{v}$ , V., Ljubijanki, G., Skoko, N., Argamante, B., ... Ljubijankić, G. (2003). Expression and characterization of human interferon- $\beta$ -1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38(3), 257–265.
- Asai D. J., Forney J. D. (1999). *Tetrahymena thermophila*, *Methods in Cell Biology*, Vol.62.
- Baynes, J. W. (2002). Linearization, Optimization, Protection Page inserted by evaluation version The Maillard Hypothesis on Aging: Time to Focus on DNA. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 959, 360–367.
- Blackburn, E.H. ve Gall, J.G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Mol Biol*, 120, 33–53
- Bozhinov, A., Handzhiyski, Y., Genov, K., Daskalovska, V., Niwa, T., Ivanov, I., Mironova, R. (2012). Advanced glycation end products contribute to the immunogenicity of IFN- $\beta$  pharmaceuticals. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(3).
- Brownell, J.E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R. ve Edmondson D.G. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, 84, 843–851.
- Brunk, C. F., & Sadler, L. A. (1990). Characterization of the promoter region of *Tetrahymena* genes. *Nucleic acids research*, 18(2), 323-9.

- Calow, J., Behrens, A., Mader, S., Bockau, U., Struwe, W. B., Harvey, D. J., ... Crispin, M. (2016). Antibody production using a ciliate generates unusual antibody glycoforms displaying enhanced cell-killing activity. *MAbs*, 8(8), 1498–1511.
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.-H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A. (1999). Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *The Journal of Immunology*, 163(9), 4647 LP-4650.
- Cassidy-hanley, D., Bowen, J., Lee, J. H., Cole, E., Verplank, L. A., Gaertig, J., Gorovsky, M. A. Bruns, P. J. (1997). Germline and Somatic Transformation of Mating. *Genetics Society of America*, 146, 135–147.
- Chen X, Zaro JL, Shen WC. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, 65(10):1357–1369.
- Clark, T.G., Gao, Y., Gaertig, J., Wang, X. ve Cheng, G. (2001). The I-antigens of *Ichthyophthirius multifiliis* are GPI-anchored proteins. *J. Eukaryot Microbiol.*, 48, 332-337.
- Cowan, G. J., Bockau, U., Eleni-Muus, J., Aldag, I., Samuel, K., Creasey, A. M., ... & Cavanagh, D. R. (2014). A novel malaria vaccine candidate antigen expressed in *Tetrahymena thermophila*. *PloS one*, 9(1), e87198.
- Darnell Jr, J. E., Kerr, I. M., Stark, G. R. (1994). “Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins”, *Science*, 264, 1415–1421.
- De Coninck, J., Verdier-Denantes, I., Duyme, F., Bouquelet, S., Dumortier, V. (2000). Modeling *Tetrahymena thermophila* growth and protease production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 58–61.
- Eisen J.A., Coyne R.S., Wu M. et al. (2006). “Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote”. *PLoS Biol.*, 4, e286.
- Field, A.K. Tytell, A.A. Lampson, G.P. ve Hilleman, M.R. (1967). Inducers of interferon and host resistance, II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58, 1004–1010.
- Gaertig, J., Gorovsky, M. A. (1992). Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89.
- 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, 462–465.
- Gold, P., Rieckmann, P. ve Chang, J. (2005). Abdalla The long-term safety and tolerability of high-dose interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: 4-year data from the PRISMS study. *Eur. J. Neurol.*, 12, 649–656.

- Gorovsky, M. A., Yao, M.C., Keevert, J.B., Pleger G. L. (1975). Isolation of micro- and macronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *Methods Cell Biol* 9(0):311-27
- Greider C. W. ve Blackburn E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337
- Grossberg, S. E., Oger, J., Grossberg, L. D., Gehchan, A. ve Klein, J. P. (2011). Frequency and Magnitude of Interferon  $\beta$  Neutralizing Antibodies in the Evaluation of Interferon  $\beta$  Immunogenicity in Patients with Multiple Sclerosis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31, 337–344
- Haddad, A., Bowman, G. R., & Turkewitz, A. P. (2002). New class of cargo protein in *Tetrahymena thermophila* dense core secretory granules. *Eukaryotic Cell*, 1(4), 583–593.
- Hamilton, E. P., Cassidy-Hanley, D. M., Tang, H., Badger, J. H., Mochizuki, K., Bidwell, S. L., Taverna, S. D., ... Coyne, R. S. (2016). Structure of the germline genome of *Tetrahymena thermophila* and relationship to the massively rearranged somatic genome. *eLife*, 5, 1–46.
- Havell, E. A., Berman, B., Ogburn, C.A., Berg, K., Paucker K. ve Vilcek, J. (1975). Two antigenically distinct species of human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2185–2187.
- Hegen, H., Schleiser, M., Gneiss, C., Di Pauli, F., Ehling, R. ve Kuenz B. (2012). Persistency of neutralizing antibodies depends on titer and interferon-beta preparation. *Mult. Scler.*, 18, 610–615.
- Herrmann, L., Erkelenz, M., Aldag, I., Tiedtke, A., & Hartmann, M. W. (2006). Biochemical and molecular characterisation of *Tetrahymena thermophila* extracellular cysteine proteases. *BMC microbiology*, 6(1), 19.
- Ho, M. (1964). Interferon-like viral inhibitor in rabbits after intravenous administration of endotoxin. *Science*, 146, 1472–1474.
- Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957). Virus Interference: I. The Interferon. *Proc Roy Soc London*, 147:258-267,
- Jacobs, L. D., Cookfair, D. L., Rudick, R. A., Herndon, R. M., Richert, J. R., Salazar, A. M., Simon, J. H. (1995). A phase III trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-remitting multiple sclerosis: design and conduct of study and baseline characteristics of patients. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Multiple Sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England), 1(2), 118–135.
- Kaplan, A., Lee, M. W., Wolf, A. J., Limon, J. J., Becker, C. A., Ding, M., ... Underhill, D. M. (2017). Direct Antimicrobial Activity of IFN- $\beta$ . *The Journal of Immunology*, 198(10), 4036 LP-4045.

- Kappos, L., Polman, C. H., Freedman, M. S., Edan, G., Hartung, H. P. ve Miller, D. H. (2006). Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*, 67, 1242–1249.
- Karpusas, M., Nolte, M., Benton, C. B., Meier, W., Lipscomb, W. N., & Goelz, S. (1997). The crystal structure of human interferon  $\beta$  at 2.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(22), 11813–11818.
- Kiy, T., Tiedtke, A. (1992). Mass cultivation of *Tetrahymena thermophila* yielding high cell densities and short generation times. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 576–579.
- Kiper M. (2013). Biyoteknoloji sektörle inovasyon sistemi kavramlar dünyadan örnekler türkiye’de durum ve çıkarımlar. Afşar Matbaacılık. Yayın no: TTGV-T/2013/001. Ankara.
- Kiy, T., Scheidgen-Kleyboldt, G., Tiedtke, A. (1996). Production of lysosomal enzymes by continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoon *Tetrahymena thermophila* in a perfused bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(4), 268–274.
- Kiy, T., ve Tiedtke, A. (1992). Mass cultivation of *Tetrahymena thermophila* yielding high cell densities and short generation times. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 576–579. <https://doi.org/10.1007/BF00240728>
- Knight Jr, E., Hunkapiller, M. W., Korant, B. D., Hardy, R. W. ve Hood, L. E. (1980). Human fibroblast interferon: amino acid analysis and amino terminal amino acid sequence. *Science*, 207, 525–526
- Kotenko, S. V, Gallagher, G., Baurin, V. V, Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., ... Donnelly, R. P. (2002). IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*, 4, 69.
- Kotenko, S. V., Langer, J. A. (2004). Full house: 12 Receptors for 27 cytokines. *International Immunopharmacology*, 4(5), 593–608.
- Krishna Rao, D. V., Tulasi Ramu, C., Venkateswara Rao, J., Lakshmi Narasu, M., & Bhujanga Rao, A. K. S. (2009). Cloning, high expression and purification of recombinant human intereferon- $\beta$ -1b in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158(1), 140–154.
- Levy-Wilson, B. (1983). Glycosylation, ADP-Ribosylation, and Methylation of *Tetrahymena* Histones. *Biochemistry*, 22(2), 484–489.
- Li, L., Yang, L., & Kotin, R. M. (2005). The DNA minor groove binding agents Hoechst 33258 and 33342 enhance recombinant adeno-associated virus (rAAV) transgene expression. *Journal of Gene Medicine*, 7(4), 420–431.

- Lindahl, P., Gresser, I., Leary, P. ve Tovey, M. (1976). Interferon treatment of mice: enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1284–1287.
- Lindahl, P., Leary, P. ve Gresser, I. (1972) Enhancement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 721–725.
- Madhavan, A., Sukumaran, R. K. (2016). Secreted expression of an active human interferon-beta (HuIFN $\beta$ ) in *Kluyveromyces lactis*. *Engineering in Life Sciences*, 16(4), 379–385.
- Malone, C. D., Anderson, A. M., Motl, J. A., Rexer, C. H., & Chalker, D. L. (2005). Germ Line Transcripts Are Processed by a Dicer-Like Protein That Is Essential for Developmentally Programmed Genome Rearrangements of *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(20), 9151–9164.
- Marieb, E., Katja, H. (2016). *Human Anatomy & Physiology* 10.baskı. A.B.D., Pearson Education, 798
- Mark, D. F., Lu, S.D., Creasey, A.A., Yamamoto, R, Lin, L.S. (1984). Site-Specific Mutagenesis of the Human Fibroblast Interferon Gene. *P Natl Acad Sci-Biol.*,81:5662–5666.
- Maruyama, M., Nishio, T., Yoshida, T., Ishida, C., Ishida, K., Watanabe, Y., ... Takakura, Y. (2004). Simultaneous Detection of DsRed2-Tagged and EGFP-Tagged Human  $\beta$ -Interferons in the Same Single Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93:497–502
- Miao, W., Xiong, J., Bowen, J., Wang, W., Liu, Y., Braguinets, O., Grigull, J., Pearlman, R. E., Orias, E., Gorovsky, M. A. (2009). Microarray analyses of gene expression during the *Tetrahymena thermophila* life cycle. *PLoS ONE*, 4(2).
- Mitsdoerffer, M. ve Kuchroo, V. (2009). New pieces in the puzzle: How does interferon- $\beta$  really work in multiple sclerosis?. *Ann Neurol.*, 65, 487–488.
- Mochizuki, K. (2008). High efficiency transformation of *Tetrahymena* using a codon-optimized neomycin resistance gene. *Gene*, 425(1), 79-83.
- Omoto, C. K., & Johnson, K. A. (1986). Activation of the dynein adenosinetriphosphatase by microtubules. Kinetics of ATP-induced dissociation and re-formation of the microtubule-dynein complex. *Biochemistry*, 25(2), 419-427.
- Panitch, H. S., Hirsch, R. L., Haley, A. S. ve Johnson, K. P. (1987). "Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon" *Lancet*", 1, 893–895
- Paucker, K., Cantell, K., & Henle, W. (1962). Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology*, 17(2), 324–334.

- Pestka S., Krause C. D. Walter M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 202: 8–32.
- Peterson, D. S., Gao, Y., Asokan, K. ve Gaertig J. (2002). The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Mol Biochem Parasitol.*, 122, 119-126.
- Pogulis, R. J., Vallejo, A. N., & Pease, L. R. (1996). In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. *Humana Press.*, 167-176.
- Polman, C. H., Bertolottoa, A. H., Diesenhammer, F., Giovannoni, G. ve Hartung, H. P. (2010). Recommendations for clinical use of data on neutralizing antibodies to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 9, 740–750.
- Rodriguez, J., Spearman, M., Huzel, N., & Butler, M. (2005). Enhanced production of monomeric interferon- $\beta$  by CHO cells through the control of culture conditions. *Biotechnology Progress*, 21, 22–30.
- Rodriguez, J., Spearman, M., Tharmalingam, T., Sunley, K., Lodewyckx, C., Huzel, N., & Butler, M. (2010). High productivity of human recombinant beta-interferon from a low-temperature perfusion culture. *Journal of Biotechnology*, 150(4), 509–518.
- Romanov, V. P., Bezuglov, V. V., Bobrov, M. Y., Kostromina, T. I., Feofanov, S. A., & Miroshnikov, A. I. (2011). Isolation of human interferon  $\beta$ 1b (Ser17) expressed in *E. coli* with the use of ion-exchange chromatography. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 37(3), 292–297.
- Runkel L, Meier W, Pepinsky RB, Karpusas M, Whitty A, Kimball K, Brickelmaier M, Muldowney C, Jones W, Goelz SE. (1998). Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferonbeta (IFN-beta). *Pharm Res* 15: 641-649.
- Salim, H. M., Ring, K. L., & 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.
- Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., ... Klucher, K. M. (2002). IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology*, 4(1), 63–68.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–10.
- Stinebring, W. R., Youngner, J. S. (1964). Patterns of interferon appearance in mice infected with bacteria or bacterial endotoxin. *Nature*, 204, 712.
- Sueltenfuss, E. A. ve Pollard, M. (1963). Cytochemical Assay of Interferon Produced by Duck Hepatitis Virus. *Science*, 139, 595–6.

- Taniguchi, T., Saka M., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, M., Kobayashi, M., Sudo, T. (1979). Construction and identification of a bacterial plasmid containing the human fibroblast interferon gene sequence. *Proc. Jpn. Acad.*, 55B 464–469.
- Teige, I., Treschow, A., Teige, A., Mattsson, R., Navikas, V., Leanderson, T., Holmdahl, R., and Issazadeh-Navikas, S. (2003). IFN-beta gene deletion leads to augmented and chronic demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 170, 4776– 4784.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24(9), 145–149.
- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993). Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*. Apr; 43(4):655-61).
- Tremlett H. L., Yoshida E. M. ve Oger J. (2004). Liver injury associated with the beta-interferons for MS: a comparison between the three products. *Neurology*, 62, 628–631.
- Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, (2004), “Ulusal Bilim Ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesi”
- Velazquez, L., Fellous, M., Stark, G. R. ve Pellegrini, S. A. (1992). Protein tyrosine kinase in the interferon  $\alpha/\beta$  signaling pathway. *Cell*, 70, 313–322.
- Vilcek, J. (2003). Novel interferons. *Nature Immunology*, 4, 8.
- Weide, T., Herrmann, L., Bockau, U., Niebur, N., Aldag, I., Laroy, W., ... ve Hartmann, M. W. (2006). Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. *BMC biotechnology*, 6(1), 19.
- Wheelock, E. F. (1965). Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 149, 310–311.
- Wurm, F. M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology*, 22(11), 1393.
- Uzé, G., Monneron, D. (2007). IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie*, 89(6–7), 729–734.
- Yao, M. C., & 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.
- Yilmaz, G., & 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.
- Young, H. A. (1996). Regulation of interferon-gamma gene expression. J. Interferon Cytokine Res. 16, 563–568.
- 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.
- Zoon, K. C., Smith, M. E., Bridgen, P. J., Anfinsen, C. B., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. (1980). Amino terminal sequence of the major component of human lymphoblastoid interferon. Science, 207, 527–528.



(Clustal Omega, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) Tablo 6.1’de verilmiştir. Vektör içerisinde yer alan ama homolog rekombinasyona girecek genom entegrasyon kasetinin 5’ bölgesinde 1 nükleotid mutasyonu, 3’ bölgesinde ise BssHIII restriksiyon enzimi kesim bölgesinde 4 nükleotidde mutasyon olduğu görüldü. Bu mutasyonlar sarı renkli, orijinaler ise kırmızı renk ile gösterildi (Tablo 6.1). Yani dizi analizinden gelen sonuçlara göre, antibiyotik seçim kaseti, gen ekspresyon kaseti ve homolog rekombinasyonda görev alan dizilerin içerisinde herhangi bir mutasyon tespit edilmedi. pNeo4-TthIFN $\beta$  vektörü KpnI enzimi ile lineer hale getirildikten sonra biyolistik silah yöntemiyle *Tetrahymena* B2086 ırkı hücrelerine transforme edildi (Biyolistik silah yöntemi ve pozitif transformantların seçilimi EK-2 Protokoller’de verilmiştir). Pozitif transformantların seçiminden sonra genomik gDNA ve mRNA kontrolleri gerçekleştirildi

### **Genomik DNA İzolasyonu ve PZR Kontrolleri**

Biyolistik silah ile transformasyon işlemi yapıldıktan ~5 saat sonra hücreler antibiyotik baskısına (antibiyotik olarak, bir neomisin türevi olan paromomisin kullanılmıştır) alınırken aynı zamanda 96 kuyucukla plakalara da her bir kuyucuğa 2, 20 ve 50 pozitif transformant hücre (transformasyon verimliliği %10 olarak değerlendirildiğinde) gelecek şekilde ekim yapılmış ve 30 °C nem çemberinde inkübasyona bırakılmıştır. 3 gün sonra 50 transformant plakasının paromomisin baskısı 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ye çıkartılmıştır. B.S.T.’nin 6. gününde 50 transformant plakasından 12 kuyucuk pozitif, yani canlı hücreler görülmüştür. Bu pozitif kuyulardan birinden 12 kuyulu plakaya paromomisin oranı 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  çıkarılarak ekim yapılmıştır. Daha sonra ikişer günlük inkübasyonları takiben antibiyotik oranı 1000, 2000, 5000, 7000 ve 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  çıkartılmışı ve paromomisin miktarı 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ’ye çekilerek hücreler pasajlanmaya devam edilmiştir. Burada organizmada (bir hücrede) 45 kopya ile temsil edilen her bir MAC kromozomunun pozitif (genom entegrasyon kasetini içine alması) olması amaçlanmıştır. Yaklaşık bir ay süre ile antibiyotik baskısında tutulan hücrelerden gDNA izolasyonu; Wizard® Genomic DNA purification kit (A1120 Promega, ABD) ile bitki dokularından genomik DNA izolasyonu protokolüne göre, birinci adım atlanarak gerçekleştirilmiştir.

*Tetrahymena* genomuna entegre olduğunu düşündüğümüz kasetin olduğu yer MTT1 gen lokusudur. MTT1 gen lokusunda tasarımın dışında kalan yerden yani MTT1 5' bölgesinin *Tetrahymena* orijinal genomunda olan fakat tasarlanan bölgede olmayan diziye **F-MTT1-5'** (5' GATATTTTCATAGATTTTTTAATAAGTAG 3') ileri primeri ve yine aynı şekilde MTT1 orijinal lokusunun 3' bölgesine **G-MTT1-3'** (5' AAGTAAATATCCAAAGATGTTTATGAG 3') dış primerleri tasarlanmıştır. Bu primerler ve genom entegrasyon kasetinin hazırlanması sırasında kullanılan diğer kimerik primerlerle yapılan PZR kontrolleri ise Şekil 6.1-C-1'de gösterilen şemaya göre gerçekleştirilmiştir. Genom entegrasyon kontrolleri için kullanılan F-MTT1-5'/R-MTT1-3' dış primerleriyle beklenen büyüklük olan 5059 bp büyüklüğünde bant elde edilememiş, kimerik primerler kullanılarak yapılan PZR kontrollerinde beklenen büyüklüklerde bantlar elde edilmiştir (Şekil 6.1-C-2).

