



FLORESAN PROTEİN TEMELLİ FRET BİYONSENSÖRÜNÜN ÜRETİLMESİ VE GELİŞTİRİLMESİ

İBRAHİM İNCİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Haziran 2020

Her hakkı saklıdır

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FLORESAN PROTEİN TEMELLİ FRET BİYSENSÖRÜNÜN
ÜRETİLMESİ VE GELİŞTİRİLMESİ**

İBRAHİM İNCİR

TOKAT
Haziran - 2020

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**2019/71 proje numarasıyla Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Altyapı
Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.**

İbrahim İNCİR tarafından hazırlanan “**Floresan Protein Temelli FRET Biyosensörünün Üretilmesi ve Geliştirilmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 26 HAZİRAN 2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik Ana Bilim Dalı**’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

.....

ONAY

.....

Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

---/---/20--

TEZ BEYANI

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

İBRAHİM İNCİR

26 Haziran 2020

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FLORESAN PROTEİN TEMELLİ FRET BİYOSENSÖRÜNÜN ÜRETİLMESİ VE GELİŞTİRİLMESİ

İBRAHİM İNCİR

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSA GÖKÇE
İKİNCİ DANIŞMAN: ARŞ. GÖR. DR. SEMA BİLGİN

Förster veya Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET), iki florofor arasında meydana gelen radyoaktif olmayan enerji transferi olarak tanımlanmaktadır. FRET biyosensörlerinde, küçük organik boyalar, floresan proteinler ve kuantum noktacıklar olmak üzere üç ana tipte florofor kullanılmaktadır. Floresan proteinler, genetik olarak kodlanabilmesi ve hücrelerle uyumlu olmasından dolayı yaygın şekilde kullanılmaktadır. Floresan Protein temelli FRET (FP-FRET) biyosensörleri, enzim aktivitesi, hücre içi iyon konsantrasyonu, konformasyonel değişimler, protein-protein etkileşimleri gibi biyolojik süreçlerin görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Sunulan tez çalışması ile proteaz aktivitesinin FP-FRET biyosensörü yardımıyla tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, TEV proteaz enzimi model olarak seçilmiştir. mClover3-mRuby3 ve mNeonGreen-mRuby3 floresan çiftlerini içeren FRET biyosensörlerine ait plazmitlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir. Tasarlanan FP-FRET biyosensörüne ait genin ekspresyonu, rekombinant DNA teknikleri kullanılarak *E. coli* DH5α hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Ekspresyonu gerçekleştirilen füzyon protein, afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Sonuç olarak, TEV proteaz enziminin aktivitesi üretilen FP-FRET biyosensörü kullanılarak spektrofotometre cihazında gerçekleştirilen emisyon ölçümleri ile tespit edilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda, önemli biyolojik süreçlerde belirteç olarak kullanılan enzimlerin aktivite tayini için yeni FP-FRET biyosensörlerinin üretilmesi hedeflenmektedir.

2020, 79 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET), Biyosensör, Floresan Proteinler, Rekombinant DNA Teknolojisi

ABSTRACT

MASTER THESIS

PRODUCTION AND DEVELOPMENT OF FLUORESCENT PROTEIN BASED FRET BIOSENSOR

İBRAHİM İNCİR

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

**SUPERVISOR: PROF. DR. İSA GÖKÇE
CO-SUPERVISOR: R. A. SEMA BİLGİN**

Förster or Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) is defined as non-radioactive energy transfer between two fluorophores. Three main types of fluorophores are used in FRET biosensors, small organic dyes, fluorescent proteins and quantum dots. Fluorescent proteins are widely used because they are genetically coding and compatible with cells. Fluorescent Protein-based FRET (FP-FRET) biosensors are used to display biological processes such as enzyme activity, intracellular ion concentration, conformational changes, protein-protein interactions. With the presented thesis study, it was aimed to determine the protease activity with the help of the FP-FRET biosensor. In this context, TEV protease enzyme was chosen as a model. Plasmids of FRET biosensors containing mClover3-mRuby3 and mNeonGreen-mRuby3 fluorescent pairs were designed. Expression of the gene of the designed FP-FRET biosensor was performed in *E. coli* DH5 α cells using recombinant DNA techniques. The expressed fusion protein was purified by affinity chromatography. As a result, the activity of the TEV protease enzyme was determined by emission measurements performed on the spectrofluorometer device using the FP-FRET biosensor produced. In later studies, it is aimed to produce new FP-FRET biosensors for the activity determination of enzymes used in important biological processes.