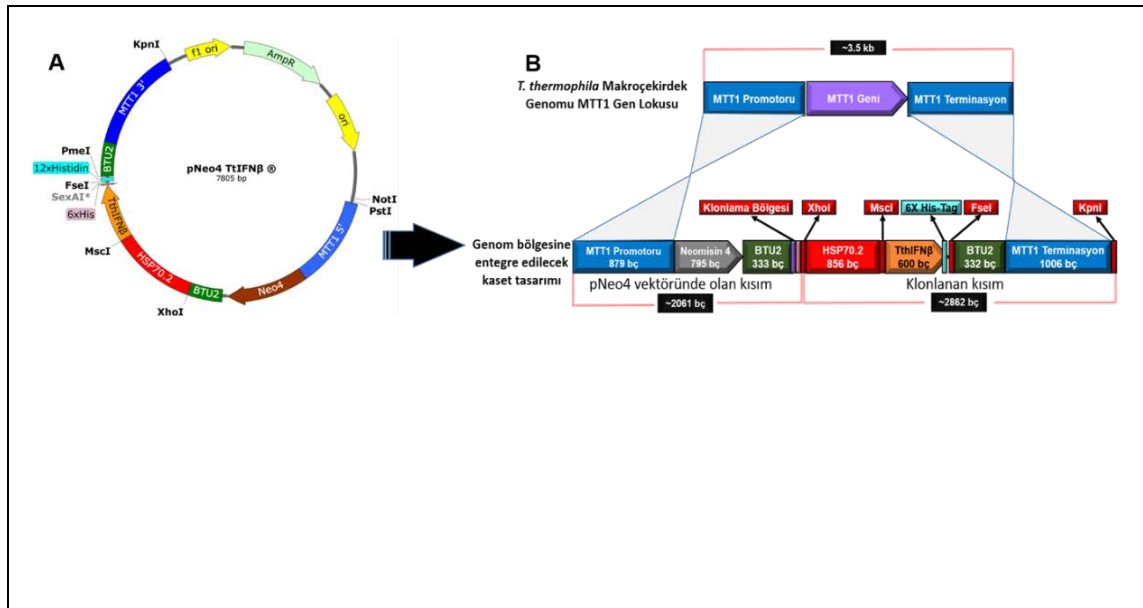
### **İndükleme Sonrası Toplam RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve PZR Kontrolleri**

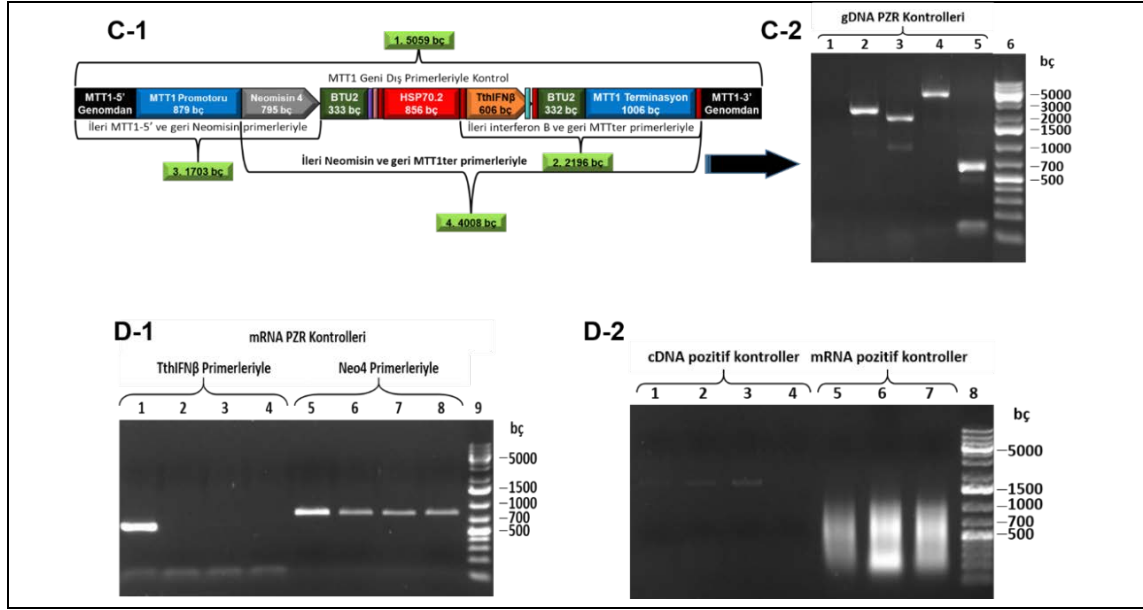
mRNA kontrolleri için deney grubu olarak: B2086-TthIFN $\beta$  hücreleri 38 °C su banyosunda ~4 saat boyunca inkübe edilerek indüklenmiştir (indüklemelerde "i+" kısaltması kullanılmaktadır). İndüklenmemiş negatif kontrol olarak: B2086-TthIFN $\beta$  ((indüklenmemiş örnekler için "i-"kısaltması kullanılmaktadır) 30 °C etüvde çalkalamasız bir şekilde ~4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Transform edilmemiş B2086 (i+) hücreler ise ikincil negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Transform edilmemiş bu B2086 (i+) hücreler ise 38 °C su banyosunda ~4 saat boyunca inkübe edilerek indüklenmiştir. Her üç grup için de ~20 milyon hücreden elde edilen pelet, RNA izolasyonunda kullanılmıştır. RNA izolasyonu Trizol ile gerçekleştirilmiştir (Ek-3 Protokoller - TRI ile RNA İzolasyonu).

Toplam RNA'dan mRNA izolasyonu polyA Purist-MAG magnetic mRNA saflaştırma kiti (Cat# AM1922, AMBION) ile gerçekleştirilmiştir. Bu izolasyonun mantığı işlendikten sonra olgun hale gelen mRNA'ların uçlarında bulunan 16-18 bazlık Adenin bölgesinden yararlanılarak manyetik takılı Timin nükleotidinin kullanılmasıdır. Bu şekilde toplam RNA havuzunda ~%5 oranında bulunan mRNA'lar izole edilir. İşlemler kitin protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. mRNA'dan cDNA sentezi için RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (Fermentas, K1622) kullanılmıştır. cDNA sentezinde ~2,5  $\mu$ g mRNA kullanılmıştır.

Deney yaptığımız hücrelerin genomunda, entegre edilen DNA bölgelerinin var olduğunu gDNA ile gösterdikten sonra, bu ilgili bölgelerden mRNA üretilip üretilmediğini kontrol etmek için elde edilen mRNA'ların cDNA'ları PZR'da kalıp olarak kullanılmıştır. Hem interferon hem de neomisin direnç genine özgü primerler kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiş ve ilgili büyüklükleri üretilip üretilmediğine bakılmıştır. Bu deney için PrimeStar DNA polimeraz (#R010A, TAKARA) kullanılmıştır. Kalıp cDNA'lar 1/10 oranında seyreltilmiş ve 30 µL hacmindeki reaksiyon için 2 µL kalıp kullanılmıştır.

Elde edilen mRNA'lar ise, *Tetrahymena thermophila* katalaz genine özgü primerler ile ve mRNA'ların agaroz jele 5'er µL direk yüklenmesi ile kontrol edilmiştir. İnterferon β gen spesifik primerleriyle 1. kuyuda ısı-şoku ile indüklenmiş B2086-TtIFNβ hattıyla yapılan cDNA kontrolünde beklenildiği gibi 606 bp hizasında bir bant vermiş, indüklenmemiş ve negatif kontrol hücrelerinde ise bant elde edilememiştir (Şekil 6.1.D-1). Bu veriler ışığında kullanılan HSP70 promotorunun ısı-şoku ile indüklenerek, mRNA ürettiği bulgusuna varılmıştır. Neomisine özgün primerler ile yapılan kontrolde de benzer bir bulguya rastlanmıştır, indüklenmemiş, negatif kontrol ve kalıpsız PZR kontrollerinde görülen zayıf bantlar ise primer kontaminasyonu işaret etmektedir. Elde edilen cDNA'ların hepsinde de katalaz genine ait cDNA'ların olduğu görülmüştür (Şekil 6.1.D-2).





**Şekil 6.1. İndüklenmesi ısı-şoku promotörü ile gerçekleştirilecek olan Tt-hIFN $\beta$  ekspresyon kasetinin *Tetrahymena* Genomuna Entegrasyonu, gDNA, mRNA ve protein üretimi, saflaştırılması ve western blot analizleri. A) Genom entegrasyonu için oluşturulan vektör çizimi (SnapGene programı GSL Biotech; snapgene.com). B) Oluşturulacak Genom Entegrasyon Kaseti. *T. thermophila* makroçekirdek genomuna homolog rekombinasyon (dizi-dizi benzerliği) ile MTT1 promotörü, Neomisin dirençlilik geni, BTU2 sonlandırma dizisi HSP70 (HSP70-2 geninden alınmıştır, TTherm 00125640, Yu vd., 2011) promotörü, İnterferon  $\beta$ , ve MTT1 terminasyon dizilerini içeren gen hedefleme ve yer değiştirme kaset yapısı. C-1) B2086-TtIFN $\beta$  gDNA kontrollerinde kullanılan kimerik primerlerin şematik gösterimleri C-2) B2086-TtIFN $\beta$  gDNA kontrolü: 1. kuyu i-MTT-5' ve g-MTT-3' primerleriyle PZR, 2. kuyu F- TtIFN $\beta$  -MscI ve R-MTT1ter' primerleriyle PZR. 3. kuyu F-MTT1-5' ve F-Neo4 primerleriyle PZR, 4. kuyu F-Neo4 ve R-MTT1ter primerleriyle PZR. 5. kuyu i- TtIFN $\beta$  -MscI ve g- TtIFN $\beta$  -FseI primerleriyle PZR. 6.-10. kuyular farklı bir klona ait sonuçlar. 11. kuyu F-TtIFN $\beta$  -MscI ve R-TtIFN $\beta$ -FseI primerleriyle kalıpsız PZR kontrolü. 12. kuyu markör: GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo, SM0313) D-1) Genoma entegrasyon hatlarının mRNA (cDNA) üretebilme analizi: 1-4. kuyular interferon primerleriyle PZR 1. kuyu 38°C'de indüklenmiş TtIFN $\beta$  2. kuyu 38°C'de indüklenmemiş TtIFN $\beta$ , 3. kuyu 38°C'de indüklenmiş B2086 negatif kontrol hücreleri. 4. kuyu kalıpsız PZR kontrolü. 5-8. kuyular neomisin primerleriyle PZR. 5. kuyu 38°C'de indüklenmiş TtIFN $\beta$  6. kuyu 38°C'de indüklenmemiş TtIFN $\beta$ , 7. kuyu 38°C'de indüklenmiş B2086 negatif kontrol hücreleri. 8. kuyu kalıpsız PZR kontrolü. 9. kuyu markör. D-2) Genoma entegrasyon hatlarında katalaz geninin mRNA (cDNA) ifade analizi: 1-4. kuyular katalaz primerleriyle PZR. 5-7. kuyular mRNA'nın agaroz jel kontrolleri. 1. kuyu B2086-TtIFN $\beta$  (+) cDNA. 2. kuyu B2086-TtIFN $\beta$  (-) cDNA. 3. kuyu B2086 (+) cDNA. 4. kuyu PZR kontrolü (kalıpsız) bant yok. 5. kuyu B2086-TtIFN $\beta$  (+) mRNA. 6. kuyu B2086-TtIFN $\beta$  (-) mRNA. 7. kuyu B2086 (+) mRNA. 8. kuyu markör: GeneRuler 1 kb plus DNA ladder (Thermo, SM1331)**

### SDS-PAGE Jel Elektroföresi, Ni-NTA Saflaştırması ve Western Blot Analizleri

Ek-2'deki (Bütün protein çalışmaları için kullanılan genel protokoller Ek-2'de verilmiştir.) protokollere göre protein izolasyonu ve Ni-NTA saflaştırması yapılmıştır (protein izolasyonunda kullanılan T100-B liziz tamponundaki NaCl oranı 300 mM). Biri interferon  $\beta$  antikoru ile, diğeri ise 6X histidin antikoru ile muamele edilmek üzere iki SDS-PAGE jeli dökülmüştür. Saflaştırılan örneklerden SDS-PAGE jelinde yürütüldükten

sonra western blot analizi ve devam edilmiştir. Western blot deneyinde blotlama işlemi Turbo-Blot (BIO-RAD) cihazında 25V, 1.0A, 30' olarak ayarlanmıştır. Bloklama gece boyu 4 °C'de hafif çalkalamalı tablada % 5 süt tozu içeren TBS-T ile yapılmıştır. Birincil antikor ile muamele; anti-interferon  $\beta$  rabbit poliklonal (IFN $\beta$ , FL-187 Santa Cruz) 1:2000 oranında gece boyu 4 °C'de hafif çalkalamalı tablada % 5 süt tozu içeren TBS-T ile yapılmıştır. İkincil antikor olarak goat anti rabbit (A00098 GenScript), 1:10000 oranında oda ısısında 4 saat hafif çalkalamalı tablada % 5 süt tozu içeren TBS-T ile yapılmıştır. Görüntüleme işlemi TMB ile gerçekleştirilmiştir.

### **30°C Büyütülmüş Hücrelerin 38°C indüklenerek mRNA sentezi ve yeniden 30°C'ye alınarak mRNA'lardan Protein Ürettirilmesi (Recovery ile Üretme) (Yu vd., 2012)**

**30 °C'de Hücrelerin Büyütülmesi:** Hücreler NEFF besiyerinde büyütülmüş ve sayısı ~1.500.000 hücre/ml, ~100 ml kültür kullanılmıştır. 10 ml örnek 1500 g'de 5 dk. santrifüjlenerek toplam protein ve dış ortam için örnekler elde edilmiştir.

**38 °C'de Hücrelerin İndüklenmesi:**~85 ml hücre kültürü peletlenerek 38 °C su banyosunda ısıtılan 120 mL besiyeriyle yeniden çözülmüş ve ~1saat 38 °C' su banyosunda inkübe edilerek süre sonunda toplam protein ve dış ortam için 10 mL hücre kültüründen örnekler alınmıştır.

**30 °C'ye Alınan Hücrelere Protein Ürettirilmesi:** ~1saat 38 °C' su banyosunda inkübe edildikten sonra ~105 ml hücre kültürü, 30 °C', 120 rpm çalkalamalı etüve alınarak sıcaklığın 30 °C'ye geldikten 15 dk., 30 dk., 1 saat, 3 saat, 6 saat ve 24 saat sonra 10'ar mL 'den toplam protein ve dış ortam, 5'er mL'den de RNA için örnekler alınmıştır.

**Protein İzolasyonu:** Toplam protein izolasyonu için elde edilen peletler liziz tamponu ile çözülmüş ve 10' buzda ara ara vortekslenerek inkübe edilmiştir. Hücrelerin parçalanması için protein peletlerinin üzerine göz kararı bir miktar (çeyrek kaşık) 0,2 mm'lik çelik bilyelerden konularak 8 devirde 4' Bullet Blender ile muamele edilmiştir. Sonra hücreler buza alınarak 10 dk. inkübe edilmiş, ~20 dk. +4 °C soğutmalı santrifüjde 13000 g'de santrifüjlenerek süpernatantlar "Çözünür Toplam Protein" olarak kullanılmıştır.

**Ni-NTA Agaroz tanecikleri ile "Batch Tip" Saflaştırma:** Dış ortamlar için 1'er ml, toplam proteinler için 500'er ul Ni-NTA agaroz kullanılmıştır. Uygun miktarlardaki agaroz 500 g'de 5 dk. süre ile santrifüjlenerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Dengeleme için

~7-8 katı D-dengeleme tamponu (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0 NaOH ile) ile yeniden çözülerek 500 g'de 5 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmış, üzerine ilgili proteinler konularak 1 saat oda ısısında hafif çalkalamalı tablada inkübe edilmiştir. Örnekler ~7-8 kat yıkama tamponu (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole. pH 8.0 NaOH ile) ile 2 kez yıkanmış ve ~300 µl elüsyon tamponu (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole. pH 8.0 NaOH ile) yerine 2x SDS-PAGE yükleme tamponu ile çözülen örnekler, 2 dk. oda ısısında inkübe edilmiş ve santrifüjlenerek süpernatantlar analizde kullanılmıştır.

**SDS-PAGE ve Western Blot:** Elde edilen örnekler 10'ar ul + 2'şer µL 6X yükleme tamponu ile jellere yüklenmiştir.

Protein çalışmalarındaki tüm örnekler yaklaşık 8-10 milyon hücre pelletinden elde edilerek protein izolasyonları gerçekleştirilmiştir. T100-B Liziz tamponunun içeriği 300 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-Hcl pH 7.5, %1 Triton X-100, 2mM PMSF, 1xPIC (Protease Inhibitor Coctail, -Roche). şeklinde hazırlanmış ve her bir örnek için ~1-1,2 mL liziz tamponu kullanılmıştır. Protein örnekleri, izolasyon ve Ni-NTA saflaştırmasından sonra çözücü olarak 2x yükleme tamponu ile çözülmüştür. SDS-PAGE jeli %12 klasik yöntemle hazırlanmıştır. Toplam protein ve toplam proteinden yapılan Ni-NTA afinitik saflaştırmaları hem SDS-PAGE jelinde koşturulmuş hem de western blotlamayla analiz edilmiştir. Özellikle 38°C'de indüklenen deney grubunda 20-22,5 kDa büyüklüğünde beklenen interferon β'nın doğal monomer formu veya dimer, trimer, tetramer gibi formları , negatif kontrol, pozitif kontrol ve indüklenmemiş deney grubu ile karşılaştırıldığında bu büyüklüklerde bir protein bandı görülmemiştir (Datalar sunulmamıştır).

**Tablo 6.1. pNeo4-TtIFNβ vektörü dizi analizi sonucunun CLUSTAL O (1.2.1) ile dikey hizalaması**

Dizi_analizinden	GCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT
Bizim_verdigimiz	GCCTTCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGT *****
Dizi_analizinden	TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
Bizim_verdigimiz	TGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT *****
Dizi_analizinden	TTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGG
Bizim_verdigimiz	TTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGG *****
Dizi_analizinden	TATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGA
Bizim_verdigimiz	TATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGA *****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	ATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA ATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGA GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA CAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACA CTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATTAACCTGGCGAACTACTTA CCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATTAACCTGGCGAACTACTTA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCAC CTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCAC *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC TTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGC *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG GTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT TAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTT *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	AGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA AGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	ATCTCATGACCAAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG ATCTCATGACCAAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGTGCAA AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGTGCAA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CAAAAAACCACCGTACCAGCGTGGTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT CAAAAAACCACCGTACCAGCGTGGTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGGTAGC TTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGGTAGC *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGTAA CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGTAA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAA TCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGC GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGC *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA *****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAA GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGC CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGC *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCC GGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCC *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTG TATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTG CTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGG AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	AAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAAT AAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAAT *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	GCAGCTGGCAGCACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG GCAGCTGGCAGCACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGT TGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGT *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TGTGTGGAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG TGTGTGGAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CCAAGCTCGAAATTAACCCCTACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCG CCAAGCTCGAAATTAACCCCTACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	GCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATACAATTTATTCTA GCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATACAATTTATTCTA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	AAAAATATTTAAAAATAAAAAATAAAGGGTTTGAATAACTCCTTAAATTTAAATACA AAAAATATTTAAAAATAAAAAATAAAGGGTTTGAATAACTCCTTAAATTTAAATACA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	CATTTTAAATTTTTTTAGCTCTTAAATATTCATAAAAAATAAAAAATAACTAATAA CATTTTAAATTTTTTTAGCTCTTAAATATTCATAAAAAATAAAAAATAACTAATAA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	AATAAATAAAAAGATAATAATGATTAAGGTATAATACTGAATAAGAAAAACATAATAG AATAAATAAAAAGATAATAATGATTAAGGTATAATACTGAATAAGAAAAACATAATAG *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	AGTACTTATTTTTTATACACTATTTTTAATATCTTGAAAGCAAACTTTTTTATATATC AGTACTTATTTTTTATACACTATTTTTAATATCTTGAAAGCAAACTTTTTTATATATC *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TTAAATATATTTGATCGTTTATTCAATTATTTCTTTAAATTTCAATATATTGATAAA TTAAATATATTTGATCGTTTATTCAATTATTTCTTTAAATTTCAATATATTGATAAA *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	AAAGATGACATGTTTTTAAAGAAAACATGAAATATAAAATAGATAAATATCAATTATTT AAAGATGACATGTTTTTAAAGAAAACATGAAATATAAAATAGATAAATATCAATTATTT *****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz	TATTTATTAATATATAAGCTGCTCAAACATAGCTCATTATCAATTATAATATGTGAA TATTTATTAATATATAAGCTGCTCAAACATAGCTCATTATCAATTATAATATGTGAA *****

```

*****
Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz TCATTAATTTTCAAATATTACTCATTATTTAGGCTATCATTATTTTATTTTCAATT
TCATTAATTTTCAAATATTACTCATTATTTAGGCTATCATTATTTTATTTTCAATT
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz ATCCGTTTCTATTATATTTTAAATTAAGTTGTGATTCTTGAATTTTGTGTCATGAATTA
ATCCGTTTCTATTATATTTTAAATTAAGTTGTGATTCTTGAATTTTGTGTCATGAATTA
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz TTTGTAAATCTTTTTATTTCTGATAAAAAATATAAATGATTGACTCATGATTTAAATCA
TTTGTAAATCTTTTTATTTCTGATAAAAAATATAAATGATTGACTCATGATTTAAATCA
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz TGAGTCAACCTAACTAATTTTCAAATCTTCTATTCTAAAATATAGATGTGATTCTTGA
TGAGTCAACCTAACTAATTTTCAAATCTTCTATTCTAAAATATAGATGTGATTCTTGA
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz ATCTCTCTTGAATATAAAGTAATTTTATATTTCTGATATAAATCTTAGCTACGTGATT
ATCTCTCTTGAATATAAAGTAATTTTATATTTCTGATATAAATCTTAGCTACGTGATT
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz CACGATTTATACAATGATCCATATAAAAATAATGTAAGTAGTGTATATATATATATTCTGTC
CACGATTTATACAATGATCCATATAAAAATAATGTAAGTAGTGTATATATATATATTCTGTC
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz TTTTTTATTCTTTATATAAATTTAAAAAATTTAAAAAATTTAATAAAGCTCTAATAAAAT
TTTTTTATTCTTTATATAAATTTAAAAAATTTAAAAAATTTAATAAAGCTCTAATAAAAT
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz AAATAATAACTAACTTAAATAATGATTGAACAAGATGGTTTACACCGTGGTTCTCC
AAATAATAACTAACTTAAATAATGATTGAACAAGATGGTTTACACCGTGGTTCTCC
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz CGCCGCTTGGGTCGAAAGACTTTTCGGTTATGACTGGGCTCAACAAACCATCGGTTGCTC
CGCCGCTTGGGTCGAAAGACTTTTCGGTTATGACTGGGCTCAACAAACCATCGGTTGCTC
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz TGATGCCCGCTCTTCCGCTTTCTGCTCAAGGTCGTCCTGTTCTTTTCGTCGAAAGCCGA
TGATGCCCGCTCTTCCGCTTTCTGCTCAAGGTCGTCCTGTTCTTTTCGTCGAAAGCCGA
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz CCTTTCTGGTGCCCTTAATGAACCTCAAGATGAAGCTGCCCGTCTTTCTTGGCTTGCCAC
CCTTTCTGGTGCCCTTAATGAACCTCAAGATGAAGCTGCCCGTCTTTCTTGGCTTGCCAC
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz CACCGGTGTTCTTGCCTGCTGCTCCTTGACGTTGTCACTGAAGCCGGTAGAGACTGGCT
CACCGGTGTTCTTGCCTGCTGCTCCTTGACGTTGTCACTGAAGCCGGTAGAGACTGGCT
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz TCTTTTAGGTGAAGTCCCCGGTCAAGATCTTCTTTCTTCTCACCTTGCTCCTGCCGAAAA
TCTTTTAGGTGAAGTCCCCGGTCAAGATCTTCTTTCTTCTCACCTTGCTCCTGCCGAAAA
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz AGTTTCTATCATGGCTGATGCTATGCGTCGCTTTCATACCCCTTGATCCCCTACCTGCC
AGTTTCTATCATGGCTGATGCTATGCGTCGCTTTCATACCCCTTGATCCCCTACCTGCC
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz TTTCGACCACCAAGCCAAACATCGTATCGAACGTGCTCGTACTCGTATGGAAGCCGGTCT
TTTCGACCACCAAGCCAAACATCGTATCGAACGTGCTCGTACTCGTATGGAAGCCGGTCT
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz TGTGATCAAGATGATCTTGACGAAGAACATCAAGGCTTGGCCCTGCCGAACCTTTTCGC
TGTGATCAAGATGATCTTGACGAAGAACATCAAGGCTTGGCCCTGCCGAACCTTTTCGC
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz CAGACTTAAGGCCCGTATGCCGACGGTGAAGATCTTGTGCTCACCCATGGTGTGCTG
CAGACTTAAGGCCCGTATGCCGACGGTGAAGATCTTGTGCTCACCCATGGTGTGCTG
*****

Dizi_analizinden Bizim_verdigimiz CTTACCCAATATCATGGTTGAAAATGGTCGTTTTTCTGGTTTCATCGACTGTGGTCGCT
CTTACCCAATATCATGGTTGAAAATGGTCGTTTTTCTGGTTTCATCGACTGTGGTCGCT
*****

Dizi_analizinden TGGTGTGCGCCGACCGTTATCAAGATATTGCCTTAGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAACT

```

Bizim\_verdigimiz TGGTGTGCGCCGACCGTTATCAAGATATTGCCTTAGCTACCGTGATATTGCTGAAGAAGT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden TGGTGGTGAATGGGCTGACCGTTTCCTTGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCTCA  
Bizim\_verdigimiz TGGTGGTGAATGGGCTGACCGTTTCCTTGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCTCA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden ACGTATCGCCTTCTATCGTCTTCTTGACGAATCTTCTGAGATCCTTAAATTAATAATTC  
Bizim\_verdigimiz ACGTATCGCCTTCTATCGTCTTCTTGACGAATCTTCTGAGATCCTTAAATTAATAATTC  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden AATATATATTACAACTTTTCATATAAAATAAATATATTATATAAAATTAATTTTGTAGT  
Bizim\_verdigimiz AATATATATTACAACTTTTCATATAAAATAAATATATTATATAAAATTAATTTTGTAGT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden TATTATATTAACATTAAAGCACCAAAAAACGTGTTAATACTACTATAAAATATAATT  
Bizim\_verdigimiz TATTATATTAACATTAAAGCACCAAAAAACGTGTTAATACTACTATAAAATATAATT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden TATTCCAAATGACTAAAATCATTATTTTACAACCTATTGTATATATATTTATGTCAA  
Bizim\_verdigimiz TATTCCAAATGACTAAAATCATTATTTTACAACCTATTGTATATATATTTATGTCAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden TTATTTTTTTAACTTTCTAAAAAATAAATCCTCTTACATACATGTTAGCTCTTAA  
Bizim\_verdigimiz TTATTTTTTTAACTTTCTAAAAAATAAATCCTCTTACATACATGTTAGCTCTTAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden AATTTGTCTGCAAATCCAATAATAATTTTTTTTTGCCATTAAATTTTCAAATTTTAC  
Bizim\_verdigimiz AATTTGTCTGCAAATCCAATAATAATTTTTTTTTGCCATTAAATTTTCAAATTTTAC  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden TGGAAAAATGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCATCAAGCTTATCGATAC  
Bizim\_verdigimiz TGGAAAAATGCAGCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCATCAAGCTTATCGATAC  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden CGTCGACCTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATAAATTTGAAAATAA  
Bizim\_verdigimiz CGTCGACCTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATAAATTTGAAAATAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden CTAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTGTCAGATATTTAGCTATGTAATTTGCAA  
Bizim\_verdigimiz CTAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTGTCAGATATTTAGCTATGTAATTTGCAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden GCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAATATTATTATATAATTA  
Bizim\_verdigimiz GCAATATTTGTTTACAAAACATGAATTAATAAACTAAAAATATTATTATATAATTA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden AAAAGGAACCTTTAAACAAAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTTTACTTT  
Bizim\_verdigimiz AAAAGGAACCTTTAAACAAAATATCTTAATTTCTATATTAATTTATTAATTTTACTTT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden AAAGAAAAAGAGAAAACCTTCAAATCAAATTAATTTTAAATAGAAGTTTTTAACTATCTA  
Bizim\_verdigimiz AAAGAAAAAGAGAAAACCTTCAAATCAAATTAATTTTAAATAGAAGTTTTTAACTATCTA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden AATAGTAATAATGTTATATTTGAATAATATAAAATTTATCAATAAATAAATACATTTAG  
Bizim\_verdigimiz AATAGTAATAATGTTATATTTGAATAATATAAAATTTATCAATAAATAAATACATTTAG  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden CAAAATATTTATTTTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTATAGCTAATTTTTA  
Bizim\_verdigimiz CAAAATATTTATTTTATATTTCTGCTGATAATTAAGTGAGTGTATAGCTAATTTTTA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden ATTTTAAATATTTTAAAAAATTTGGTTGTTGGTTTGTGATAGATAATTAATTTATTT  
Bizim\_verdigimiz ATTTTAAATATTTTAAAAAATTTGGTTGTTGGTTTGTGATAGATAATTAATTTATTT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden GTAAGTTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAACTTTCTAAAATTAATAATAAGATTTT  
Bizim\_verdigimiz GTAAGTTTTAGTTTATAATCAATTTTTTTTAACTTTCTAAAATTAATAATAAGATTTT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden TAATCTTTCCTTTTTCTTATTGCTATTAAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAA  
Bizim\_verdigimiz TAATCTTTCCTTTTTCTTATTGCTATTAAATAATCAATTTATTCATAAAGGATATTTAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AATTTAGAAACAATTTACTGATTTCTAAAAATCTTTTGTATTAAAAATACACTTCAA  
AATTTAGAAACAATTTACTGATTTCTAAAAATCTTTTGTATTAAAAATACACTTCAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TTAAAAAATAAAATTTCCAACAATCTATCAGAAATTTTTCGCTTTAAACAGCTAA  
TTAAAAAATAAAATTTCCAACAATCTATCAGAAATTTTTCGCTTTAAACAGCTAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AAAGAAATTTGATCAAAAATAAATAATCAATTAATCAAAAAACAAAAAACACTCTC  
AAAGAAATTTGATCAAAAATAAATAATCAATTAATCAAAAAACAAAAAACACTCTC  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AACAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAAACAATAATTA AAAAAGTTTACAAAATGGCAA  
AACAAAAATCTTCAAAAAGCGACTCAAACAATAATTA AAAAAGTTTACAAAATGGCAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TGACTAACAAATGCTTATTACAAATGCTTTATTATTATGCTTCTCTACTACTGCTTAT  
TGACTAACAAATGCTTATTACAAATGCTTTATTATTATGCTTCTCTACTACTGCTTAT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz CTATGCTTACAACCTATTAGGTTTCTTACAAGATCTTCTAACTCCAATGCCAAAAAT  
CTATGCTTACAACCTATTAGGTTTCTTACAAGATCTTCTAACTCCAATGCCAAAAAT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TATTATGGCAATTAACGGTAGATTAGAATACTGCTTAAAAGACAGAATGAACCTCGACA  
TATTATGGCAATTAACGGTAGATTAGAATACTGCTTAAAAGACAGAATGAACCTCGACA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TTCCTGAAGAAATTAACAATTAACAACAATCCA AAAAGAAGACGCTGCTTTAACTATT  
TTCCTGAAGAAATTAACAATTAACAACAATCCA AAAAGAAGACGCTGCTTTAACTATT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz ACGAAATGTTACAAAACATTTTAGCTATTTTCAGACAAGACTCTTCTTCTACTGGTTGGA  
ACGAAATGTTACAAAACATTTTAGCTATTTTCAGACAAGACTCTTCTTCTACTGGTTGGA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz ACGAACTATTGTTGAAAACCTATTAGCTAACGTTTACCACCAAATTAACCACTTAAAA  
ACGAACTATTGTTGAAAACCTATTAGCTAACGTTTACCACCAAATTAACCACTTAAAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz CTGTTT TAGAAGAAAATTAGAAAAGAAGACTTCACTAGAGA AAAATTAATGTCTTCTT  
CTGTTT TAGAAGAAAATTAGAAAAGAAGACTTCACTAGAGA AAAATTAATGTCTTCTT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TACACTTAAAAGATACTACGGTAGAATTTTACACTACTTAAAAGCTAAAAGAATACTCTC  
TACACTTAAAAGATACTACGGTAGAATTTTACACTACTTAAAAGCTAAAAGAATACTCTC  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz ACTGCGCTTGGACTATTGTTAGAGTTGAAATTTAAGAACTTCTACTTCATTAACAGAT  
ACTGCGCTTGGACTATTGTTAGAGTTGAAATTTAAGAACTTCTACTTCATTAACAGAT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TAACTGGTACTTAAGAAAC CACCACCACCACCACC TGATGACCTGGTGGCCGGCC  
TAACTGGTACTTAAGAAAC CACCACCACCACCACC TGATGACCTGGTGGCCGGCC  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz ACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC TGATGACTTTAAACGATCCTTAAAT  
ACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC TGATGACTTTAAACGATCCTTAAAT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TAAAAATCAATATATATTTACAACTTTCATATAAAAATAAATATATATATAAAAATTA  
TAAAAATCAATATATATTTACAACTTTCATATAAAAATAAATATATATATAAAAATTA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TTTT TAGTGATTATATTAACATTAAGCACCAAAAAACGTTTAAATATACTACTATAA  
TTTT TAGTGATTATATTAACATTAAGCACCAAAAAACGTTTAAATATACTACTATAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AATATAATTTATCCAATGACTAAAATCATTTATTTTACAACCTATTTGTATATATATT  
AATATAATTTATCCAATGACTAAAATCATTTATTTTACAACCTATTTGTATATATATT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TTATGTCAATTTATTTTAACTTCTAAAAAATAATCCTCTTCACATACATGTTA  
TTATGTCAATTTATTTTAACTTCTAAAAAATAATCCTCTTCACATACATGTTA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz GCTCTTAAAAATTTGTCTGCAAATCCAATAATAATATTTTTTTTTTGGCATTAAATTTTCA  
GCTCTTAAAAATTTGTCTGCAAATCCAATAATAATATTTTTTTTTTGGCATTAAATTTTCA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AATTTTACTGGAAAAATGCA GTACTGGTACTGGAGAAGGATGCAAATGTACAAGTTGCT  
AATTTTACTGGAAAAATGCA GTACTGGTACTGGAGAAGGATGCAAATGTACAAGTTGCT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AATGCTGCAACCTGTTTAATAAGGATGTTGTGTGGTGATAAAGCTAAGGCTTGCTGTA  
AATGCTGCAACCTGTTTAATAAGGATGTTGTGTGGTGATAAAGCTAAGGCTTGCTGTA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz CTGATCCAAACAGTGGATGTTGCTGCTCAAATAAGGCAAATAAATGCTGTGATGCTACTT  
CTGATCCAAACAGTGGATGTTGCTGCTCAAATAAGGCAAATAAATGCTGTGATGCTACTT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz CAAAGCAAGAGTGTAGACTTGTAAATGTTGTAATGAAATAAATATGTTAATTAAAT  
CAAAGCAAGAGTGTAGACTTGTAAATGTTGTAATGAAATAAATATGTTAATTAAAT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TAAAATATGTTGATGTTGTAATTCATAATGCATAAAATCAGTTTCGTATTTTATTA  
TAAAATATGTTGATGTTGTAATTCATAATGCATAAAATCAGTTTCGTATTTTATTA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz ACTTTAATATATCATCCTAAAATTTATTAAAAAAACTGTTATTAATAAATCAATAATT  
ACTTTAATATATCATCCTAAAATTTATTAAAAAAACTGTTATTAATAAATCAATAATT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz ATCGCTATTTTCATAGATTTTTTAAATGCAAAAGCAAGTATGTTATTTAAATTAAGTAA  
ATCGCTATTTTCATAGATTTTTTAAATGCAAAAGCAAGTATGTTATTTAAATTAAGTAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz CATTGATTGAAAGTATTATCTACAGAAAAAAAATATATAATTTACTTTTTAATCAATT  
CATTGATTGAAAGTATTATCTACAGAAAAAAAATATATAATTTACTTTTTAATCAATT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TAATTGAAATATTTTTATATTTTTTAAAAATGAAAAACATATATATTTATAATAAACA  
TAATTGAAATATTTTTATATTTTTTAAAAATGAAAAACATATATATTTATAATAAACA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TTCAAATTTATTTTACAAAATTTATATAAAAAATCTTTAATAATTACAATTAATTGAATTC  
TTCAAATTTATTTTACAAAATTTATATAAAAAATCTTTAATAATTACAATTAATTGAATTC  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AATCTGTAATATAAAAATTACACCATACATTTATATTAACAATGACTACTTTTAGAAAA  
AATCTGTAATATAAAAATTACACCATACATTTATATTAACAATGACTACTTTTAGAAAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AATTTAAAAAAAATAAATTAATGTTTATTTTAAATTTTGGTAAAAATACTCAACTTAT  
AATTTAAAAAAAATAAATTAATGTTTATTTTAAATTTTGGTAAAAATACTCAACTTAT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TTGAATTTAGAAAATGTAATAAATCAATAAATATTTTAAATTTAATGAAAAAGTTTTTTG  
TTGAATTTAGAAAATGTAATAAATCAATAAATATTTTAAATTTAATGAAAAAGTTTTTTG  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AATTAGTAAATATTATCAACTAAAAACAACTGAAAAACCATATTTGGTAATTATTACT  
AATTAGTAAATATTATCAACTAAAAACAACTGAAAAACCATATTTGGTAATTATTACT  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TTGCATAAAGAAATTTAATAATGTAATGAAATGAATATCTCTAAAAATTTATATAAAA  
TTGCATAAAGAAATTTAATAATGTAATGAAATGAATATCTCTAAAAATTTATATAAAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz ATATCAATTTAAGCTAATTGTCAATTAATAAATGCTAAAAATGAAAATAAATCTAAATAA  
ATATCAATTTAAGCTAATTGTCAATTAATAAATGCTAAAAATGAAAATAAATCTAAATAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz AAAAAATCTATGTTTCATATTTGCATAAAAATAAATGTTTGTGTCAGTTTTAGTTGCAA  
AAAAATCTATGTTTCATATTTGCATAAAAATAAATGTTTGTGTCAGTTTTAGTTGCAA  
\*\*\*\*\*

Dizi\_analizinden Bizim\_verdigimiz TTAAACGGTACCAATTTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACCGAATTCACTGGCCGTCG  
TTAAACGGTACCAATTTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACCGCGCTCACTGGCCGTCG  
\*\*\*\*\*

Dizi_analizinden	TTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC
Bizim_verdigimiz	TTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC *****
Dizi_analizinden	ATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
Bizim_verdigimiz	ATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC *****
Dizi_analizinden	AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGG
Bizim_verdigimiz	AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGG *****
Dizi_analizinden	GTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTT
Bizim_verdigimiz	GTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTT *****
Dizi_analizinden	TCGCTTCTTCCCTTCTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTCCCCGTCAGCTCTAAATC
Bizim_verdigimiz	TCGCTTCTTCCCTTCTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTCCCCGTCAGCTCTAAATC *****
Dizi_analizinden	GGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTG
Bizim_verdigimiz	GGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTG *****
Dizi_analizinden	ATTAGGGTGATGGTTACCGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGA
Bizim_verdigimiz	ATTAGGGTGATGGTTACCGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGA *****
Dizi_analizinden	CGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACC
Bizim_verdigimiz	CGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACC *****
Dizi_analizinden	CTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTGCGGATTTTCGGCCTATTGGTTAA
Bizim_verdigimiz	CTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTGCGGATTTTCGGCCTATTGGTTAA *****
Dizi_analizinden	AAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATTTAACGCTTACAA
Bizim_verdigimiz	AAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATTTAACGCTTACAA *****

**Dizi\_analizinden:** Dizi analizi için gönderdiğimiz Plasmid DNA'nın sonucu

**Bizim\_verdigimiz:** Kağıt üzerinden olması gereken DNA dizisi

#### Vektör içerisindeki genom entegrasyon kaseti ve içeriği

<b>Mavi Bölge</b>	= MTT1 Promotoru	879 bç
<b>Sarı Bölge</b>	= Neo4 Dirençlilik Geni	795 bç
<b>Yeşil Bölge</b>	= BTU2 Sonlandırma	34 bç
<b>Renkli Bölge</b>	= Klonlama Bölgesi	54 bç
<b>Kırmızı Bölge</b>	= HSP70.2 Promotoru	826 bç
<b>F.Yeşil Bölge</b>	= İnterferon β Geni	606 bç
<b>Turkuaz Bölge</b>	= His-Tag Dizisi	50 bç
<b>Yeşil Bölge</b>	= BTU2 Sonlandırma	332 bç
<b>Pmavi Bölge</b>	= MTT1-3' terminasyon	1012 bç
Toplam Uzunluk (Genom Entegrasyon Kaseti Uzunluğu)		4888 bç
Klonlama Kaseti Uzunluğu		2826 bç

Sonuç olarak *Tetrahymena* hücrelerinin MTT1 lokusuna entegre edilen interferon protein üretim kasetinin organizmanın genomunda varlığı gösterilmiştir. 38 °C ısı-şoku ile HSP70 promotorunun transkripsiyonel olarak indüklenebildiği ve hedef genlerin mRNA'larının ürettirildiği gösterilmiştir. Fakat protein üretimine dair bir sonuç elde edilememiştir. İnterferonun neden üretilmediği düşünüldüğünde yanlış kozak dizisinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. *Tetrahymena*'nın kozak dizisinin AAA ATGG şeklinde olduğu bildirilmiştir (Brunk ve Sadler. 1990). Genoma entegrasyon için yapılan tasarımda ise interferon beta geninin ATG'sinden önce gelen dizi MscI restriksiyon enzim tanıma bölgesi olan TGGCCA, yani kastette oluşan pattern TGGCCAATGTCTTACAACCTATTAGGTTTCTTA şeklindeydi. Buradan da yukarıda bahsedilen kozak dizisinin sağlanmadığı için ribozom makinesinin protein sentezini başlatamadığına işaret ettiğini düşünmüştük. Bu bağlamda yeni bir tasarıma geçiş yaptık. Daha önceden, ürettirecek rekombinant proteinde kalıntı bırakacağı gerekçesiyle HSP70.2 promotorundan çıkarılan HSP70.2 geninin ATG'siyle birlikte 36 bazlık bölge yeniden eklendi ve Şekil 6.2'de dizi bilgisi verilen kaset oluşturuldu.

HSP70.2 + Tt-hIFN $\beta$

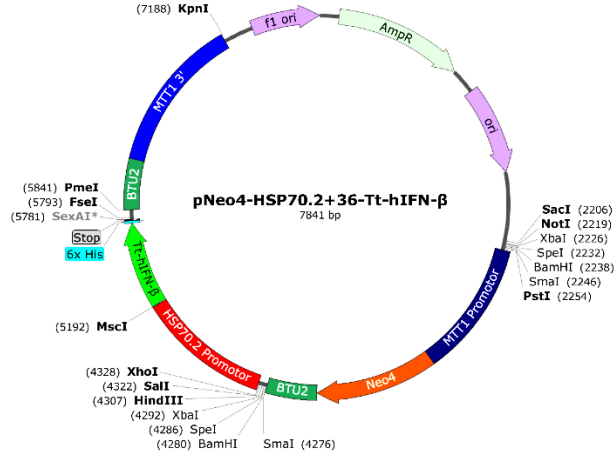
CTCGAGTAAATTAAGTGCAAGCAAATCTTAAAAATATTATAAAATTGAAAATAACTAAAAATTAACAATTCCTTAAATTTATATTGTCA  
GATATTTTAGCTATGTAATTTGCAAGCAATATTTGTTTCAAAAACATGAATTAATAAACTAAAAAATATTCATTATATAATTAATAAA  
AGGAACCTTTAAACAATAATCTTAAATTTCTATATTAATTTATTAATTTACTTTAAAGAAAAAGAATAAACTTCTAAATCAAATT  
AATTTTAATCAAACTTTTAAATCTATCTAAATAGTAATAATTGTTATATTTAAATTAATAAAATTTATCAATAAATAAATACATTTTA  
GCAAAATATTTATTTTATATTTCTGCTGATAATTTAAATGAGTTTAAATGCTAAATTTTAAATTTTAAAAAATTTGTTGTTGGT  
GTTGTTGGTGGTGGTAGATAGATAATTAATTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAGTTTAAAG  
TTTTTAAATCTTTCTTTTCTTATTGCTATTAATAATCAATTTATTCAATAAGGATAATTAATAAATTTAGAAAATTAATTTACTGATT  
TCTAAAAATCTTTTGTATTAATAAATAACACTTCAAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
AACAGCTAAAAAGAAATTTGATCAAAAAATAAATAATCAATTAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
CGACTCAACAAATAA  
TGCTTATTACAAATGCTTTATTATTATGCTTCTACTACTGCTTTATCTATGCTTACAACCTTATTAGGTTTCTTACAAAAGATCTT  
CTAACTTCCAATGCCAAAATTAATTTATGCAATTAACCGTAGATTTAGAACTGCTTAAAGACAGAATGAACCTCGACATTCCTGA  
AGAAAATAACAATTACAACAATTTCAAAAAAGAAGCGTCTTAACTATTTACGAAATGTTACAAAACATTTTAGCTATTTTACAGA  
CAAGACTCTTTCTACTGTTGGAACGAACTATTGTTGAAAATTTAGCTAACGTTTACCACCAATTAACCACTTAAAACTG  
TTTTAGAAGAAAAATTAGAAAAAGAAGACTTCACTAGAAGAAAATTAATGCTTCTTTACTTAAAAAGATACTACGGTAGAATTTT  
ACACTACTTAAAAAGCTAAAGAATACTCTCACTGCGCTTGACTATTGTTAGAGTTGAAATTTTAAAGAACTTCTACTTCAATTAACAGA  
TTAACTGGTACTTAAGAAACCAACCACCACCACCACCTGATGACACTGGTGGCCGGCC

XhoI-HSP70.2 promotoru (Olası Kozak Dizisi)+HSP70.2 geninden 36 baz=862 bç  
MscI-İnterferon Beta-6xHis-tag-STOPSTOP-FseI = 606 bç

Şekil 6.2. HSP70.2 promotoru ve sonuna eklenen 36 bç dizi ile Tt-hIFN- $\beta$ 'nin dizi bilgisi. HSP70.2 Promotoruna eklenen 36 bazlık diziyi içeren bölge; promotorun sonunda, Tt-hIFN- $\beta$ 'nin 5' ucunda yer almaktadır. Turkuaz ile işaretli dizilerden biri veya ikisinin KOZAK dizisi gibi davranması beklenebilir. Not: ilk olası Kozak dizisi ve takip eden ATG HSP70.2 geninden gelmektedir. İkinci kozak bölgesini takip eden ATG ise ilkiyle aynı çerçevededir. Fakat ikinci Kozak dizisi, GC zengini olduğu için görevini yapamayabilir.