YEAR, 79 PAGE

KEYWORDS: Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET), Biosensor, Fluorescent Proteins, Recombinant DNA Technology

ÖNSÖZ

Şahsına ve akademik hayatına saygı duyduğum, bir danışman olmaktan öte, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye ve değerli eş danışmanım Arş. Gör. Dr. Sema BİLGİN'e teşekkür ederim.

Aynı çalışma ortamını paylaşmaktan mutlu olduğum, bu tez çalışmasına fikir ve tecrübesiyle destek olan Arş. Gör. Özlem KAPLAN'a ve yoluma ışık tutan herkese samimiyetle teşekkür ederim.

Bu çalışmayı önce bilime sonra tüm güzel ve zor zamanlarımı paylaştığım anneme ve babama ithaf ediyorum.

İbrahim İNCİR

26 Haziran 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET).....	3
2.2. Biyosensör ve FP-FRET Temelli Biyosensörler.....	7
2.3. Floresan Proteinler.....	8
2.3.1 Floresan proteinlerin başlıca özellikleri.....	9
2.3.2 Yeşil floresan protein ve varyantları.....	13
2.3.3 Kırmızı floresan protein ve varyantlar.....	19
2.4. Rekombinant DNA Teknolojisi.....	27
2.4.1. Rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan vektörler.....	28
2.4.2. Rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretimi.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	35
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	36
3.1.3. Kullanılan çözeltiler.....	37
3.2. Yöntem.....	40
3.2.1. mClover3-mRuby3 FRET çifti.....	40
3.2.2. mNeonGreen-mRuby3 FRET çifti.....	49
3.2.2. TEV proteaz enziminin üretilmesi ve saflaştırılması.....	53
3.2.2. TEV proteaz kesimi.....	54
3.2.2. Spektrofluorometre analizi.....	55

4.	BULGULAR.....	56
4.1.	mClover3-mRuby3 FRET Çifti	56
4.1.1.	mClover3 geninin PCR ile çoğaltılması	56
4.1.2.	Restriksiyon enzimleri ile doğrulama kesimi	56
4.1.3.	DNA dizi analizi	58
4.1.4.	SDS-PAGE görüntüsü	59
4.2.	mNeonGreen-mRuby3 FRET Çifti	60
4.2.1.	mNeonGreen-mRuby3 çiftinin üretilmesi ve saflaştırılması.....	60
4.2.2.	mNeonGreen-mRuby3 çiftinin TEV proteaz ile kesimi.....	63
4.2.3.	Spektroflorometre analizi	66
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	69
6.	KAYNAKLAR	73
7.	ÖZGEÇMİŞ	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
bç	baz çifti
kb	kilobaz
µl	mikro litre
µM	mikro molar
M	Molar
mM	mili molar
nm	nano metre
rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)
Kısaltmalar	Açıklama
Amp	Ampisilin
APS	Amonyumpersülfat
BSA	Sığır Serum Albümin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSB	Frozen Storage Buffer
FP	Floresan Protein
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
GFP	Green Fluorescent Protein (Yeşil floresan protein)
IPTG	İzopropil β-D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
RFP	Red Fluorescent Protein (Kırmızı floresan protein)
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Florit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi

TAE	Tris-asetat-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. FRET için Jablonski diyagramı	3
Şekil 2.2. Spektral örtüşme grafiği.	4
Şekil 2.3. Farklı FRET biyosensörlerinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.4. Yeşil floresan proteinin yapısı.	14
Şekil 2.5. GFP kromoforunun oluşum mekanizması	15
Şekil 2.6. GFP'nin uyarılma ve emisyon dalga boyu	16
Şekil 2.7. Yeşil floresan protein varyantları	16
Şekil 2.8. Yeşil floresan proteinine ait mutasyon haritası	17
Şekil 2.9. DsRed tetramerinin genel yapısı.....	19
Şekil 2.10. DsRed'in uyarılma ve emisyon dalga boyu.....	20
Şekil 2.11. DsRed mutasyon haritası	21
Şekil 2.12. Yeni RFP varyantları	22
Şekil 2.13. Rekombinant DNA teknolojisine ait temel basamaklar	28
Şekil 3.1. mClover3 geni içeren plazmit.....	40
Şekil 3.2. mRuby3 geni içeren ve vektör olarak kullanılan plazmit.....	42
Şekil 3.3. mClover3-mRuby3 FRET çifti için tasarlanan yapı.....	43
Şekil 3.4. mNeonGreen-mRuby3 FRET çifti için tasarlanan plazmit	50
Şekil 3.5. mNeonGreen-mRuby3 genlerini içeren pET-30a vektörü	51
Şekil 4.1. mClover3 geninin %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	56
Şekil 4.2. Saflaştırılan plazmitlerin doğrulama kesimine ait agaroz jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.3. Pozitif plazmite ait DNA dizi analizinin kromatogram görüntüsü...	58
Şekil 4.4. Dizileme sonucu elde edilen amino asit sekansı	59
Şekil 4.5. mClover3-mRuby3 çiftine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	60
Şekil 4.6. mNeonGreen-mRuby3 çiftinin <i>E.coli</i> BL21 pLysE hücrelerinde üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	61
Şekil 4.7. mNeonGreen-mRuby3 çiftinin <i>E.coli</i> C41(DE3) hücrelerinde üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	62
Şekil 4.8. mNeonGreen-mRuby3 çiftinin <i>E.coli</i> DH5α hücrelerinden saflaştırılmasına ait SDS-PAGE görüntüsü.....	63
Şekil 4.9. mNeonGreen-mRuby3 biyosensörünün TEV proteaz ile kesimi	64
Şekil 4.10. mNeonGreen-mRuby3 FRET biyosensörünün TEV proteaz ile kesimine ait SDS-PAGE görüntüsü.....	65
Şekil 4.11. mNeonGreen-mRuby3 biyosensörünün kesimi sonrası ait emisyon ölçümleri	67
Şekil 4.12. FP-FRET biyosensörünün kesim öncesine ait görselleri.....	68
Şekil 4.13. FP-FRET biyosensörünün kesim öncesine ait görselleri.....	68

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan FRET çiftleri.	26
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	35
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	36
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler	41
Çizelge 3.4. PCR bileşenleri ve miktarları.	43
Çizelge 3.5. PCR Prosedürü	44
Çizelge 3.6. BamHI restriksiyon enzimi ile kesim	45
Çizelge 3.7. NheI restriksiyon enzimi ile kesim.....	45
Çizelge 3.8. Ligasyon bileşenleri ve miktarları	46
Çizelge 3.9. Doğrulama kesimi.....	47
Çizelge 3.10. mNeonGreen-mRuby3'ün TEV proteaz enzimi ile kesimi	54

1. GİRİŞ

FRET, iki florofofor arasında meydana gelen radyoaktif olmayan enerji transferi olarak tanımlanmaktadır (Piston ve Kremers, 2007). FRET biyosensörlerinde, küçük organik boyalar, floresan proteinler ve kuantum noktacıklar olmak üzere üç ana tipte florofofor kullanılmaktadır. Floresan proteinler, genetik olarak kodlanabilmesi ve hücrelerle uyumlu olmasından dolayı yaygın şekilde kullanılmaktadır. FP-FRET biyosensörleri, enzim aktivitesi, hücre içi iyon konsantrasyonu, konformasyonel değişimler, protein-protein etkileşimleri gibi biyolojik süreçlerin görüntülenmesinde kullanılmaktadır (Masharina vd., 2012).

Genetik olarak kodlanabilen floresan protein temelli biyosensörler, zaman ve mekâna ait veri akışını koruyarak hücre içindeki belirli biyokimyasal veya biyolojik tanıma süreçlerinin müdahalesiz (non-invazif) bir şekilde görüntülenmesine olanak sağlamaktadır (Ibraheem ve Campbell, 2010). Bu bağlamda, floresan proteinler ve floresan temelli biyosensörler *in vivo* uygulamalarda güçlü araçlar haline gelmektedir (Wang vd., 2009). Bu biyosensörler, plazmit DNA'nın transfeksiyonu ile hücrelere, dokulara ya da tüm organizmaya aktarılabilir. Böyle bir biyosensör yaklaşımının en büyük avantajı non-invazif (müdahalesiz) bir metot olması ve hücrelere zarar vermemesidir. Ayrıca floresan protein ailesinin çoğu durumda, konakçı hücreler için toksik olmadığı gösterilmiştir (Wang vd., 2009). Bununla birlikte, floresan proteinlerin yüksek hücre içi stabilitesi sayesinde bu biyosensörler hücrelerde uzun süre stabil kalabilmektedir (Bajar vd., 2016b).