Oluşturulan HSP70.2 (+36)-Tt-hIFN $\beta$  kaseti pNeo4 vektörüne klonlandı (Şekil 6.3). Bir önceki deneydeki gibi lineer hale getirilen vektör biyolistik silah yöntemiyle

*Tetrahymena* hücrelerine transforme edildi. Pozitif klonlardan yapılan deneylerde gDNA ve mRNA varlıklarının gösterilmiş olmasına rağmen, protein üretimi gösterilemedi.



Şekil 6.3. pNeo4-HSP70.2 (+36)-Tt-hIFN $\beta$  vektörünün yapısı

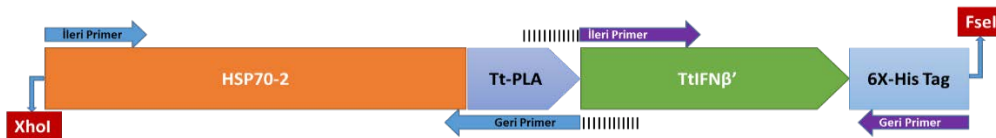
Tt-hIFN $\beta$ 'nın rekombinant üretimi için IRES elementi olarak görev yaptığını düşündüğümüz HSP70.2 geninin 36 bazlık bölümünün promotor dizisine yeniden eklenmesi ile yapılan üretim denemelerinden başarılı bir sonuç alınamadı. Bunun olası nedenlerine baktığımızda translasyon başlama dizisinin tanınmasını arttıran ve *Tetrahymena*'nın yüksek oranda ekprese edilen genlerinde 5' AAAAAATGA 3' şeklinde olan *Tetrahymena* Kozak dizisi (Brunk ve Sadler, 1990) Tt-hIFN- $\beta$  tasarımında 5' TGGCCAATGA 3' şeklindedir. ATG başlama kodununun önce GC zengini bir bölge olan MscI'in yer alması A-T zengini bir organizmada translasyon makinesinde sorun yarattığı düşünülmektedir. Bunu aşmak için kullanılan ilk yöntemde promotor dizisine eklenen HSP70.2 genine ait ilk 36 bazlık bölgenin Tt-hIFN- $\beta$  ATG'sinden ve MscI kesim bölgesinden önce geliyor olması ve içerisinde ATG başlama kodunu bulunması, ribozom makinesinin sorunsuz çalışabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmuş fakat protein elde edilemediğinden ikinci ATG'nin KOZAK dizisinde önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Yani olasılıkla ribozomlar ilk KOZAK dizisine bağlandıktan sonra ikincisine ulaştıklarında mRNA'dan düşmektedirler. Ribozom makinesinin translasyonu başlatabilmesi için, stres şartlarında IRES elementlerinin olması gerekmektedir. Böylelikle doğru ATG'yi tarayarak olası bir translasyonu başlatabilir. Bu bağlamda HSP70.2 promotor dizisine eklenen 36 bazlık bölge IRES görevi görüyor ise translasyonun başlaması için iyi bir kozak dizisine sahip ATG olması gerekir ki bizim çalıştığımız konstrakta IFN- $\beta$  ATG'sinden önce MscI (TGGCCA) yer almaktadır. Salim

vd.,'nin 2008 yılında yaptıkları kodon kullanımını ve başlama ve dur kodonlarının (ATG ve TGA) öncesi ve sonrasında yer alan beşer nükleotidi inceledikleri çalışmada, hem tüm genlerde hem de yüksek miktarlarda eksprese edilen genlerde bu bölgelerdeki nükleotidlerin pozisyonlarının Şekil 6.4'deki gibi olduğunu göstermişlerdir. Buna göre, IFN- $\beta$ 'nın klonlanmasında kullanılan ve 5' bölgesinde HSP70 promotorundan hemen sonra ve Tt-hIFN $\beta$  genindeki ATG başlama kodonundan hemen önce gelen MscI (TGGCCA) restriksiyon kesim dizisinin içeriği KOZAK dizisi olarak, en az tercih edilen veya hiç tercih edilmeyen bir dizi gibi görünmektedir. Yani, bu dizinin varlığının ribozom makinesinin çalışmasını engellediği düşünülebilir.



Şekil 6.4. *Tetrahymena thermophila*'da ATG öncesinde ve sonrasında yer alan beşer nükleotidin frekansları. Hem tüm genlerde hem de yüksek miktarlarda eksprese edilen genlerde bu bölgelerdeki nükleotidlerin pozisyonlarının tüm genlerde AAAAAATGAATAA veya yüksek miktarda eksprese edilen genlerde ise AAAAAATGACTAA şeklinde olduğu bulunmuştur (Salim vd., 2008)

İnterferon beta protein üretiminin olmamasının diğer bir nedeninin ise interferon beta geninde bulunan ve 21 amino asitlik sinyal dizisinin olabileceği düşünüldü. *Tetrahymena* bu sinyal dizisini işleyemediği için protein üretimi gerçekleşmiyor olabileceği düşünüldü ve interferon beta'dan bu sinyal dizisi çıkarılarak *Tetrahymena*'nın kendi sinyal dizisi olan PLA36 eklendi ve ısı-şoku promotörü kontrolündeki yeni bir tasarıma geçildi **HSP70-2-PLA-Tt-hIFN $\beta$ -6xHis**. İnterferon geninden 21 amino asitlik sinyal bölgesinin çıkarılması ve 36 amino asitlik PLA sinyal dizisinin eklenmesi örtüşen PZR yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.5).



Şekil 6.5. HSP70-2+Tt-PLA+ Tt-hIFN- $\beta$ -6xHis klonlama kasetinin bir araya getirmede kullanılan primerlerin örtüşen PZR için konumları ve klonlama restriksiyon enzim bilgisi.

XhoI ve FseI enzimleriyle kesilerek uçları hazır edilen genom entegrasyon vektörü pNeo4 ve “XhoI-HSP70-2-PLA-Tt-hIFN $\beta$ -6XHis-FseI”, (Mochizuki, 2008) kaset DNA’sı ligasyona alınarak, klonlanmıştır. Yeni yapılandırılan vektör *E. coli* DH5- $\alpha$  kompetent hücrelerine transforme edilmiş, elde edilen pozitif kolonilerden saflaştırılan vektörlerin restriksiyon parmak izi analizi ile pozitif koloniler belirlenmiştir. pNeo4-HSP70-PLA-Tt-hIFN $\beta$ -6X-His vektörü (Şekil 6.6) KpnI enzimiyle kesilerek doğrusal hale getirilerek, *Tetrahymena*’ya transformasyonda kullanılmıştır. gDNA ve mRNA kontrolleri pozitif olan bu konstrakla yapılan indükleme sonucu yine protein üretimi gerçekleşmemiştir.



Şekil 6.6. pNeo4-HSP70.2-PLA-Tt-hIFN $\beta$ -6XHis Vektör Yapısı. Genom entegrasyonu için oluşturulan orijinsiz vektörde gösterildiği üzere MTT1 gen lokusunun MTT1-5’ ile MTT1-3’ uç dizi bölgeleriyle homoloji kolları oluşturulmuş, bu iki kol arasında yerleştirilen kaset, böylelikle organizmanın genomunda MTT1 gen lokusuna homolog rekombinasyon ile entegre edilebilecektir. MTT1-5’ ile MTT1-3’ uç bölgeleri arasında ayrıca CdCl<sub>2</sub> (ağır metal) ile indüklenebilen MTT1 promotörü ve bu promotörün kontrolünde antibiyotik seçilimine olanak sağlayacak olan Neomisin direnç geni, BTU2 transkripsiyon sonlandırma bölgesi bulunmaktadır. Devamında ısı-şoku ile indüklenen *T.thermophila*’nın HSP70-2 promotörü ve dışarı salgılatma dizisi PLA ve *T.thermophila*’ya kodon uyumlu interferon beta geni ve 6XHis takısı yer almaktadır.

Protein üretimi çalışmalarında farklı yaklaşımlardan; eğer 45 kopyalı genom entegrasyon sisteminde üretilecek protein miktarının az olması halinde elde edilen proteinin miktarının artırılması için iki farklı protokol uygulanmıştır. Bunlardan birincisi immüno çöktürmedir (Ek-2 Protokoller). Bu şekilde ortamda sadece interferon proteinleri çekilmiş olacaktı fakat pozitif sonuç elde edilemedi. Bir diğer yöntem ise Metanol/Kloroform/Su ile Protein Çöktürmesi ve Tampon Değişirme (EK-2 Protokoller) denenmiş ama sonuç alınamamıştır.

İnsan interferon beta proteininin rekombinant üretimi için yapılan bir diğer çalışma ise 8-10 bin kopyalı ekstrakromozomal vektör sistemine geçmek, ve üretilecek proteinin varlığını füzyon protein şeklinde göstermek için 10xHi-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$

ekspresyon kaseti tanımlandı, bu şekilde hem GSTden kaynaklı iyi çözünen füzyon protein üretilebilecek, hem GFP ışması ile gözle ve mikroskopik takip mümkün olabilecek hem de interferon beta protein kodlayan DNA dizisinin önündeki Enterokinaz kesim bölgesi sayesinde interferon beta saflaştırılabilecekti.

### **İnterferon beta proteininin kendi sinyal dizisini içermeyen ve N-ucunda 10X Histidin, GST, GFP, Enterokinaz kesim bölgesini içeren vektörün yapılandırılması**

CdCl<sub>2</sub> ile indüklenebilir MTT1 promotu içeren 8-10 bin kopya orijinli (transient) pVGF vektörü kullanılmıştır. Vektörün içerisine klonlanacak kaset örtüşen PZR (Pogulis vd., 1996) yöntemi kullanılarak aşağıdaki adımlarda gerçekleştirilmiştir:



Şekil 6.7. pVGF vektörüne klonlanacak kasetin temsili gösterimi. pVGF vektöründe CdCl<sub>2</sub> ile indüklenebilen MTT1 promotörü kontrolünde eksprese edilecek kaset. GST, GFP, Enterokinaz kesim bölgesi ve sinyalsiz Tt-hIFNB

#### **1. Aşama: GFP ile Enterokinaz+TtIFNB'nın birleştirilmesi**

GFP'den bir ileri primer (daha sonra aynı primer GST ile birleştirme reaksiyonunda kullanılacağı için GST ile örtüşen 12 baz içerir = i-GFP+GST) ve GFP'nin 3' bölgesinden tasarlanmış (Enterokinaz+TtIFNB' ile örtüşen 12 baz içerir = g-GFP+E.Tt-hIFNβ) geri primer ile **736 bc** büyüklüğünde bir parça üretildi (E.Tt-hIFNβ = Enterokinaz+Tt-hIFNβ). Enterokinaz+Tt-hIFNβ den (GFP ile 12 baz örtüşen bölgeye sahip) ileri primer ve Tt-hIFNB geri primer (g-Tt-hIFNB-ApaI) ile **541 bc** büyüklüğünde bir parça üretildi. Üretilen bu iki parça ayrı ayrı jelden saflaştırıldı ve saflaştırılan bu parçalar kalıp olarak reaksiyonun ilk adımında kullanılır. 49 derecede örtüşen bölgeler mega primer gibi davranarak iki ayrı gen parçası birleşir ve sonraki adımda bu birleşen gen parçası çoğaltılacak ana DNA olarak görev yapar. Reaksiyonun ikinci adımında i-GFP+GST/g-Tt-hIFNB ApaI primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu devam ettirildi. Elde edilen büyüklük **1252 bc**.

#### **2. Aşama: GFP+Enterokinaz+TtIFNB' ile 10XHis+GST'nin Birleştirilmesi**

10XHis+GST'den ileri primer (i-10xHis-PmeI) ve GST'nin gerisinden GFP ile örtüşen bölgeye sahip geri primer (g-GST+GFP) ile **708 bc** büyüklüğün üretildi.

GFP+Tt-hIFN $\beta$  konstrağından GST ile örtüşen bölgeye sahip bir ileri primer (i-GFP+GST) ve TtIFN $\beta$ 'nün geri primeri ile (g-Tt-hIFN $\beta$ -ApaI) GST ile örtüşen bölgeye sahip **1264 bç** büyüklüğünde GFP+E.TtIFN $\beta$ ' bölgesi üretilirdi. Üretilen bu iki parça ayrı ayrı jelden saflaştırıldı ve saflaştırılan bu parçalar kalıp olarak (mega primer) reaksiyona eklendi ve i-10xHis-PmeI ve g-Tt-hIFN $\beta$ -ApaI primerleri kullanılarak örtüşen PZR ile birleştirildi. Elde edilen büyüklük **1925 bç** (Şekil 6.8).

**Tablo 6.2. Kullanılan Primerler**

1	i-GFP+GST	5' GTCTGGTCCTTAATCTAAAGGTGAAGAATTATCACTGGTG 3'
2	g-GFP+E.TtIFN $\beta$	5' GTCGTCGTCGTCCTTTGTATAATTCGTCCATACCGTGAGTAATACC 3'
3	i-E.TtIFN $\beta$ +GFP	5' CGAATTATACAAAGACGACGACGACAAATCTTACAACCTTATTAGG 3'
4	i-10XHis-PmeI	5' AAAGTTTAAACATGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC 3'
5	g-GST+GFP	5' CTTACCTTTAGATTAAGGACCAGACCAGGTAGCTCTTTG 3'
6	g-TtIFN $\beta$ -ApaI	5' AAAACTAGTGGGCCCTCAGTTTCTTAAGTAACCAGTTAATCTG 3'

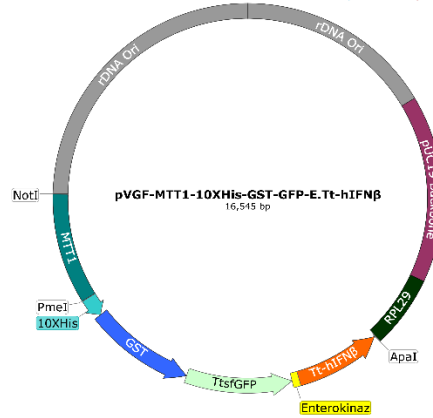
**PmeI-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$ =1925 bç**

PmeI

GTTTAAACATGCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACAACCTCTGGTTACTGGGGCATCAGAGGTTGGCTCAACCTATCCG  
 TTTCTTACTTGCCTACTTAGGTGTCTAATACACTAATAAGGCCTACGCCAATCCTGAAGAATGGTTCGGAAAGGATAAGAATGAACCTC  
 GGCTTTGACTTCCCAACATCCCTACTTAATTGATGGTGATCTTAACTTACTGAATCTTCTGCTATTCCTATTATCTTATCAGAA  
 AGCAGAAAAGAAACGAGTTGTTAGGATCTTCTGCTGACGGTCTTACAGTGAAGAAAGAAAGTTAGAGTTCGCTTAAATGTTGGTGTAT  
 TAGAGATCTTTTTAAGGAACTCACAGGCTTATGTTTCAACCTGACTTCAAAAACATTAAGAAAAGCTCTACACTGAAAAGCTCGAA  
 CTCTTAATTAAGAGACTCGGTGCTTATCTTGGTGATAAGGAATTCATAGTTGGTACCTTGACTTATGCTGATTTCTTTTCTATGAAG  
 CCCTCAGCTATATTAGACATATTTATCCCAAGCATTGTGCTACTCTTACTGCTTATATCAACAGATTTGAAAACCTCCCTGGTAT  
 TAAGGAATACATTTGCTAGCCATGCCTAAGAACTTAAGGTTTCTTACCTCCTCAAAGAGCTACCTGGTCTGGTCTTAACTCAAAGGT  
 GAAGAATTATCACTGGTGTGTTCTCTATTTAGTTGAATTAGACGGTGACGTTAACGGTTCACAAATCTCTGTTAGAGGTGAAGGTG  
 AAGGTGACGCTACTAACGGTAAATTAACCTTTAAATTCATTTGCACTACTGGTAAATTACCTGTCTCTGGCCTACTTTAGTTACTAC  
 TTTAACTTACGGTGTTCATGCTTCTCTAGATACCCTGACCACATGAAAAGACACGACTTCTTCAAATCTGCTATGCCTGAAGGTTAC  
 GTTCAAGAAAGAACTATTCTTTCAAAGACGACGGTACTTACAAAACCTAGAGCTGAAGTTAAATTCGAAGGTGACACTTTAGTTAAACA  
 GAATTGAATTAAGGTTATGACTTCAAAGAAGACGGTAACTTTTAGGTCACAAATTAGAATACAACCTTCAACTCTCACAACTTTA  
 CATTAAGTCTGACAAACAAAAAAGCGTATTAAAGCTAACTTCAAATTAGACACAACGTTGAAGACGGTCTGTTCAATTAGCTGAC  
 CACTACCAACAAAAACCTCTATTTGGTGACGGTCTGTTTATTACCTGACAACCACTACTTATCTACTCAATCTGTTTATCTAAAG  
 ACCCTAACGAAAAAAGAGACCACATGGTTTATTAGAATTCGTTACTGCTGCTGGTATTACTCACGGTATGGACGAATTATACAAAGCA  
 CGACGACGACAAATCTTACAACCTTATTAGGTTTCTTACAAGATCTTCTAACTTCCAATGCCAAAAATTATTATGGCAATTAACCGGT  
 AGATTAGAATACTGCTTAAAAGACAGAAATGAACCTCGACATTCCTGAAGAAATTAACAATTAACAACATTCAAAAAGAACGACGCTG  
 CTTTAACTATTTACGAAATGTTACAAAACATTTTAGCTATTTTACGACAAAGACTCTTCTTACTGGTTGGAACGAACTATTGTTGA  
 AAACCTTATAGCTAACGTTTACCACCAATTAACCACTTAAACACTGTTTATAGAGAAAATTAAGAAAAGAAAGACTTCACTAGAAGA  
 AAATTAATGTCTTTTACACTTAAAAGATACTACGGTAGAATTTTACACTACTTAAAAGCTAAAAGAACTCTCACTGCGCTTGGAA  
 CTATTGTTAGAGTTGAAATTTAAGAACTTCTACTTCATTAACAGATTAACCTGGTACTTAAGAAACCTGAGGGCCC(ApaI)

**Şekil 6.8. 10XHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$  kaset dizi bilgisi.**

Bu kasetin 5' ucunda bulunan *PmeI* ve 3' ucunda bulunan *ApaI* restriksiyon kesim bölgeleri ile pVGF (pIGF-1) vektörüne klonlama yapılmıştır (Şekil 6.9). Bu şekilde sitoplazmik protein üretimi gerçekleştirilecektir.



**Şekil 6.9. pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$  Vektörünün Temsili Yapısı.** 8-10 bin kopyaya çıkabilen vektör sistemi ile ekstrakromozomal protein ekspresyonu CdCl<sub>2</sub> ile indüklenebilen MTT1 promotörü kontrolünde gerçekleştirilir. Bu vektör içerisinde promotordan sonra saflaştırmada kullanılacak Histidin takısı ve GST takısı yer almaktadır. Göz ve mikroskopla takip için GFP takısı, devamında Enterokinaz kesim bölgesi ve Enterokinaz ile kesildikten sonra kendi sinyal dizisini içermeyen interferon beta protein kodlayan dizi bulunmaktadır.

### **Biyolistik silahla pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$ vektörünün *Tetrahymena thermophila* hücrelerine transformasyonu ve pozitif transformant seçimi**

Biyolistik silah ile *Tetrahymena*'ya ekstrakromozomal vektör aktarımı konjugatif B2086 ve Cu428 ırklarına gerçekleştirilmiştir (Cassidy-Hanley vd., 1997). 100  $\mu$ g/mL konsantrasyonu denk gelecek şekilde antibiyotik (paromomisin) baskısı kurulmuştur. Antibiyotik oranı 500  $\mu$ g/mL çıkartılarak pozitif transformantlar elde edilmiş rekombinant ırkların kontrolü; CdCl<sub>2</sub> ile indüklendikten sonra floresan mikroskobu GFP filtresinde incelenerek GFP ışınması gösterdiği teyit edilmiş (Şekil 6.10) ve bu ırkların sıvı azot stoğu yapılmıştır. Negatif kontrol hücrelerinde ve indüklenmemiş deney grubu hücrelerinde ışınma görülmedi (Veri sunulmamıştır).