Tez çalışmasında, TEV proteaz enziminin aktivitesini test edebilmek için mClover3-mRuby3 ve mNeonGreen-mRuby3 floresan çiftlerini içeren iki farklı FRET biyosensörünün üretilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda ilk olarak TEV proteaz enziminin aktivitesinin test edilebilmesi için FP-FRET biyosensörleri biyoinformatik araçlar kullanılarak tasarlanmıştır. Çalışmada FP-FRET biyosensörünün üretilmesi ve saflaştırılmasında rekombinant DNA teknikleri kullanılmıştır. Bu kapsamda mClover3-mRuby3 ve mNeonGreen-mRuby3 FRET biyosensörlerinin *E. coli* BL21 pLysE, *E. coli* C41(DE3) ve *E. coli* DH5 α hücrelerinde üretim çalışmaları yapılmıştır. Fakat sadece mNeonGreen-mRuby3 floresan çiftini içeren FRET biyosensörünün *E. coli* DH5 α hücrelerinde üretimi gerçekleştirilebilmiştir. Ekspresyonu gerçekleştirilen füzyon

protein, afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Ardından aktivite testinde kullanılacak TEV proteaz enzimi rekombinant olarak üretilip afinite kromatografisiyle saflaştırılmıştır. TEV proteaz enziminin aktivitesi üretilen FP-FRET biyosensörü kullanarak hem SDS-PAGE’de hem de spektroflore metre cihazında gerçekleştirilen ölçümler ile tespit edilmiştir. FP-FRET biyosensöründe gerekli modifikasyonlar yapılarak, önemli biyolojik süreçlerde belirteç olarak kullanılan enzimlerin aktivite tayinini mümkün kılacak şekilde geliştirilmesi hedeflenmektedir.

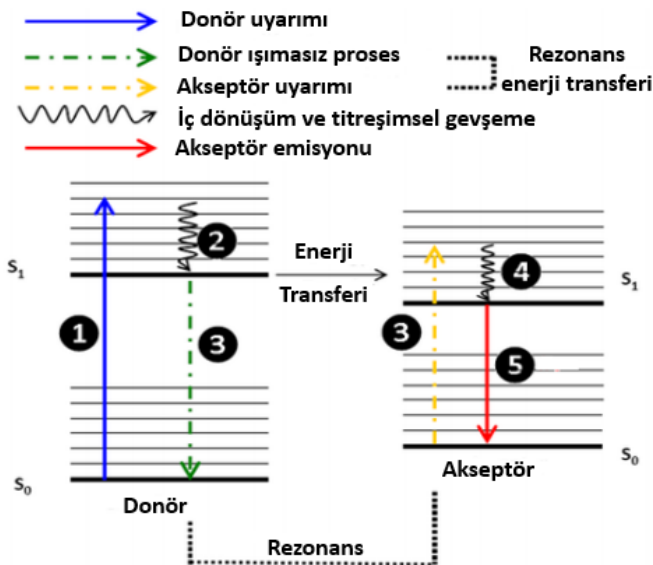


2. KAYNAK ÖZETLERİ/KURAMSAL TEMELLER/GENEL BİLGİLER

2.1. Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET)

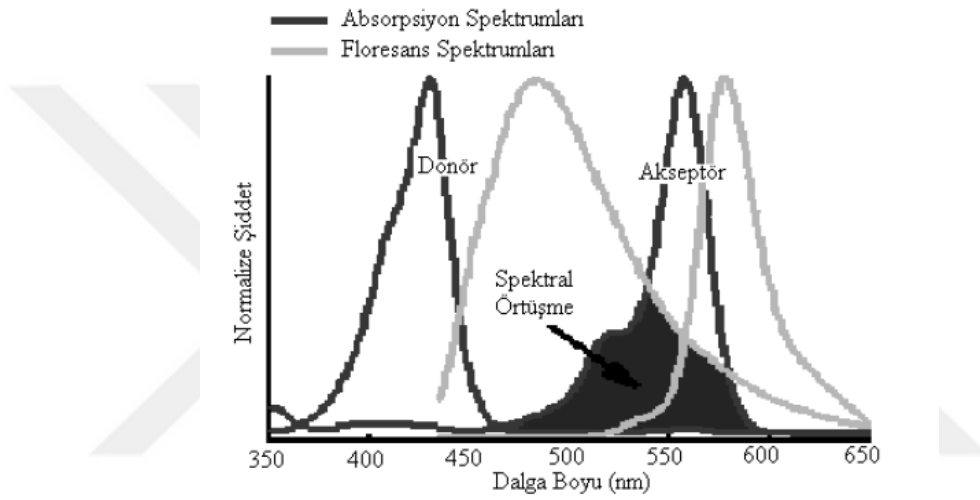
İlk kez 1946'da Theodor Förster tarafından tanımlanan, Förster veya floresan rezonans enerji transferi (FRET); uyarılmış durumundaki bir donör floroforun, ışımasız olarak enerjisini komşu bir akseptör florofora aktardığı, böylece akseptörün karakteristik floresan ışık yaymasına neden olan bir mekanizmadır (Bajar vd., 2016b). Bu mekanizma, uyarılmış durumundaki donör grubun uyarılma enerjisinin uzun mesafeli dipol-dipol etkileşim aracılığıyla akseptör gruba aktarıldığı bir prosestir (Jares-Erijman ve Jovin, 2003).

Donör grup bir foton tarafından uyarılır ve daha sonra en düşük enerjili singlet durumuna (S_1) geçer. Akseptör grup çok uzakta değilse, donör grubun elektronunun temel durumuna (S_0) geri dönmesi halinde salınan enerji aynı anda akseptör grubunu uyarabilir. Bu ışımasız olarak gerçekleşen süreç 'rezonans' olarak adlandırılır. Ardından uyarılan akseptör grup floresan ışık yayar ve eğer söndürme durumları mevcut değilse temel duruma geri döner (Anonim, 2019). Şekil 2.1'de bu prosese ait enerji transferi Jablonski diyagramı ile gösterilmiştir.



Şekil 2.1. FRET için Jablonski diyagramı (Anonim, 2019)

Enerji transferi, ışıkla uyarılan donör floroforun elektronik olarak indüklenmesi sonucu meydana gelen titreşimler, akseptör floroforun elektronik enerji aralığı ile aynı rezonansta olduğunda meydana gelmektedir (Tokmakoff, 1959). Bu bağlamda, enerji aktarımının gerçekleşmesi için donör molekülün emisyon spektrumu ile akseptör molekülün absorpsiyon spektrumu birbiriyle örtüşmelidir (Maria-Chantal Chirio-Lebrun, 1998). Bu durum spektral örtüşme olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Spektral örtüşme grafiği (Hussain, 2019)

FRET, donör grubun absorpsiyon ve akseptör grubun emisyon spektrumları arasında önemli bir örtüşme olduğunda (> %30) ve uygun mesafede bulunan (genellikle 1-10nm) iki florofor grup (donör ve akseptör) arasında meydana gelmektedir (Bajar vd., 2016b; Piston ve Kremers, 2007). Bu durum FRET verimi (E) ile karakterize edilmektedir. FRET E, belirli bir durumda donörden akseptör florofora enerji transferinin yüzdesini belirtir ve aşağıdaki denklem ile kantitatif olarak tanımlanmaktadır (Bajar vd., 2016b).