**Şekil 6.10. pVGF-MTT1- 10XHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$  vektörünü içeren hücrelerin indüklendikten sonra GFP floresan filtresindeki mikroskobik görüntüleri (Mikroskop kamerasının bulunmadığı dönemde cep telefonu ile çekilmiştir).**

### **Ekstrakromozomal pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Ent.Tt-hIFN $\beta$ vektörünü içeren hücrelerin CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesi ve rekombinant Tt-hIFN $\beta$ protein üretim analizleri: Protein İzolasyonu, Ni-NTA saflaştırması ve SDS-PAGE**

Mikroskopi incelemelerinde, indüklendikten sonra GFP ışması gösterdiği görülen kültürlerden protein izolasyonu ve Ni-NTA saflaştırması yapmak için 100'er mL ekim yapıldı, Negatif kontrol olarak da 100 mL *Tetrahymena* Cu428 ırkından ekildi. Yaklaşık 3 gün çalkalamasız bir şekilde 30 °C'de büyütülen hücreler 2 µg/mL CdCl<sub>2</sub> ile indüklendikten 12 saat ve 24 saat sonra örnekler alındı.

Kültürler 1500 g'de 3 dk. santrifüjlenerek peletler elde edildi. Peletler TPIST-2 (*Tetrahymena* Protein İzolasyonu ve Saflaştırma Tamponu -2) ile liziz edildi (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 10 mM İmidazol, %1 Triton X-100, 2 mM PMSF, 1XPIC pH 7.4-7.6) ve 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine bölündükten sonra buzda 15 dk. ara ara vortekslenerek inkübe edildi, sonra, 7 devirde 5 dk. süreyle Bullet Blender'da 0,2 mM'lik çelik bilyelerle parçalama işlemi yapıldı. Tekrar buzda 10 dk. inkübe edildikten sonra 4 derece soğutmalı santrifüjde 13.000 rpm'de 20 dk. santrifüjlendi. Süpernatant toplam protein izolasyonu olarak ayrı tüplere alındı, pelet ise TPIST-2 ile yeniden çözülerek ayrı saklandı.

Tris-Glisin SDS-PAGE ve Doğal (Native)-Page analizleri yapabilmek için 150'şer µL örnekler 50'şer µL 4X Laemmli yükleme tamponu [(BioRad 4X Laemmli = 277,8 mM Tris-HCl pH 6.8 % 44,4 gliserol % 0,02 Brom Fenol Blue, % 4,4 SDS) %10 β-merkaptetanol] ile karıştırıldı ve 6-7 dk. kaynatılarak denatüre edildi, doğal page için β-merkaptetanol kullanılmadı ve kaynatma işlemi yapılmadı.

Ni-NTA saflaştırması Protino Ni-NTA Agaroz Tanecikleri (MACHEREY-NAGEL, Almanya) kullanılarak aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

Kültürlerden izole edilen ~4-5'er mL toplam protein, 1'er mL protino Ni-NTA tanecikleriyle g/b +4 °C' de hafif çalkalamalı tablada inkübe edildi. Ertesi gün çalışmalar +4 derece dolap içerisinde yapılmaya devam edildi.

Havada asılı duracak şekilde düzenek hazırlandı ve filtreli kolonlara Ni-NTA ile bağlanan örnekler konuldu, kolonların altlarına tıplar takıldı ve 2-3 dk. beklenildi, sonra tıplar açıldı ve kolonda tutulmayan kısım Flow Through (Bağlanmayan Proteinler) buza gömülü şekilde duran ayrı tüplere alındı.

**1. yıkama:** 4 mL NPI-20 Tamponu (= 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 20 mM İmidazol) ile yapıldı. Benzer şekilde tıplar kapatıldı 2-3 dk. beklenildi, sonra tıplar açılarak buz içerisine gömülü olan 15 mL'lik santrifüj tüplerine kolondan yıkamalar alındı.

**2. Yıkama:** 5 mL NPI-50 Tamponu (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol) ile benzer şekilde yapıldı.

**1. Elüsyon:** Tıplar kapalıyken elüsyon tamponundan (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazol) 1 mL eklendi ~15 dk. beklenildi, sonra elüe edildi.

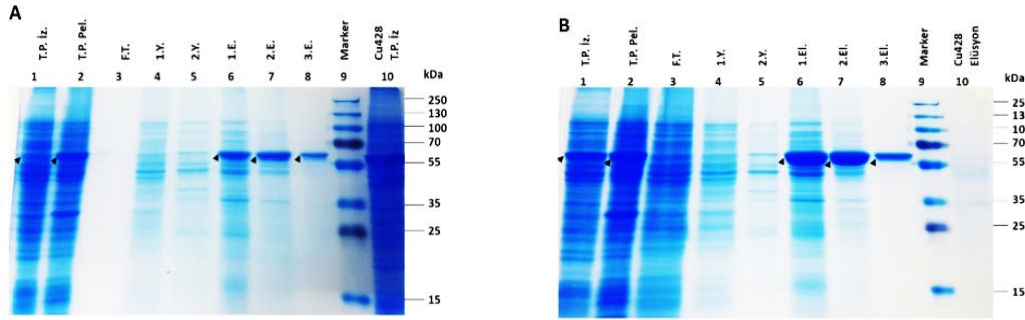
**2. Elüsyon:** 2 mL eklendi ~15 dk. beklenildi, sonra elüe edildi.

**3. Elüsyon:** 2 mL eklendi ~15 dk. beklenildi, sonra elüe edildi.

Elüsyon işlemlerinde, 12. saat örnekleri ile 24. saat örnekleri arasında, mikroskopik incelemelerde GFP ışımından kaynaklı ciddi bir fark görüldü. 24. saat örnekleri çok daha yeşil olduğu gözlemlendi, bu mikroskopi incelemelerinde de SDS-Page ön analizlerinde de (Şekil 5A ve 5B) bu şekildeydi. Bundan dolayı Diğer çalışma ve analizlerde 12. saat örnekleri kullanılmadı sadece 24. saat örnekleri kullanıldı.

Tüm bu Flow Through, Yıkamalar ve Elüsyonlardan SDS-PAGE için örnekler hazırlandı ve kalanlar -80'e kaldırıldı. Toplam proteinlerin miktarları BRADFORD yöntemiyle hesaplandı ve saflaştırılan bu örneklerin yüklenmesi denatüre şartlarda; Laemmlı yükleme tamponu ile kaynatılarak %12'lik SDS-PAGE (Tris-Glisin) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 6.11). SDS-PAGE analizlerine göre rekombinant 10XHis-GST-GFP-Ent.Tt-hIFN $\beta$  füzyon proteinin üretimi indüklemenin 12. Saati ve 24. saatinde görülmektedir (Şekil 6.11-A ve B). Hem toplam protein izolasyonunda hem de toplam proteinlerin peletinde füzyon protein kalın bir bant (siyah okla gösterilen) olarak üretilmiştir. Ni-NTA saflaştırmasında ise her üç elüsyonda da siyah okla gösterilen yerlerde kalın bir bant elde edilmiştir. Füzyon protein bandının beklenen teorik büyüklüğü ~74 kDa ([https://web.expasy.org/cgi-bin/compute\\_pi/pi\\_tool](https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)) olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE jelinde Ni-NTA saflaştırması elüsyonlarında görülen rekombinant füzyon protein bandının büyüklüğü 55 kDa ile 70 kDa arasında olup tahminen 60 kDa civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bu durum ya füzyon proteinin biraz daha küçük koştüğünü veya bir kısmının kırılarak üretildiğini işaret etmektedir. Histidin takısı tek başına ~1.5 kDa, GST takısı tek başına ~25 kDa, GFP takısı tek başına ~26-27 kDa, Enterokinaz tek başına ~0,6 kDa, glikozilasyonsuz ve sinyalsiz Tt-hIFN $\beta$  tek başına ~18-20 kDa, (glikozilasyonlu ~20-22 kDa büyüklüğündedir) yani toplamda füzyon proteinin büyüklüğü 74-76 kDa'a karşılık gelmektedir. Enterokinaz kesim bölgesi dahil Tt-hIFN $\beta$ nın olmadığı takı kısmının tahmini büyüklüğü ise ~54 kDa'dur. Elde edilen bantların enterokinaz kesiminin olmadığı interferon betanin, füzyon protein şeklinde üretildiğini düşündüğümüz SDS-PAGE jelindeki büyüklüğünün 54 kDa'dan

biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumda yüksek miktarda üretilen ~74 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$  füzyon proteini için ya daha küçük koşmaktadır ya da güdük üretilmektedir. Bu durumun tespiti için interferon beta gen kasetinin bulunduğu bölgenin dizi analizi ile kontrol edilmesi gerekmektedir.



**Şekil 6.11. Rekombinant pVGF-MTT1- 10XHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$  hücre hattından yapılan Ni-NTA afinitik saflaştırmaların SDS-PAGE Analizi A)** İndüklemenin 12. saat örnekleri, **B)** İndüklemenin 24. saat örnekleri. 1-8. kuyular Tt-hIFN $\beta$ , 1: Toplam Protein, 2: Pelet, 3: Ni-NTA Saf. Flow Through, 4: Ni-NTA Saf. 1. yıkama, 5: Ni-NTA Saf. 2. Yıkama, 6: Ni-NTA Saf. 1. elüsyon, 7: Ni-NTA Saf. 2. elüsyon, 8: Ni-NTA Saf. 3. elüsyon, 9: markör (Thermo Page Ruler) 10: Cu428 Negatif kontrol Toplam Protein. Siyah oklar tahmini beklenen füzyon protein bantlarını işaret etmek için kullanılmıştır.

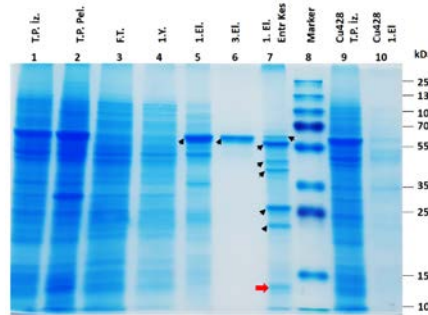
### **pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$ vektörü içeren hücre hattından yapılan Ni-NTA saflaştırması sonrasında elde edilen proteinlerin enterokinaz ile kesim analizi**

Enterokinaz kesimi yapabilmek için öncelikle saflaştırma ortamında bulunan inhibitör olan imidazolün uzaklaştırılması (oranının düşürülmesi) amacıyla deney grubu 24. saat 1. elüsyon örneğinin 225  $\mu$ L'si, 5 mL 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile karıştırılarak 10 kDa cutoff'lu filtreli santrifüj tüpünde (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Device, 10.000 cut/off, Merck Millipore, Almanya) ~35 dk. 4000 g'de santrifüjlenerek ~200  $\mu$ L'ye konsantre edildi.

Konsantre edilen örnekten 90  $\mu$ L enterokinaz kesim reaksiyonuna alındı ve üzerine 10  $\mu$ L 10X Enterokinaz kesim tamponu (25 mM TrisHCl, 50 mM NaCl and 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5, Kumar vd., 2017) ve 1  $\mu$ L enterokinaz enzimi (NEB, Light-Chain Enterokinase, #P8070S) eklendi. PZR cihazında 23 °C'de 16 saat boyunca inkübe edilerek kesim gerçekleştirildi. Kesim sonucu SDS-PAGE ile analiz edildi.

Rekombinant 10XHis-GST-GFP-Ent.Tt-hIFN $\beta$  füzyon proteini, enterokinaz kesim bölgesinden yararlanılarak 54 kDa'luk 10XHis-GST-GFP-Ent takı kısmı ile 22 kDa'luk Tt-hIFN $\beta$  iki parçaya bölünmesi beklenmektedir. Kesim PZR cihazında 23 °C'de 16 saat

boyunca inkübe edilerek gerçekleştirildi. Şekil 6.12 kuyu 7’de, teorik büyüklüğü ~74 kDa olarak beklenen ama 60 kDa civarında koşmuş olan füzyon proteini enterokinaz ile kesildikten sonra, ~60 kDa (sağ küçük ok) kesilmemiş füzyon protein ile 10 kDa (okla gösterilmeyen alt bant), 22 kDa, 26 kDa, 46 kDa ve 50 kDa ve 58 kDa’luk protein bantları oluşturmuştur. Entrokinaz kesiminde kullanılan 1. elüsyon, saflaştırılmış 10XHis-GST-GFP-Ent.Tt-hIFN $\beta$  füzyon proteinin görüldüğü kuyuda (Şekil .12 kuyu 5) bu (10-13 kDa, 22 kDa, 26 kDa, 46 kDa ve 50 kDa’luk protein) bantların hiçbiri bulunmamaktadır; yani bu bantların hepsi entrokinaz kesim kökenlidir. Bu bulgular, bu hücre hattının 2 farklı vektör içerebileceğini işaret etmektedir; mutasyonlu olmayan Tt-hIFN $\beta$  protein kodlayıcı bölge içeren vektörden Tt-hIFN $\beta$ ’nin beklenen (22 kDa ve 24 kDa) büyüklüğüne yakın 22 kDa ve 26 kDa proteinler üretirken STOP kodon üreten mutasyonlu vektör versiyonundan 10-13 kDa’luk güdük Tt-hIFN $\beta$  üretilmektedir. Entrokinaz kesimindeki 46 kDa ve 50 kDa’luk proteinler ise 22 kDa ve 26 kDa’luk Tt-hIFN $\beta$  olasılıkla dimer formları (Karpusas, vd., 1997) olduğu düşünülmektedir. Güdük üretilmenin ana nedenlerinden biri Tt-hIFN $\beta$  protein kodlayıcı bölgede bir mutasyon olabileceğinden pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Ent.Tt-hIFN $\beta$  vektörünün Tt-hIFN $\beta$  kısmı, tekrar dizi analizine gönderilmiş, olası mutasyon durumu kontrol edilmektedir.



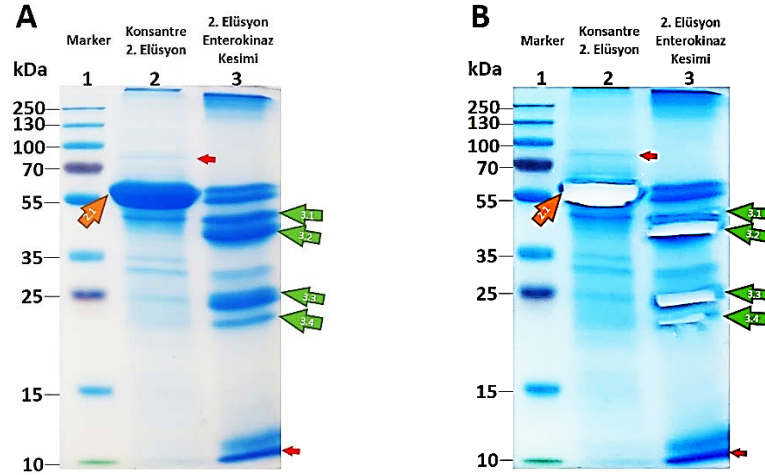
**Şekil 6.12. pVGF-MTT1- 10XHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$  hücre hattından yapılan indüklenme, protein izolasyonu ve Ni-NTA saflaştırması sonrasında elde edilen örneklerin enterokinaz ile kesimi ve analizi.** Denatüre şartlarda SDS-PAGE, 1-7. kuyular deney grubu (Tt-hIFN $\beta$ ). 9-10. kuyular Cu428 negatif kontrol. 1: Toplam Protein, 2: Pelet, 3: Ni-NTA Saf. Flow Through, 4: Ni-NTA Saf. 1. yıkama, 5: Ni-NTA Saf. 1. elüsyon, 6: Ni-NTA Saf. 3. elüsyon, 7. Ni-NTA Saf. 1. elüsyon Enterokinaz Kesimi, 8: markör (Thermo Page Ruler) + GFP pozitif kontrol 9: Cu428 Toplam Protein 10: Cu428 Ni-NTA Saf. 1. elüsyon. Siyah oklar tahmini beklenen füzyon protein bantlarını işaret etmek için kullanılmıştır. Not: Kırmızı ok, kesim sonucu 10-13 kDa’luk güdük Tt-IFN $\beta$  parçası.

### **pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$ vektörü içeren hücre hattından yapılan Ni-NTA saflaştırması ve enterokinaz kesim ürünlerinin Kütle Spektroskopisi Analizleri**

Ni-NTA saflaştırması sonucunda elde edilen Rekombinant füzyon protein ve

füzyon proteinin enterokinaz ile kesiminden sonra elde edilen bantların kütle spektroskopisi analizleri için örnekler konsantre edilerek SDS-PAGE jelinde koşturuldu ve ilgili bantlar (Şekil 6.13-A ve B) kesilerek analize gönderildi. MALDI-TOF MS ve/veya LC-MS analizleri hizmet alımı ile Kocaeli Üniversitesi Dekart Proteomik Araştırma Lab'ına yaptırılmıştır.

10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$ ' içinde bulunduğu 2. Elüsyon örnekleri enterokinaz kesimine alınabilmesi için önce inhibitör gibi çalışan imidazolü uzaklaştırmak için tampon değişikliğine alındı. 2. elüsyon örneğinden 800  $\mu$ L alınarak üzerine 15 mL PBS eklendi. Ultrasantrifüj tüpünde (Amicon) 4000 g, 40 dk. ile santrifüjlendi ve ~200  $\mu$ L olarak geri alındı böylelikle hem tampon değişikliği yapıldı, hem de örnekler 4 kat konsantre edildi. Buradan 120  $\mu$ L konsantre örnek enterokinaz kesimine alındı, reaksiyon 23 derecede 18 saat boyunca sürdü. Konsantre edilen kesilmemiş örnek (Şekil 6.13A kuyu 2 ve Şekil 6.13-B kuyu 2) ve kesilmiş örnek (Şekil 6.13-A kuyu 3 ve Şekil 6.13-B kuyu 3) ayrı kuyularda SDS-PAGE jelinde koşturulduktan sonra farklılık gösteren ilgili bantlar kesilerek analize gönderildi (Şekil 6.13).



**Şekil 6.13.** pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$  vektörünü içeren rekombinant hücre hattının indüklenmesi sonucu elde edilen proteinlerin Ni-NTA saflaştırmasının Enterokinaz ile kesimi ve kütle spektroskopisi analizi için hazırlanması. A) Konsantre edilen 2. elüsyon ve 2. elüsyonun enterokinaz ile kesiminden elde edilen bantlar. B) Elde edilen bantların kütle spektroskopisi analizleri için jelden kesilmiş durumlarını gösteren SDS-PAGE analizleri.

Şekil 6.12 ve 6.13'de ayrıntılı bir şekilde bulgu tanımlanmış saflaştırma ve saflaştırılan ürünün enterokinaz ile kesimi sonucu oluşan bantların içeriklerinin belirlenebilmesi için; olası interferon beta proteinine denk gelebileceği düşünülen bantlardan ok ile işaretlenmiş 3.4 interferon beta monomer büyüklüğüne denk

gelmektedir. 3.2 ile gösterilen bant ise interferon betanın dimer yapmış formu olabileceği göz önünde bulundurulmuştur. Füzyon proteinden interferon betanın kesildikten sonra kalan diğer proteinlerin doğru yerde olup olmadıklarını da anlayabilmek için 3. kuyudan 3.1 ile gösterilen yerden kesilen bant 10xHistidin-GST-GFP-Enterokinaz'ın beklenen büyüklüğüne denk gelmektedir. Saflaştırma kuyusunda olmayan fakat enterokinaz ile kesildikten sonra oluşan 3.3 ile gösterilen bant da analiz için seçilmiş ve jelden kesilerek hizmet alımı yoluyla, analize gönderilmiştir. MALDI-TOF ve LC-MS analizleri sonucunda gönderilen örnekler MASCOT programı ile insan veri tabanı kullanılarak incelenmiş fakat interferon beta yerine interferon alfa proteininin bazı peptid dizileri (hem 2.1 ile gösterilen saflaştırma bandının hem de 3.1, 3.2 ve 3.3. bantlarda) bulunmuştur. Monomerik Tt-hIFN $\beta$ 'nin 22 kDA'luk 3.4 ile işaretlenmiş protein bandından bir sonuç çıkmaması diğer bantlara göre daha zayıf protein bulundurmasından kaynaklanıyor olabilir, düşüncesindeyiz.

#### **Bunlar 2.1. bandın analizinden:**

- 3. sırada, Interferon alpha-14 OS=Homo sapiens GN=IFNA14 PE=1 SV=3,
- 5. sırada, Interferon alpha-5 OS=Homo sapiens GN=IFNA5 PE=1 SV=1,
- 6. sırada, Interferon alpha-6 OS=Homo sapiens GN=IFNA6 PE=1 SV=1,
- 33. sırada, Interferon alpha-16 OS=Homo sapiens GN=IFNA16 PE=2 SV=1

#### **3.1. bandın analizinden:**

- 2. sırada, Interferon alpha-14 OS=Homo sapiens GN=IFNA14 PE=1 SV=3
- 5. sırada, Interferon alpha-6 OS=Homo sapiens GN=IFNA6 PE=1 SV=1

#### **3.2. bandın analizinden:**

- 5. sırada, Interferon alpha-14 OS=Homo sapiens GN=IFNA14 PE=1 SV=3
- 43. sırada, Interferon alpha-6 OS=Homo sapiens GN=IFNA6 PE=1 SV=1

#### **3.3. bandın analizinden:**

- 4. sırada, Interferon alpha-14 OS=Homo sapiens GN=IFNA14 PE=1 SV=3
- 13. sırada, Interferon alpha-2 OS=Homo sapiens GN=IFNA2 PE=1 SV=1

şeklindedir.

Tt-hIFN $\alpha$  türevleri için protein amino asit dizileri <https://www.uniprot.org/> web sitesinden aratılarak elde edilmiştir. Elde edilen dizilerin dikey hizalanarak karşılaştırmaları ise <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> sitesi üzerinden yapılmıştır.

## **pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$ vektörü içeren hücre hattı ile biyoreaktörde kültürizasyon**

Stressiz ve optimum koşullarda hücrelerin büyütülerek rekombinant protein üretimi için en ideal şartların sağlandığı “biyoreaktörde üretime geçişin” ilk çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Peltier ısıtımali Infors HT Miniforce 2 (Infors AG, Bottmingen, İsviçre) modelinde yapılan bu çalışmada; biyoreaktör sıcaklık 30 °C, pH 7.0 (Kiy, T., ve Tiedtke, A., 1992), çözümlür oksijen (pO<sub>2</sub>) doyurulmuş hava ile %25 (Weide vd., 2006), impeller karıştırma en düşük 200 ve en yüksek 400 ve toplam hava akışı 0.5 L/dk. olacak şekilde ayarlanmıştır ve genel görüntüsü Şekil 6.14-A’da verilmiştir. Zamanla hücrelerin bölünmeleri ve yaşlanmaları sonucu ortamın pH’sındaki artışı pH 7.0 civarında ayarlaması için biyoreaktöre 4M Asetik Asit solüsyonu bağlandı.

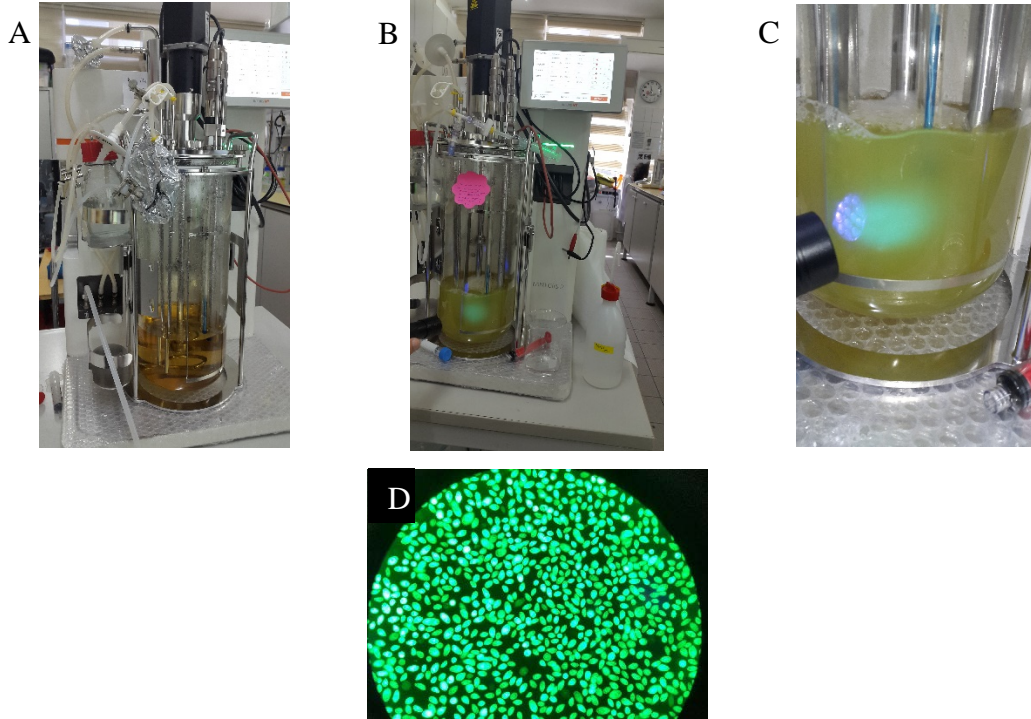
Biyoreaktör’de büyütülen ekstrakromozomal pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$  vektörünü içeren *Tetrahymena thermophila*’nın büyüme eğrisine bakıldığında (Şekil 15, solda ki grafik); inokülasyon 60.000 hücre/ml olacak şekilde 1.5 L NEFF besiyerine konsantre edilmiş hücre hacmi ile yapılmış, sonrasında örnek alınarak hücreler sayılmıştır. Yaklaşık 5 saat’lik Lag fazında 60.000 hücre/ml’den 90.000 hücre/ml’ye artış gerçekleşmiştir. Logaritmik faz yaklaşık 20 saat sürmüş olup hücre yoğunluğu 1.100.000 hücre/ml’ye erişmiştir. İndükleme işlemi 900.000/1.000.000 hücre/ml ulaştığında (14. Saat) 2 µg/mL CdCl<sub>2</sub> ile gerçekleştirilmiştir. Lag faz indüklemenden sonra yaklaşık 10 saat daha sürmüş, 30. saatte hücre yoğunluğu 1.500.000 hücre/ml’ye ulaşmıştır. İndüksiyondan sonra bir köpük problemi ile karşılaşılmanmıştır. İnokülasyonun ardından 8., 12., 15., 18., 21., 24. 27. ve 32. saatlerde hücre örneklemleri yapılarak, hücre sayıları tespit edilmiştir (Şekil 9) ve hücre peletleri hassas terazide tartılarak sonraki analizler için -80 saklanmıştır. Peletlerin eşit hücre sayısı içeren peletlerinde, gram ağırlık 21. saate kadar artış gösterirken bu saatten sonra azalış farklılaşması tespit edilmiştir (Tablo 1). İndüklenen hücreler Floresan mikroskopunun GFP filtresinde incelenmiş ve reaktöre UV lambası tutularak da GFP ışınması yoluyla 10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$  rekombinant füzyon proteinin üretimi takip edilmiştir (Şekil 9). İndüksiyondan 30 saat sonra hücre davranışları sağlıklı ve canlıyken biyoreaktör durdurulmuş, hücreler santrifüj ile peletlenerek hasat edilmiştir (Şekil 9). 10XHis-GST-GFP-Enterokinaz-Tt-hIFN $\beta$  vektörü taşıyan *Tetrahymena thermophila* hücrelerinin biyoreaktör kültürizasyonunda anormal bir durumla karşılaşılmanmış,

kullanılan şartların hemen hemen optimum olduğu düşünülmektedir.

**Tablo 6.3. pVGF-Tt-hIFN $\beta$  hattı biyoreaktör çalışmalarından elde edilen peletlerin ağırlıkları**

Saat	8	12	15	18	21	24	27	32
Gram	0,22	0,32	0,43	0,52	0,55	0,40	0,36	0,32

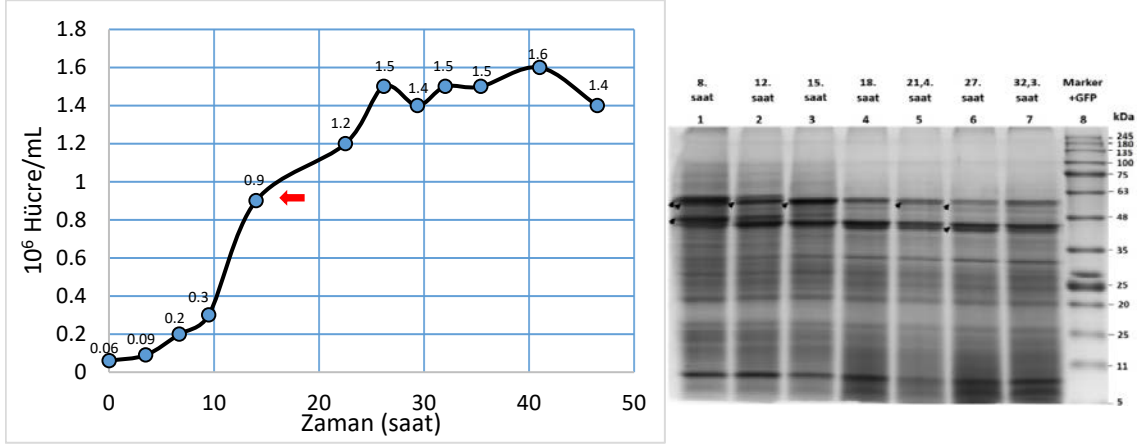
İndüklemenin ardından zaman zaman alınan örnekler mikroskopta incelendiğinde elde edilen görüntüler Şekil 6.15-D’de verilmiştir.



**Şekil 6.14. 10xHis-GST-GFP-Ent.TtIFN $\beta$  hattının Biyoreaktör Şartlarında inokülasyon sırasında ve sonrasında belirli saatlerde alınan örnekler. A)** Biyoreaktör kurulum öncesi steril edilmiş kültür haznesi ve SPP besiyeri, **B)** İndüklemeden sonra UV lambası ile üretimin takibi, **C)** B’de görülen durumun yakından resmi, **D)** ise indüklemeden sonra bir zaman dilimlerinde alınmış örneklerin mikroskop altında 10xHis-GST-GFP-Ent.TtIFN $\beta$  füzyon proteinini üreten hücrelerin görüntüleri.

Bu hücre peletlerine  $\beta$ -merkaptetanollü Laemmli yükleme tamponu eklenerek, örnekler kaynatılarak patlatılmış, %13’lük SDS-PAGE jeline yüklenmiştir (Şekil 6.15). 65 kDa’luk 10XHis-GST-GFP-Ent.-Tt-hIFN $\beta$  füzyon proteininin indüklemeye birlikte 8. saatte az miktarda üretildiği, 12.saatte bu proteinde artış olduğu ve 15.saatte maksimum miktara çıktığı görülmektedir; 18.saatten sonra bu protein miktarında azalma görülmektedir (Şekil 6.15-kuyu 1-3 ve 4-7). Şekil 6.15 kuyu 1’de büyük miktarda bulunan üst protein bandı (67 kDa gibi); kuyu 2’de azalmış ve kuyu 3-7’de ise görülmez

olmuştur. Bu analiz sonuçlarına göre hücreler bir sonraki biyoreaktöre inoküle edildikten sonra hücre yoğunluğu yaklaşık 1.5 milyon hücre/mL civarlarına geldiğinde 25. saat civarı logaritmik fazın sonu olacağından indüklemenin yapılması ve indükledikten sonra da yaklaşık 15 saat sonra (25.saat ile 40.saat arası) biyoreaktör durdurularak hücreler ve dış ortam hasat edilmelidir. Biyoreaktörle ilgili ayarlarda iyileştirmeler devam etmektedir.



**Şekil 6.15. 10xHis-GST-GFP-E.Tt-hIFN $\beta$  hattının biyoreaktör şartları.** İnokülasyon sırasında ve sonrasında belirli saatlerde alınan örneklerin mL’indeki sayılarının hesaplanmasıyla elde edilen büyüme grafiği (soldaki şekil), ve indükleme gerçekleştirildikten sonra belirli saatlerde alınan örneklerin SDS-PAGE analizleri (sağdaki şekil). 1-7. kuyular indüklemeye sonraki 8, 12, 15, 18, 21.4, 27 ve 32.3. saatlere ait toplam proteinler olup 8. markör (BlueElf Prestained Protein markör, PS 105) + GFP pozitif kontrol (~27 kDa). Not: Hücre Sayısı-Zaman grafiğinde kırmızı okla gösterilen, inokülasyon zamanını göstermektedir.

Şekil 6.15.’de *Tetrahymena* biyoreaktör şartlarındaki büyüme eğrisi; durağan (stationary) faz 25. saat ile 40. saat arasında yaklaşık 15 saat sürmüş olup ölüm fazına geçiş 45.saat olabilir gibi gözükmesine karşılık, tam olarak belirlenememiştir. 46. Saatte bile hücrelerin hala daha durağan fazda olduğu söylenebilir. Indükleme ve rekombinant üretim, hücre büyüme grafiğine göre 46. saate kadar sürdürülebilir gibi durmaktadır. Lakin SDS-PAGE jelinde olabildiğince eşit yüklenmeye çalışılan toplam proteinlerin davranışı 18. saatten sonra rekombinant protein üretiminde (siyah okla gösterilen bantlar, özellikle üstteki 48 kDa ile 63 kDa arasında kalan bantlar) bir düşüşün meydana geldiği yönündedir. Bu nedenle, bu şartlar altında, veriler indüklemeye sonra 15. saat civarında hasat yapılmasını tavsiye etmektedir.

Rekombinant interferon beta füzyon proteininin (pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Ent-Tt-hIFN $\beta$ ) üretimi için 8-10.000 kopyalı pVGF vektörüne ilgili kaset klonlanarak *Tetrahymena thermophila*’ya transforme edilmiştir. CdCl<sub>2</sub> ile indüksiyondan sonra

olympus flüoresan mikroskop incelemesinde (Şekil 6.10) GFP ışması görülmüş, indüklenmeyen deney grubu ve negatif kontrol hücrelerine ise ışma görülmemiştir. GFP ışmasının görülmesi demek GFP takısına sahip 10XHis-GST-GFP-Ent-Tt-hIFN $\beta$  füzyon proteininin indüklemeden sonra üretildiğini işaretidir. Böylece füzyon protein yapısında GFP'nin önünde bulunan 6X Histidin ve GST takılarının da üretildiği anlaşılmaktadır (Şekil 6.11). 12 saatlik ve 24 saatlik indüklemelerin ardından elde edilen toplam protein ve toplam proteinlerin Ni-NTA ile saflaştırılmalarından elde edilen proteinlerin büyüklüğü ~60-65 kDa olup füzyon protein bandının beklenen teorik büyüklüğü olan 73-74 kDa'dan daha küçüktür (Şekil 6.12-B, 6. 7. ve 8. kuyulardaki okla gösterilen elüsyon bantları ~60-65 kDa civarındadır). Eğer Tt-hIFN $\beta$ ' füzyon protein içerisinde üretilmemiş olsaydı, elde edilmesi gereken rekombinant füzyon proteinin 10XHis-GST-GFP-Ent takı kısmının büyüklüğü ~54 kDa civarında olmalıydı. Fakat SDS-PAGE analizlerinde de görüldüğü üzere saflaştırılan ve toplam protein ve hatta pelet içerisindeki füzyon proteinin büyüklüğü 54 kDa'dan daha büyük olup ~60-65 kDa civarındadır. 10XHis-GST-GFP-Ent-Tt-hIFN $\beta$  füzyon proteinin enterokinaz ile kesimi yapıldığında ise 60-65 kDa füzyon proteininin büyüklüğünün 48 kDa düştüğü görülmektedir; bu reaksiyon sonucunda yaklaşık 10 kDa, 22 kDa, 24 kDa, 44 kDa ve 48 kDa büyüklüğünde üretilen rekombinant Tt-hIFN $\beta$ ' salınmaktadır. Şekil 6.12-A'nın 5. ve 7. kuyuları birbirleriyle karşılaştırıldığında; 5. kuyudaki saflaştırılan füzyon protein profilinin (ana bant 55 kDa'da daha büyük), 7. kuyuda saflaştırılan füzyon proteinin enterokinaz ile kesimi sonucu oluşan profilden (kesimden sonra oluşan ana bant beklenildiği gibi ~55 kDa civarındadır) farklı olduğu görülmektedir. Şekil 6.13-A'nın 2. kuyusunda ise 65 kDa'luk ana kalın bantın hemen üzerinde çok ince 74 kDa'luk bir bant daha mevcuttur, bu protein bandı, 2. kuyudaki entrokinaz kesim reaksiyonunda da kesilmiş gözükmemektedir. Yukarıdaki Şekil 6' entrokinaz kesim reaksiyonu değerlendirmesinden de anlaşılacağı üzere *Tetrahymena thermophila*'ya transforme edilen vektörlerin bir kısmında interferon beta'nın başlarında meydana gelmiş olabileceğini düşündüğümüz bir mutasyondan kaynaklı STOP kodunu oluşması durumuyla açıklanabilmektedir ki 2. kuyudaki enterokinaz kesim reaksiyonu sonucu oluşmuş olan 10 kDa'luk bantın güdük Tt-hIFN- $\beta$ ' olabileceken diğer mutasyonsuz vektörlerden 65 ile 74 kDa'luk Tt-hIFN- $\beta$ ' üretilmekte, bunlardan ise 22 kDa ile 24 kDa'luk proteinlerin kesilmektedir.

Tt-hIFN $\beta$ ' rekombinant olarak üretimin gerçekleştiğini ve enterokinaz ile de kesilerek saf bir şekilde elde edilebileceğini kanıtlamak için bu bantların kütle

spektroskopi analizleri, hizmet alımı yoluyla yaptırılmıştır. MALDI-TOF analizleri, hIFN $\beta$ 'ye amino asit dizisine benzeyen hIFN $\alpha$  proteinlerinden bulmuştur, bu bulgu ise olasılıkla üretimin başarısız olduğunu göstermektedir.

Tüm bu sonuçlardan sonra pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Ent.Tt-hIFN $\beta$  vektörünün Tt-hIFN $\beta$  kısmı, tekrar dizi analizine gönderilmiş olup olası mutasyon durumu analiz edilmiştir. Dizi analizi için TtsfGFP proteinini kodlayan gen dizisinin başından tasarlanmış olan bir ileri primer (F-GFP+GST-Ört. Primeri) ile sanger yöntemi kullanılarak dizi analizi yaptırılmıştır.

### Orijinal dizi:

```
TC TAAAGGTGAAGAATTATTCAGTGGTGTGTTCTATTTAGTTGAATTAGACGGTGACGTTAACGGTCACAAATCTCTGTTAGAG
GTGAAGGTGAAGGTGACGCTACTAACGGTAAATTAACTTTAAATTCATTTGCACTACTGGTAAATTACCTGTTCCCTGGCCTACTTT
AGTTACTACTTTAACCTACGGTGTTCATGCTTCTCTAGATACCTGACCACATGAAAAGACACGACTTCTTCAAATCTGCTATGCCT
GAAGGTTACGTTCAAGAAAGAACTATTTCTTTCAAAGACGACGGTACTTACAAAACCTAGAGCTGAAAGTTAAATTCGAAGGTGACACTT
TAGTTAACAGAATTGAATTTAAAGGTATTGACTTCAAAGAAGACGGTAAACATTTTAGTTCACAAATTAGAATACAACTTCAACTCTCA
CAACGTTTACATTTACTGCTGACAAAACAAAAAACGGTATTTAAAGCTAACTTCAAAAATTAGACACAACGTTGAAGACGGTTCTGTTCAA
TTAGCTGACCACTACCAACAAAACACTCCTATTTGGTGACGGTCTGTTTATTACCTGACAACCACTACTTATCTACTCAATCTGTTT
TATCTAAAGACCCTAACGAAAAAGAGACCACATGGTTTTATTAGAATTGCTTACTGCTGCTGGTATTACTCAGGGTATGGACGAATT
ATACAAA GACGACGACGACAAA TCTTACAACCTATTAGGTTTCTTACAAAGATCTTCAACTCCAATGCCAA AATTATTATGGCAA
TTAAACGGTAGATTAGAATACTGCTTAAAAGACAGAATGAACCTCGACATTCCTGAAGAAATTAACAATTACAACAATTCAAAAAG
AAGACGCTGCTTTAACTATTTACGAAATGTTACAAAACATTTTAGCTATTTTACAGACAAGACTCTTCTTACTGTTGGAACGAAAC
TATTGTTGAAAACCTTATTAGCTAACGTTTACCACCAAATTAACCCTTAAAACTGTTT TAGAAGAAAATTAGAAAAAGAAAGACTTC
ACTAGAAGAAAATTAATGCTTCTTTACACTTAAAAAGATACTACGGTAGAATTTACACTACTTAAAAGCTAAAGAAATACTCTCACT
GCGCTTGGACTATTGTTAGAGTTGAAATTTTAAAGAACTTCTACTTCATTAACAGATTAACCTGTTTACTTAAAGAACTGA GGGCCAC
TAGT
```

Yeşil renk ile gösterilen GFP, Mor renk ile gösterilen enterokinaz kesim dizisi turuncu renk ile gösterilen Tt-hIFN $\beta$  protein kodlayıcı dizi

### Dizi Analizinden gelen sekans bilgisi ise aşağıdaki gibidir.

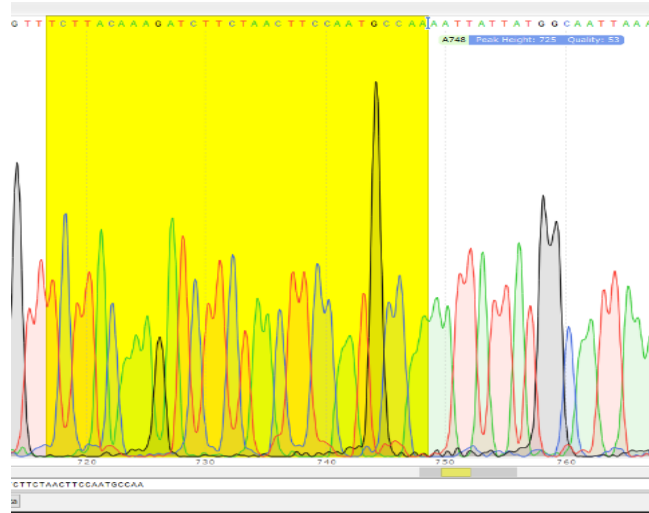
```
TGATTCTATTTAGTTGATTAGACGGTGACGTTAACGGTCACAAATCTCTGTTAGAGGTGAAGGTGAAGGTGACGCTACTAACGGT
AAATTAACCTTTAAATTCATTTGCACTACTGGTAAATTAACCTGTTCCCTGGCCTACTTTAGTTACTACTTTAACCTACGGTGTTCAT
GCTTCTCTAGATACCTGACCACATGAAAAGACACGACTTCTTCAAATCTGCTATGCCTGAAGGTTACGTTTCAAGAAAGAACTATTTT
TTTCAAAGACGACGGTACTTACAAAACCTAGAGCTGAAAGTTAAATTCGAAGGTGACACTTTAGTTAACAGAATTGAATTTAAAGGTATT
GACTTCAAAGAAGACGGTAACTATTTTAGGTCACAAATTAGAATACAACTTCAACTCTCACAACGTTTACATTACTGCTGACAAAACAAA
AAAACGGTATTTAAAGCTAACTTCAAAAATTAGACACAACGTTGAAGACGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCACTACCAACAAAACACTCC
TATTGGTGACGGTCTGTTTATTACCTGACAACCACTACTTATCTACTCAATCTGTTTATTCTAAAGACCCTAACGAAAAAGAGAC
CACATGGTTTTATTAGAATTCGTTACTGCTGCTGGTATTACTCAGGGTATGGACGAATTATACAAAAGACGACGACAAAATCTTACA
ACTTATTAGGTTTCTTACAAAGATCTTCTAACTTCCAATGCCAA ?AATTATTATGGCAATTAAACGGTAGATTAGAATACTGCTTAAA
AGACAGAATGA ACTTCGACATTCCTGAAGAAATTAACAATTACAACAATTCAAAAAGAAAGACGCTGTTTAACTATTACGAAATG
TTACAAAACATTTTAGCTATTTTACAGACAAGACTCTTCTTACTGTTGGAACGAAACTATTGTTGAAAACCTATTAGCTAACGTTT
ACCACCAAATTAACCCTTAAAACTGTTTAGAGAAAATTAGAAAAGAGACTTCACTAGAGAAATTAATGCTTCTTACTACTTAAAAA
GATACTACGGTAGAATTTACTACTTAAAGCTAAAGAATACCTCTCACTGCGCTGACTATGTAGAGTGAATTTAGAAAACCTACTCA
TAACGAATACTGGTTACTAGACTGAGCCACACACCAGACTCATTCTAATAACTAGCTAATGCCTCATTATCGTACCAAAATTCATA
A
```

Her iki dizi de clustal omega ile dikey hizalanmış ve deneysel süreçte kullanılan dizide bir nokta mutasyonu meydana geldiği ortaya çıkmıştır. (Şekil 6.16).