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

Eşitlikte; r, donör ve akseptör dipoller arasındaki mesafe; R_0 , ise Förster sabiti olup, FRET E'nin %50 verimlilikte olduğu mesafedir. Başka bir ifadeyle uyarılmış bir

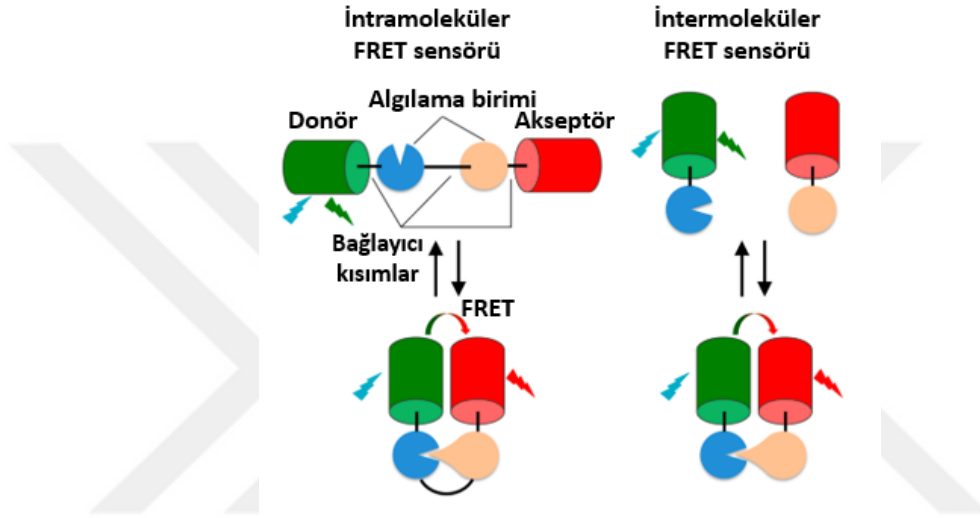
donörün enerjisinin yarısını FRET aracılığı ile akseptöre transfer ettiği mesafe olarak tanımlanmaktadır (Bajar vd., 2016b).

FRET çiftlerinin verimini belirleyen kilit elemanlar; spektral örtüşme, donör kuantum verimi, akseptörün ekstinksiyon (absorpsiyon) katsayısı, dalga boyu ve florofoforların mesafesi ve yönüdür. Burada ifade edilen kuantum verimi, yayılan fotonların sayısının, absorplanan fotonların sayısına oranı olarak tanımlanmaktadır. Ekstinksiyon katsayı ise, bir kimyasal türün veya maddenin, belirli bir dalga boyunda ışığı ne kadar güçlü absorpladığının bir ölçüsüdür (Bajar vd., 2016b).

FRET verimliliğini artırmak için donör grubunun, fotonları absorbe etme ve foton emisyonu konusunda yeterli olmalıdır. Bu durum, donör grubunun yüksek bir ekstinksiyon katsayısına ve yüksek bir kuantum verimine sahip olması ile mümkündür. Ayrıca, donörün emisyonu ile akseptörün absorpsiyon spektrumlarındaki örtüşmenin artması, dolayısıyla enerji transferinin ve FRET verimliliğinin artması anlamına gelmektedir (Anonim, 2019).

FRET donör ve akseptör dipoller arasında 1-10 nm aralığındaki mesafeye son derece duyarlı olduğu için FRET tabanlı biyosensörler protein-protein etkileşimleri, proteinlerin konformasyonel değişiklikleri, hücre içi iyon konsantrasyonları ve enzim aktiviteleri gibi moleküler seviyede değişiklikler gösteren birçok biyokimyasal aktiviteyi izlemek için nano seviyede bir spektroskopik cetvel gibi kullanılabilir. FRET biyosensörlerinin biyokimyasal testlere kıyasla avantajı, optik olarak gerçekleştirilmesiyle birlikte canlı hücrelere zararı olmayan ve minimal düzeyde invaziv olarak gerçekleştirilen bir görüntüleme aracıdır (Bajar vd., 2016b). FRET biyosensörleri iki florofoforun aynı moleküle bağlı olup olmadığına göre iki kategoriye ayrılmaktadır: 1. Molekül içi (intramoleküler) tipte, donör ve akseptör florofoforlar aynı moleküle bağlanır, böylece molekülde meydana gelen konformasyonel değişiklikler FRET'i indüklemektedir 2. Moleküller arası (intermoleküler) tipte, donör ve akseptör florofoforlar farklı moleküllere füzyon şeklinde eklenir ve bağımsız moleküller birbirine çok yakın oldukları zamanda FRET oluşumu meydana gelmektedir (Şekil 2.3) (Miyawaki, 2011).