Original_GFP-E.TtIFNB'	TCTACTCAATCTGTTTTATCTAAAGACCCTAACGAAAAAGAGACCACATGGTTTTATTA	660
Dizi_Analizinden_Gelen_GFP-E.TtIFNB'	TCTACTCAATCTGTTTTATCTAAAGACCCTAACGAAAAAGAGACCACATGGTTTTATTA	631
Original_GFP-E.TtIFNB'	GAATTCGTTACTGCTGCTGGTATTACTCACGGTATGGACGAATTATACAAGACGACGAC	720
Dizi_Analizinden_Gelen_GFP-E.TtIFNB'	GAATTCGTTACTGCTGCTGGTATTACTCACGGTATGGACGAATTATACAAGACGACGAC	691
Original_GFP-E.TtIFNB'	GACAAATCTTACAACCTATTAGGTTCTTACAAGATCTTCTAACTTCCAATGCCAAAAA	780
Dizi_Analizinden_Gelen_GFP-E.TtIFNB'	GACAAATCTTACAACCTATTAGGTTCTTACAAGATCTTCTAACTTCCAATGCCAANNA	751
Original_GFP-E.TtIFNB'	TTATTATGGCAATTAACGGTAGATTAGAATACTGCTTAAAAGACAGAATGAACTTCGAC	840
Dizi_Analizinden_Gelen_GFP-E.TtIFNB'	TTATTATGGCAATTAACGGTAGATTAGAATACTGCTTAAAAGACAGAATGAACTTCGAC	811
Original_GFP-E.TtIFNB'	ATTCTGAGAAAATTAACAATTACAACAATCCAAAAAGAGACGCTGCTTTAACTATT	900
Dizi_Analizinden_Gelen_GFP-E.TtIFNB'	ATTCTGAGAAAATTAACAATTACAACAATCCAAAAAGAGACGCTGCTTTAACTATT	871
Original_GFP-E.TtIFNB'	TACGAAATGTTACAAAACATTTTAGCTATTTTCAGACAAGACTCTTCTTCTACTGGTTGG	960
Dizi_Analizinden_Gelen_GFP-E.TtIFNB'	TACGAAATGTTACAAAACATTTTAGCTATTTTCAGACAAGACTCTTCTTCTACTGGTTGG	931
Original_GFP-E.TtIFNB'	AACGAACTATTGTTGAAAACCTATTAGCTAACGTTTACCACCAAATTAACCCTTAAAA	1020
Dizi_Analizinden_Gelen_GFP-E.TtIFNB'	AACGAACTATTGTTGAAAACCTATTAGCTAACGTTTACCACCAAATTAACCCTTAAAA	991
Original_GFP-E.TtIFNB'	ACTGTTTAGAGAAAATTAGAAAAAGAACTTCACTAGAGAAAATTAATGCTCTTCT	1080
Dizi_Analizinden_Gelen_GFP-E.TtIFNB'	ACTGTTTAGAGAAAATTAGAAAAAGAACTTCACTAGAGAAAATTAATGCTCTTCT	1043

**Şekil 6.16. TtsfGFP-Tt-hIFN $\beta$  dizi analizi sonucunun karşılaştırılması.** pVGF-MTT1-10XHis-GST-GFP-Ent. vektörü içerisinde özellikle Tt-hIFN $\beta$ 'nın DNA dizi bilgisini tespit etmek amacıyla Sanger DNA dizileme tekniği ile yapılan analizde interferon beta proteinini kodlayan DNA dizisinde renkli olarak gösterilen yerden sonra bir bazın silindiği tespit edilmiştir.

GFP'nin 48. bazından itibaren Enterokinazı ve TtIFNB'nın 51. bazına kadar (yani dizi analizinden gelen sekans bilgisindeki 748. baz) düzgün bir şekilde okunmuştur (Şekil 6.17)



**Şekil 6.17. Meydana gelen nokta mutasyonunun; dizilerin dikey olarak hizalanmasıyla ve gelen pik diagramında eksik olan bazın yerinin gösterilmesi.**

İnterferonun 52. sıradaki A bazı dizi analizinde okunmamış (dizi analizinden gelen sekans bilgisinde soru işareti sarı renkli “?” ile gösterilmiştir) 67'den sonra 301.

Baza kadar doğru bir şekilde okumuş, devamında düzgün okumamaya başlamıştır. Dikey hizalamada da görüldüğü üzere renklendirilmiş diziden (Şekil 6.16) sonra gelmesi gereke A bazı deneysel çalışmalarda kullanılan interferon beta DNA dizisinden bir şekilde silinmiş ve bu da bir çerçeve kaymasına neden olmuştur. Oluşan mutasyon interferon beta gen dizisi içerisinde 52. Nükleotidin (interferon beta gen dizisinin başında ATG yok) silindiği şeklindedir. Bu veriler ışığında anlaşılıyor ki; 52. nükleotidin silinmesiyle oluşan mutasyon interferon beta gen dizisinde bir çerçeve kaymasına neden olmaktadır bu çerçeve kaymasını takiben ise oluşan durum aşağıdaki gibidir

ATG-TCT-TAC-AAC-TTA-TTA-GGT-TTC-TTA-CAA-AGA-TCT-TCT-  
AAC-TTC-CAA-TGC-CAA-\*AAT-TAT-TAT-GGC-AAT-TAA-ACG-GTA-GAT-  
TAG-AAT-ACT-GCT-TAA-AAG-ACA-GAA-TGA

Bir baz silinmesi şeklinde gerçekleşmiş olan nokta mutasyonu bölgesine kadar 17 amino asitlik bir protein üretimi normal bir şekilde gerçekleşir, 17. amino asitten sonra çerçeve kaydığı için oluşan yeni okuma çerçevesinde sonraki 18. amino asit kodonu TGA şeklinde olduğu için protein sentezi durmaktadır ve 34 amino asitlik güdük bir protein üretimi söz konusudur. Nokta mutasyonunun tespit edildiği tarihe kadar yapılan çalışmalardan net bir şekilde sonuç alınamamasının nedeni üretilen sadece 34 amino asitlik bir güdük peptid parçası olduğundandır. Nokta mutasyonundan kaynaklı durumdan ötürü ise western blot ve ELISA analizlerinde (datalar sunulmamıştır) sonuç elde edilememiştir. Buna rağmen nokta mutasyonu olmayan vektör içeren hatların da olabileceği ama bunların çok az olmasından kaynaklı çok düşük bir üretimin söz konusu olabileceği göz önünde bulundurulduğunda pozitif olarak gördüğümüz bazı dataların anlamlı olabileceğine işaret etmektedir.

### **Tt-hIFN $\beta$ 'da Düzeltilen Nokta Mutasyonunun Dizi Analizi ile Teyiti**

Tespit edilen nokta mutasyonu sonrasında hızlı bir şekilde sorunun çözümü için çinden gelen ilk interferon beta sentetik geni üzerinden çalışmalara yeniden başlanmış ve oluşturulan konstrağın dizi analizi ile mutasyon içermediği belirlenmiştir.

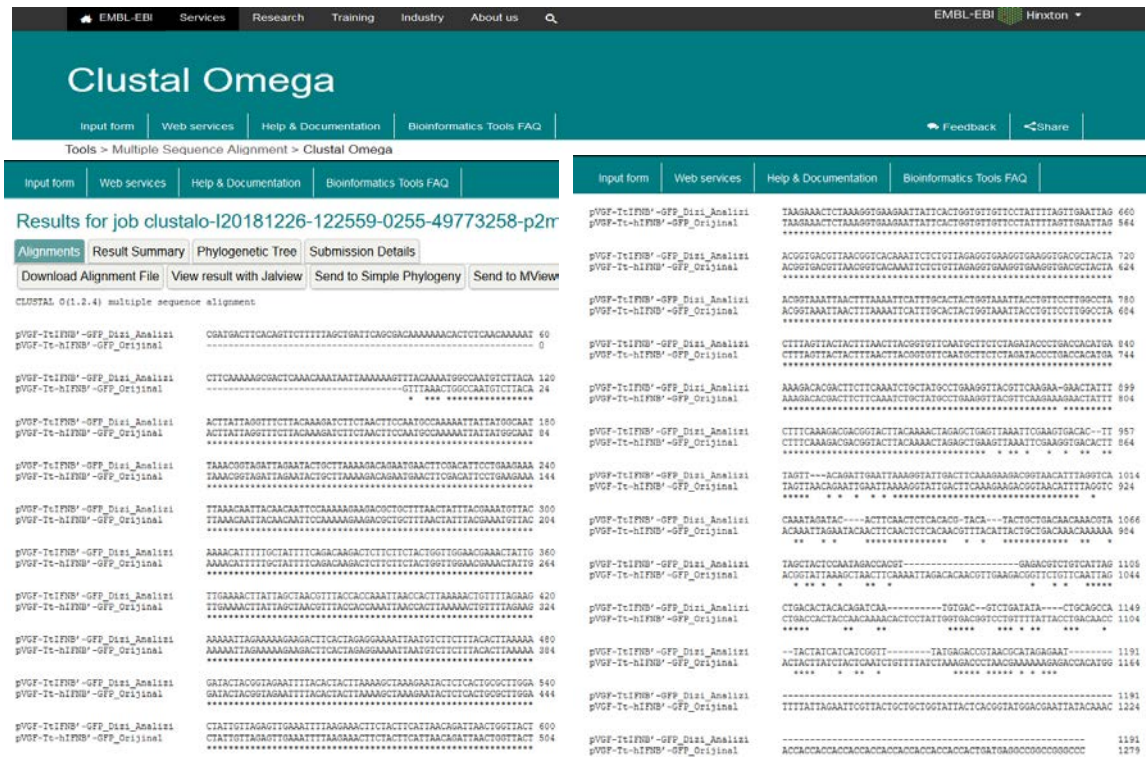
*E. coli* DH5 $\alpha$  kompetent hücrelerinden elde edilen pVGF-Tt-hIFN $\beta$ -TtsfGFP 14. Koloni Plazmid DNA'sına **Sanger Dizileme** yöntemiyle dizi analizi yaptırılmıştır.

Dizi analizleri Hem BM Labosis (BM Lab. Sist. Ltd. Şti. Ankara) hem de Oligomer (Oligomer Biyoteknoloji A.Ş. Ankara) firmalarına hizmet alımı yoluyla



ACTGCGCTTGGACTATTGTTAGAGTTGAAATTTAAGAACTTCTACTTCATTAACAGATTAACCTGGTTACTTAAGAACTCTAAAGG  
TGAAGAATTAATTCACCTGGTGTGTTCCATTTTAGTTGAATTAGACGGTACGCTTAACGGTCAAAAATCTCTGTTAGAGGTGAAGGT  
GAAGGTGACGCTACTAAGCGTAAATTAACCTTAAATTCATTTGCACACTGGTAAATACCTGTTCCCTTGGCCTACTTTAGTTACTA  
CTTTAACTTACGGTGTTCATGCTTCTCTAGATACCTGACCAATGAAAAGACACGACTTCTTCAAATCTGCTATGCCTGAAGGTTA  
CGTTCAAGAAGAACTATTTCTTCAAAGACGACGGTACTTACAAAACAGAGCTGAGTTAAATTCGAAGTGACACTTTAGTTACAGAT  
TGAATTAAGGTATTGACTTCAAAGAAGACGGTAACATTTAGGTCAAAAATAGATACACTTCAACTCTCACACGTACATACTGCTGAC  
AACAAACGTATAGCTACTCCAATAGACCACCGTGAGACGTCTGTCATTAGCTGACACTACACAGATCAATGTGACGCTGATATACTGC  
AGCCATACTATCATCTCGGTTTATGAGACCGTAACGCATAGAGAAT

Her iki dizi de Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) dikey olarak hizalanmış ve dizilemenin interferon beta-GFP füzyon protein kodlayan DNA dizisini baştan GFP'nin 282. bazına kadar okuduğunu ve bu okuma içerisinde herhangi bir farklılık olmadığı görülmüştür (Şekil 6.19).



Şekil 6.19. Dizi analizinden gelen sonuçlar ile orijinal vektörün dizileri clustal mega ile dikey olarak hizalanması. İnterferon betadan itibaren GFP'nin 282. bazına kadar okumuş ve bir mutasyona rastlanmamıştır.

## EK-2. Genel Protokoller

### Biyolistik Silahla Transformasyon ve Pozitif Transformant Seçimi

Biyolistik silah ile *Tetrahymena*'ya gen aktarımı literatürde yaygın bir yöntemdir (Cassidy-Hanley vd., 1997). Yöntem aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. *T. thermophila* hücrelerine biyolistik silah yöntemiyle transforme edilecek olan vektörün doğrusallaştırılmış olarak kullanılması transformasyonun verimliliği arttırdığı için KpnI restriksiyon enzimi ile ikinci adımda tasarlanan vektörler kesilerek doğrusallaştırılmıştır. Bunun için ~30 µg vektör kesilerek, PZR saflaştırma kiti ile saflaştırılmış, ~150 µL elüsyon tamponu içerisinde çözülmüştür. Saflaştırıldıktan sonra ~15-20 µg doğrusallaştırılmış DNA 42 °C'de ~3 saat süreyle konsantre edilmiş ve miktar 20 µL hacime düşürülmüştür. Her seferinde yaklaşık 2 µg/µL olacak şekilde DNA ateşlenmiştir.

**Altın partiküllerinin hazırlanması:** ilk aşama olarak 30 mg 0.6 µm altın taneciği (Bio-Rad 165-2262) tartılmıştır. 1 mL steril su ile çözülmüş ve 3-5 sn. vorteksleme ile karıştırılmıştır. Altın tanecikleri 5 sn. santrifüj yapılarak çöktürülmüş, süpernatant uzaklaştırılmış ve tanecikler %70'lik etanol ile bir kere yıkanmıştır. Sonrasında sırasıyla aynı işlem bir kere % 100'lük etanol ve arkasından da 1 mL su ile yapılarak, 500 µL %50'lik steril gliserol ile altın tanecikleri çözülmüş ve 40 µL'lik eşit hacimlerde tüplere bölünerek -20'de saklanmıştır.

**Altın partiküllerine DNA'ların yapıştırılması:** Hazırlanan altın partikülleri ile Lineer formdaki DNA' nın bir araya getirilip, altın partiküllerinin DNA ile kaplanması gerekmektedir. Doğrusallaştırılmış plasmid DNA'sının konsantrasyonu önce 1 µl' de 1 µg olacak şekilde ayarlanmıştır. Kaplama için hızlı bir şekilde altın partiküllerini içeren tüplere sırasıyla 1µL doğrusallaştırılmış vektör DNA'sı, 10 µl 2.5 M CaCl<sub>2</sub> ve 4 µL spermidin eklenmiştir. Her ekleme ardından ~3 saniye vortekslenmiş ve tüm bileşenler eklendikten sonra, 4°C'de 10 dakika çalkalanmıştır. Çalkalamanın bitiminde, 4°C'de 10.000 g'de 6 saniye santrifüj edilen DNA kaplı altın partikülleri toplanmıştır. Süpernatant, pipetle nazik bir şekilde çekilerek uzaklaştırılmış ve yıkama adımlarına geçilmiştir. Vektör DNA'sı bağlı altın partikülleri %70'lik 100 µL etanol ile yıkanıp, spin atılmıştır. Süpernatant tekrar pipetörle çekilerek uzaklaştırıldıktan sonra, peletin üzerine %100'lük 100 µL etanol eklenmiş ve aynı işlemler yapılmıştır. Ardından 40 µL

%100'lük etanol vektör DNA'sına bağlı altın partikülleri üzerine pipetlenerek çözülmüş ve makro taşıyıcı haznesindeki yerine yerleştirilmiştir. Tam orta kısmına çözülen vektör DNA'sı bağlı altın partiküllerin karışımı pipetle aktarılmış ve alkolü uzaklaşması için desikatörde bekletilmiştir. Makro taşıyıcı üzerindeki kurumuş altın, desikatörden biyolistik silah içerisindeki aparatına, kurutucu kapsül veya kurutucu bulunan bir petri tabağı içinde transfer edilmiştir.

**Biyolistik silahta kullanılacak hücre hazırlığı:** DNA'lar hazırlandıktan sonra iki gün önceden başlatılan hücre hazırlığının son aşamasına geçilmiştir. İki gün öncesinde 50 mL SPP besiyerinde somatik hücreler bir gece büyütülmüş ve ardından hücrelerin yoğunluğu  $2 \times 10^5$  hücre/ml olduğunda CU428-VII hücreleri açlık tamponuyla yıkanarak, 50 mL tamponda açlığa alınmıştır. Transformasyon günü ise  $2 \times 10^5$  hücre/ml yoğunluğundaki 50 mL'lik aç hücreler (veya konjugatif), konik dipli bir tüpte 1100 g'de 3 dakika santrifüj edilerek toplanmış ve böylelikle her bir ateşleme için 10 milyon hücre elde edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp, bir ateşleme için 10 milyon hücre 500 µL 10 mM Tris-HCl (pH7.5) içerisinde çözülmüştür. Daha öncesinde dairesel steril "whatmann 50" filtre kağıdı bir petri tabağına (100 mm) yerleştirilmiş ve steril edilmiştir. Filtre kağıdı 1 mL'lik 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile nemlendirilmiş ve üzerine 500 µl açlık tamponunda çözülen hücreler filtre kağıdının ortasından başlanarak 3/4'lük kısmına kadar yayılmıştır.

**Ateşleme ve sonraki adımlar:** Hücreler ve DNA örnekleri hazır olduğunda biyolistik silahla ateşleme adımına geçilmiştir. Rupture (patlayan) disk ile makro taşıyıcının yerleştirildiği kısmın arasındaki mesafenin deney öncesi 3/8 inç yani 9.525 cm'ye ayarlandığı cetvel ile ölçülerek teyit edilmiştir. Cihazın iç yüzeyi %70'lik alkolle temizlenmiş ve izopropanol içerisinde ise bir tane 900 PSI rupture diski ısıtılarak hazır bekletilmiştir. Rupture disk, tutucu aparatına yerleştirilmiş ve bu da partikül bombardıman aparatının içindeki dişli helyum portu üzerine döndürülerek monte edilmiştir. Makro taşıyıcı da yerine yerleştirildikten sonra hücreleri içeren petri tabağı cihazın en alt rafına yerleştirilerek, ateşleme için gerekli şartlar sağlanmıştır. Helyum tankında çalışma için gerekli basıncın 200-300 psi fazlası ayarlanıp (örneğin çalışmamızda 900 psi çalışma basıncı için 1100'e ayarlanır), vakum pompası çalıştırılmış ve cihazın Vac tuşuna basılıp (üst kademe) ve aynı zamanda cihazın sol alt kısmındaki vac vanası açılarak, haznenin iç vakumu gerçekleştirilmiştir. Vakum 26.5 - 27 Hg'ye

kadar çekilir-çekilmez, Vac tuşu Hold'a (alt kademe) alınmış ve vakum vanası kapatılmıştır. Ateşleme için her şey hazır olduğunda, "fire (ateşleme)" tuşuna basılarak ateşleme yapılmıştır. Ateşleme sonrası sırasıyla ateşleme (fire) tuşu bırakılmış, daha sonra Vac tuşu, vent pozisyonuna alınmış (alt kademe), vent vanası açılmış ve basınç sıfıra ulaştınca, kapak açılarak hücreler alınmıştır. Hücreleri kurumaktan korumak için üzerlerine 10 ml 30 °C' de SPP eklenmiş ve diğer ateşlemeler bitirilinceye kadar 30 °C' de inkübasyona bırakılmıştır.

**Onarım (recovery) ve seçim:** 1X SPP büyüme besiyerine aktarılan hücreler, 3 saat süreyle kendilerine gelmeleri için 30 °C' de çalkalamasız bir şekilde muhafaza edilmiştir. Kadmiyumla indüklenebilir promotordan antibiyotik direnci sağlanacağı için, besiyerine 0,5 µg/mL CdCl<sub>2</sub> eklenmiş ve 3 saat toparlanma sürecinin ardından 100 µg/mL konsantrasyonuna kadar Paromomisin baskısı kurulmuş ve besiyerindeki CdCl<sub>2</sub> 1 µg/ml'ye çıkarılmıştır. Bundan sonra hücreler dilüe edilmiş, 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna 100 µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. 30 °C' de 6 günlük takibe alınan hücrelerin 3. gününde antibiyotik miktarı 300 µg/mL' ye, 5. gününde ise 600 µg/mL, 7. gününde ise 1000 µg/mL'ye çıkarılarak, pozitif transformantlar seçilmiştir. Hücreler pasajlanmaya devam edilerek organizmada (bir hücrede) 45 kopya ile temsil edilen her bir MAC kromozomunun da pozitif olması amaçlanmıştır. İnterferon hücre hatları için antibiyotik baskısı 6000 µg/ml' ye çıkarılmış, insülin içeren hatlar 1000 µg/mL baskıdan sonra diğer adımlara geçilmiştir. *Tetrahymena thermophila* B2086 ve/veya Cu428 ırklarının her ikisine de interferon veya insülin içeren doğrusallaştırılmış vektörler transforme edilmiştir. Elde edilen tüm pozitif ırklar için sıvı azot stoğu yapılmıştır. Genoma entegrasyon kasetinin genomdaki konum doğruluğu, indüklenebilirliği ile protein üretebilme durumunun teyit edilebilmesi için rekombinant (interferon için B2086 ırkı ve insülin için Cu428) hatlardan gDNA, mRNA ve protein izolasyonu yapılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

### **TRI ile Toplam RNA İzolasyonu**

5-10 milyon hücre peleti için 1 mL TRI solüsyonu (Fluka – Biochemica 93289) kullanılır. Hücre peleti bead beater (homejenizatör) ile parçalanır (Bullet Blender, Next Advanced). Uygun miktarda TRI solüsyonuyla dikkatli bir şekilde çözölen pelet 5' oda ısısında bekletilir. 12000 g, 4 °C' de 10 dk. santrifüjlenir, pelet ekstrasellüler membran,

polisakkarit ve yüksek molekül kütleli DNA içerirken, RNA ve protein içeren süpernatant ayrı bir tüpe alınarak 5 dk. oda ısısında inkübe edilir. Süpernatant üzerine kullanılan TRI solüsyonun 0.2 katı kadar kloroform eklenir ve 15-20 sn. sert ve kuvvetli bir şekilde el ile çalkalanır ve 15 dk. oda ısısında inkübe edilir. 12000 g, 4 °C'de 15 dk. santrifüjlenir. Renksiz üst faz ayrı bir tüpe alınır (En altta kırmızımsı organik faz, bunun üzerinde DNA içeren orta faz, en üste RNA içeren renksiz faz bulunur.). Tüpün içerisine kullanılan TRI solüsyonunun 0.5 katı kadar 2-propanol (Isopropanol) eklenir ve tüp aşağı-yukarı hareket ettirilerek hafifçe karıştırılır. 10 dk. oda ısısında inkübe edilir. 12000 g, 4 °C'de, 10 dk. santrifüjlenir. RNA beyazımsı bir pelet oluşturur. Süpernatant dökülerek uzaklaştırılır. Pelet 1 mL TRI solüsyonu için 1 mL %75 etanol eklenerek (bu haliyle bir hafta +4 °C'de, bir yıl ise -20 °C'de saklanabilir.) vortekslenir. 7500-10000 g, °C'de, 5 dk. santrifüjlenir. Eğer RNA peleti süpernatant içerisinde görülürse ikinci bir santrifüj işlemi daha yapılır. Pelet içeren tüp 10-15 dk. hava kurutmaya bırakılır. RNA peletinin tamamen kurumamasına dikkat edilir. Elde edilen pelet tercih edilen çözücü içinde çözülerek (100-200 µL dH<sub>2</sub>O) 60 °C su banyosunda inkübe edilerek RNA'nın daha hızlı ve rahat bir şekilde çözücü içerisine geçmesi sağlanır. Uygun bir yöntem ile RNA miktarı ölçülür (NanoDrop, ND-100 Spectrophotometer). RNA'nın saflığı  $A_{260}/A_{280} \geq 1.7$  olmalıdır.

### **Toplam Protein İzolasyonu ve Saflaştırma**

Toplam protein izolasyonu için önce hücreler bir veya iki gün süreyle büyütülür. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında sayılır. ~25 milyon hücre için 3 mL T-100B liziz tamponu (300 mM NaCl, 25 mM Tris H-Cl pH 7.5, % 1 Triton X-100, 2 mM PMSF, 1 X Proteaz İnhibitör Kokteyli) kullanılır. Uygun miktarda hücre 1500 g'de 6 dk. santrifüjlenerek (Allegra 25R™ Centrifuge, Beckman Coulter) peletlenir. Pelet 10 dk. buzda bekletilir, ara ara pıt pıtlayarak karıştırılır. Sonra Bead beater ile 7.5 de 4 dk. süreyle 0,2 µm çelik bilyeler ile homojenize edilir. Sonra 5 dk. buzda inkübasyon edilir. Uygun tüplerde 13000 rpm, 4°C'de 20 dk. süreyle santrifüjlenir. Süpernatant toplam protein içerir.

**Ni-NTA ile Afinitik Saflaştırma:** Nikel taneciklerinin histidine olan afinitesinden yararlanılarak histidin takılı proteinler saflaştırılabilir. Bu bağlamda Ni-NTA Agaroz tanecikleri (Ni-NTA Agarose 100 mL, Qiagen) kullanılır. 4 mL toplam protein için 1 mL Ni-NTA santrifüjlenerek sulirisi elde edilir ve üzerine toplam protein eklenerek g/b 4

°C’de hafif çalkalamalı olarak inkübe edilir. Ertesi gün yıkama ve elüsyon adımları gerçekleştirilir.

Yıkama tamponu (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM İmidazol) veya T-100B tamponu (20/25 mM İmidazol eklenir, PMSF ve PIC konulmaz) ile kolon hacminin (kullanılan Ni-NTA miktarının) iki katı ile bir veya iki defa yıkanır. Yıkama işleminde örnekler 5-10 dk. tamponun içerisinde bekletilir. Elüsyon ise kolon hacminin yarısı kadar hacimle yapılır. Elüsyon tamponu (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM/500 mM/1000 mM İmidazol) örneğe eklendiğinde 10’ inkübe edilir ve bir kerede yapılmaya özen gösterilir. Gerekirse ikinci bir elüsyon, kullanılan imidazol oranı artırılarak yapılabilir. Tüm uygulamalar buzda ve mümkün olduğunca soğuk + 4 °C’de yapılmaya özen gösterilir.

**Tablo 6.4. SDS-PAGE: %12’lik poliakrilamid jel kullanılır:**

	<u>%12’lik Ayırma Jeli</u>	<u>%12’lik Paketleme Jeli</u>
% 30 Acrylamide/BIS	2 mL	0.425 mL
1.5 M Tris H-Cl	1.25 mL	0.5 M Tris-HCl 0.625 mL
% 10 SDS	50 µL	25 µL
dH <sub>2</sub> O	5 mL’ye tamamlanır	2.5mL’ye tamamlanır.
% 1 APS (Amonyum per sulfat)	25 µL	12.5 µL
TEMED	2.5 µL	2.5 µL

Yükleme Boyası 2X veya 6X olarak kullanılır.

**6X Yükleme Boyası (pH 6.8’e ~1 damla NaOH ile ayarlanır):** 0,006 g bromofenol blue, 6 mL % 80’lik Gliserol, 1,2 mL 0,5 M Tris-HCl pH 6.8, 2,8 mL dH<sub>2</sub>O, 1,2 g SDS. 6X yükleme boyasına 0,1 M DTT veya isteğe bağlı olarak %5 oranında β-merkaptolanol eklenir. Jel dikey elektroforez tankında 60 V, maksimum mA’de yaklaşık 3 saat koşurulduğunda preoteinler hemen hemen baştan sona kadar koşmuş olurlar.

### **Western Blot Protokolü**

SDS-PAGE elektroforezi bitince, jel oda ısısında ~5 dk. süreyle dH<sub>2</sub>O ile hafif çalkalamalı cihazda (Biometra, Wt 17) yıkanır. Sonra jel western transfer tamponu (25 mM Tris-Base, 195 mM Glisin, % 25 Metanol) içine alınarak ~20 dk. boyunca hafif çalkalamalı cihazda oda ısısında dengelenmesi sağlanır. (Towbin vd., 1979).

Jelin boyutuna göre kesilen blotlama işleminde kullanılacak 0.45 µm'lik PVDF membran (IPFL00010, Immobilon®-FL, Merck) önce 30' metanol ile muamele edilerek aktifleştirilir, daha sonra ~10' süreyle western transfer tamponu içinde hafif çalkalamalı cihazda, oda ısısında inkübe edilir.

İkişer adet alta ve ikişer adet üste olacak şekilde kesilmiş kalın filtre kağıtları (Sigma-Aldrich, P4681-100EA, Extra thick) western transfer tamponunda ıslatılır. Bunlardan iki tanesi blotmayı yapacak olan cihazın (Trans-Blot® Turbo, BIO-RAD) tablasına yerleştirilir, filtre kağıtlarının üzerine membran onun üzerine jel ve jelin üzerine de diğer iki filtre kağıdı konularak sandviç yapılır ve tablanın üst kapağı takılır ve blotlama işlemi, 25 V, 10 A, 30 dk. süreyle gerçekleştirilir.

Blotlama işleminden sonra membran ve jel ayrı ayrı kaplarda ~5 dk. süreyle, oda ısısında d.H<sub>2</sub>O ile hafif çalkalamalı cihazda yıkanır. Yıkamadan sonra PVDF membran 5 kez, 5 dk. süreyle TBS-T ile inkübe edilerek yıkanır. Sonra membranın protein içermeyen kısımlarının bloklanması amacıyla % 5 süt tozu içeren TBS-T ile g/b + 4 °C'de hafif çalkalamalı cihazda inkübe edilir.

SDS-PAGE jeli ise comassi boyası ile oda ısısında ~30 dk.- 1 saat süreyle boyanır, daha sonra d.H<sub>2</sub>O ile yıkanarak boyanın jelden uzaklaşması sağlanır ve görüntülenir.

Ertesi gün bloklamadan sonra PVDF membran 5 kez, 5 dk. süreyle TBS-T ile inkübe edilerek yıkanır. Sonra membran birincil antikor ile muamele edilir. Bu işlem tavşan poliklonal anti interferon beta (IFNβ FL-187 sc-20107 Santa Cruz) birincil antikoruyla % 5 süt tozu içeren TBS-T içinde oda ısısında ~2 saat (veya g/b + 4 °C'de) hafif çalkalamalı cihazda inkübe edilir.

Birincil antikor ile muameleden sonra membran 5 dk. süreyle TBS-T ile inkübe edilerek yıkanır. Sonra membran ikincil antikor ile (Goat Anti-Rabbit IgG (H&L)[HRP], Gen Script Corp.) % 5 süt tozu içeren TBS-T içinde oda ısısında ~2 saat (veya g/b + 4 °C'de) hafif çalkalamalı cihazda inkübe edilir.

İkincil antikor ile muameleden sonra membran 5 kez, 5 dk. süreyle TBS-T ile inkübe edilerek yıkanır. Sonra membrandan görüntü alabilmek için, karanlık bir ortamda ~3 mL TMB (Prod# 37574, Thermo) ile muamele edilerek varsa protein bantlarının görünmesi sağlanır. Bantların görünmesi TMB ile muameleden ~5 dk. sonra başlar. Membran görüntüledikten sonra (Samsung Galaxy Alpha, cep telefonu ;) Membran her zaman ışık görmeyecek şekilde saklanır.

**Alternatif görüntüleme:** Alternatif bir görüntüleme olarak, Li-Cor Odyssay-CLx cihazında (ikincil antikörlerin uçlarına takılan kırmızı ötesi boya sayesinde görüntü alınmasına sağlayan teknoloji yardımıyla), ikincil antikordan (IRDye® 800 CW Goat-anti-Rabbit IgG (H+L) 0.5 mg 926-32211, Li-Cor) 1:10000 oranında kullanılarak, aşağıdaki ayarlarda görüntü elde edildi.

Cihazın tablasında, sol alt köşeye membran yerleştirildi, bilgisayar yazılımından bu alan seçildi (8.7 x 6.1 cm), tarama kontrolü alanında; çözünürlük = 337 µm, medium, 0.5 nm olarak ayarlandı, 700 IR kapalı, 800 IR açık seçilerek tarama başlatıldı ve 4 dk. 30 sn. sürdü. Ayarlar değiştirilerek 337 µm, high ve 0,5 nm yapıldı, tarama ~8 dk. sürdü.

### **Metanol/Kloroform/Su ile Protein Çöktürmesi ve Tampon Değiştirme**

- ~100 µL protein örneği 1.5 mL ependorf tüpüne konulur.
- 400 µL % 100 metanol eklenir ve vortekslenir. Tüpün cidarında kalan sıvı spin atılarak toplanır.
- 100 µL kloroform eklenerek vortekslenir. (Yüksek fosfolipit içeren örneklerde gerekirse 200 µL kullanılabilir) Spin atılır.
- 300 µL mQ su (ultra saf su) faz ayrımı için eklenir ve vortekslenir.
- 13000 rpm'de 1dk. oda ısısında santrifüjlenir ve proteinler görünür hale gelir.
- Oluşan üst faz dikkatlice uzaklaştırılır. Protein tam ortadadır.
- 300 µL % 100 metanol eklenir ve vortekslenir.
- 13000 rpm'de 2 dk. oda ısısında santrifüjlenir ve proteinler pelet halinde görünür olur.
- Süpernatant uzaklaştırılır ve 10-15 dk. hava kurutma yapılır.

Alternatif olarak nitrojen veya argon gazı buharında pelet kurutulabilir. Peletin çok kurutulmamasına dikkat edilir. Çok kurursa proteinin çözünmesi zor olur. Sadece kloroform ve metanol ortamdan tamamen uzaklaşmaya kadar kurutulur. Pelet istenilen tamponda çözülür. Böylelikle ister konsantre edilebilir, isterse tampon değiştirilebilir, istenirse her ikisi birden yapılabilir.

Protein: MeOH:Kloroform:Su oranı her zaman 1:4:1:3'tür ve bu orana sadık kalınarak hacim artırılabilir. Bu protokol ile ortamda bulunan (varsa) SDS, Tx-100, tuz ve β-merkaptoetanol uzaklaştırılmış olur.

### EK-3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Tris Base (Applichem A2264)
- Tris-HCl (Sigma, 05432): 10 mM pH 7.5 olarak hazırlanan steril Tris-HCl
- Borik Asit (Bio Basic BB0044)
- İzopropanol (Riedel de Haen, 24137).
- Etanol (Riedel, 071029)
- Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma, E8751): Konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde dH<sub>2</sub>O'da çözülerek hazırlanmış ve çözelti +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Agaroz jel elektroforezinde, jel içerisinde farklı büyüklüklerde DNA'lara bağlanarak 312-365 nm UV ışığında DNA'ların görünür olmasını sağlamaktadır. Agaroz jel içerisine 0,5 µg/mL EtBr olacak şekilde eklenmektedir.
- Agaroz A (Biomax, IB70073): Agaroz jel elektroforezinde DNA'ların büyüklüklerine göre ayrılması için %0.7 ve %1 aralığında ki farklı yoğunluklarda hazırlanan jellerde kullanılmıştır. Jelin hazırlanması sırasında agarozun çözücü tamponu olarak 1X'lik TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) tamponu kullanılmıştır.
- 10X TBE (Tris- Borik Asit- EDTA): 108 gr Trizma base ve 55 gr borik asit tartılarak 600 mL dH<sub>2</sub>O'da tamamıyla çözülür ve ardından çözeltiliye 40 mL 0,5 M pH 8.0 EDTA eklenir, EDTA' nın çözülmesinin ardından tampon 1 L'ye tamamlanır. Hazırlanan tampon 1/10 oranında seyreltilerek 1X TBE olacak şekilde seyreltilmiş ve agaroz jel elektroforezinde kullanılmıştır.
- 6X DNA Yükleme Tamponu (Thermo, #R0611)
- DNA markör 0,5 µg/mL (Thermo, #SM0331)
- Tripton (Sigma, 95039)
- Maya ekstratı (Sigma, Y1625)
- Proteaz Pepton (Sigma, 82450)
- Sodyum Klorür NaCl (Merck, 1.06400)
- D (+) Glikoz monohidrat (Riedel-de Haen, 16301)
- Gliserol (Sigma, G2289): %80'lik gliserol *E. coli* hücrelerinin -80 °C stoklarının yapılmasında ve kimyasal kompotent hücre hazırlığında sırasında kullanılmıştır. %99'lık gliserolden dH<sub>2</sub>O ile %80'liğe steril dH<sub>2</sub>O ile seyreltilen gliserol otoklav edildikten sonra +4 °C'de muhafaza edilir.

- Kadmiyum Klorür (CdCl<sub>2</sub>) (Sigma, 439800): Protein ekspresyon deneylerinde MTT1 promotorunun indükleyecisi olarak kullanılan CdCl<sub>2</sub>, promotor bölgeye bağlanarak o promotor kontrolündeki genin kontrollü bir şekilde üretilmesine yardımcı olur. Stok solüsyonu 1000 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Paromomisin (Sigma, P9297): Stok solüsyonu 50 mg/mL hazırlanmış olan paromomisin, *Tetrahymena* antibiyotik direnç geni varlığında, transforme edilen plazmitin seçiciliğini sağlar.
- Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (Sigma, P4333): PPY ve SSP besiyerlerinde bakteri ve küf kontaminasyonunu engellemek amacıyla kullanılmıştır.
- Amfisilin (Sigma, A0104): *E. coli*' de yapılan klonlama deneylerinde pozitif klon seçiciliğinin sağlanmasında kullanılmıştır. Stok solüsyon (1000X) 100 mg amfisilin 1 mL steril dH<sub>2</sub>O'da çözülmesiyle hazırlanır ve 0.45 µm por çaplı membran filtre ile sterilizasyon yapılır. -20 °C'de muhafaza edilir.

#### **EK-4. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzimler**

##### **• Kullanılan Cihazlar**

Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj (Thermo IEC Micromax, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Allegra 25R), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave), PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal; Applied Biosystem, Veriti Thermal Cycler) , Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC Mini Cell EC320, Thermo EC Midi Cell Ec 330 ve BioRad Mini SubCell GT), Güç Kaynağı (Thermo Electrocorporation EC250-90), UV Jel Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), pH Metre (Crison, Basic 20), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Memmert D-91126), Nanodrop (Metek ND-100), Spektrofotometre (UV- 2101 PC Shimadzu), Terazi (Ohaus pro AV812), Gene Pulser Xcell (BioRad, 165-2666), Manyetik Karıştırıcı (Schott, SLK6), Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad, 165-2257)

##### **• Kullanılan Kitler ve Enzimler**

GeneJet Jel Saflaştırma Kiti (Thermo, #K0691), GeneJet Plasmid Mini Saflaştırma Kiti (Thermo, #K0691), GeneJet Plasmid Midi Saflaştırma Kiti (Thermo, #K0691), Primestar HS DNA Polimeraz (Takara, R010Q), Taq DNA Polimeraz (Fermantas, EP0401), T4 DNA Ligaz (NEB, M0202S), Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120)

## **EK-5. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri**

### **• LB Broth besiyeri (Lizojen Broth)**

1 L hazırlamak için 5 gr Maya ekstratı, 10 gr Tripton ve 5 gr Sodyum Klorür kullanılır. Hazırlanan karışım otoklav edilerek steril edilir ve oda sıcaklığında saklanabilir. *E. coli* hücrelerinin sıvı ortamda büyütülmesi amacıyla kullanılmıştır.

### **• LB Agar Besiyeri**

37 gr. LB agar 1 L dH<sub>2</sub>O'da çözülüp, 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edildikten sonra antibiyotik eklenmesi amacıyla 55°C'deki su banyosuna alınır ve ısıyı düştüğünde 1000X amfilisinden her 1 mL için 1 µL olacak şekilde 1X olarak eklenir ve petrilere yaklaşık 20'şer mL olarak paylaşılır. Kontaminasyonun engellenmesi amacıyla +4 °C'de saklanır. *E. coli* hücrelerinin büyütülmesinde katı besiyeri olarak kullanılmıştır.

### **• SPP besiyeri**

%2 proteaz pepton (10 gr), %0.1 maya ekstratı (1 gr), %0.2 glikoz (2 gr) ve %0.0003 10 mM FeCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (finalde 33 µM olacak şekilde yani 3300 µl) olacak şekilde 1lt besiyeri hazırlanmaktadır. PPY besiyerine benzemekle birlikte içeriği glikoz sayesinde zenginleştirilmiş, böylelikle elektroporasyon sonrasında ki kullanımlarında hücrelerin kendilerini daha kolay iyileştirmelerine yardımcı olmuştur.

## **EK-6. Klonlama Konakçısı *Escherichia coli* ve İfade Konakçısı *Tetrahymena thermophila***

### ***Escherichia coli***

Klonlama konakçısı olarak NEB 10-beta Competent *E. coli* hücreleri kullanılmış olup, bu hücreler DH10B ırkından türevlendirilmiştir. Irkın genotipi araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK ( $\phi$ 80  $\Delta$ (lacZ)M15) mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL (StrR)  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) şeklindedir. Ek olarak DH5 $\alpha$  ırkı da kullanılmıştır ve genotipi fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17şeklindedir.

### ***Tetrahymena thermophila***

*T. thermophila*'nın organizmal özelliklerine baktığımızda; silli, tek hücreli, 50  $\mu$ m x 20  $\mu$ m çaplı, 18°C-41°C gibi çok geniş bir sıcaklık aralığında tatlı sularda yaşayabilen bir organizmadır. Bu organizmanın hücresel fonksiyonları kontrol eden makroçekirdek (45ploid) ile kalıtım faaliyetlerini idare eden mikroçekirdek (2n=10) sitoplazması içinde birlikte bulunmaktadır. Basit ve ucuz kültürizasyon, 2-4 saat gibi kısa bölünme zamanına sahiptir.