İntermoleküler biyosensörler, bilhassa hücre içindeki protein-protein etkileşimlerinin saptanmasından kullanılmaktadır. Bununla birlikte, FRET'in ölçülmesi için donör floresanın FRET kanalına akışı ve akseptör floroforun eksitasyonunun dikkatlice düzenlenmesi gerekir, bu durum rutin uygulamalar için moleküller arası FRET biyosensörlerinin kullanımını zorlaştırır (Aoki vd., 2012).



Şekil 2.3. Farklı FRET biyosensörlerinin şematik gösterimi (Bajar vd., 2016b).

Moleküller arası tipin aksine, molekül içi FRET biyosensörlerinin kullanımı basittir. FRET biyosensörünün ifadesi ve donör ve akseptör floresan ışıma yapması FRET görüntüsünü elde etmek için yeterlidir. Bununla birlikte, molekül içi FRET biyosensörlerinin geliştirilmesi zahmetli bir iştir çünkü çoğunlukla protein faaliyetlerinin izlenmesi için sensör ve ligand domainleri (algılama birimi) ve dört bileşenin sırası, yani akseptör, donör, sensör ve ligand alanlarının sırası, yalnızca deneme yanılma yoluyla optimize edilebilir (Aoki vd., 2012).

2.2. Biyosensör ve FP-FRET Temelli Biyosensörler

Biyosensör, moleküler bir tanıma olayını algılanabilir bir fizikokimyasal sinyale dönüştüren araç olarak tanımlanmaktadır. Genelde biyosensör, hedef biyolojik veya kimyasal molekül için bir tanıma elementi ve çıkış sinyali sağlamak için bir dönüştürücüden oluşmaktadır (Wang vd., 2009).

Çoğu biyosensörde tanıma elementi olarak, nükleik asitler (DNA, RNA) ve proteinler kullanılmaktadır. Sensörlerde sinyal dönüşümü için elektrokimyasal, optik, manyetik ve termal algılamaya bağlı birçok algılama metodu geliştirilmiştir. Bu metodlar içerisinde optik olarak floresan tekniği ile algılama, yüksek hassaslık, yüksek 3 boyutlu çözünürlük ve düşük maliyetten dolayı oldukça ilgi çekmektedir (Wang vd., 2009).

FRET biyosensörlerinde, küçük organik boyalar, floresan proteinler ve kuantum noktacıklar olmak üzere üç ana tipte florofor kullanılmaktadır. Fakat floresan proteinler, genetik olarak kodlanabildiği ve hücrelerle uyumlu olduğundan dolayı FRET temelli biyosensörlerde florofor kaynağı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Buna karşılık, organik boyalar ve kuantum noktacıklar, biyosensör alt birimlerine antikorların yardımı olmadan etiketleme yeteneğine sahip olmaması nedeniyle yapılabilecek biyosensör sayılarını sınırlamaktadır (Masharina vd., 2012).

Tüm FRET biyosensörlerde, optimum FRET çiftlerinin (donör ve akseptör floroforlar) seçilmesi, tasarlanacak biyosensörlerin performansı açısından en önemli parametredir (Piston ve Kremers, 2007). Floresan proteinler, dokuya spesifik promotorlar ile kullanılarak yüksek hücresel özgüllük sağlarlar, ayrıca ilgili hücre içi bölgelerin veya yalnızca ilgili hücre tiplerinin aktivitelerini rapor etmeye olanak sağlayan hücre içi hedefleme sekansları yardımıyla yüksek hücresel spesifikliğe sahiptirler (Bajar vd., 2016b).

FP-FRET biyosensörlerinin, virüs enfeksiyonu veya transfeksiyon aracılığıyla *in vitro* ve *in vivo* koşullarda hücre içerisine girişinin kolay olmasına karşın, kimyasal boya veya kuantum noktacıklı bazlı FRET biyosensörlerinin hücrelere girişinde birtakım zorluklar bulunmaktadır. Ayrıca, kimyasal boya veya kuantum noktacıklı temelli FRET biyosensörleri canlı hücrelerde stabil değildir ve *in vivo*'da vücut tarafından hızla uzaklaştırılabilirler (Masharina vd., 2012). Bununla birlikte, FP-FRET biyosensörleri,

FP'lerin yüksek hücre içi stabilitesi nedeniyle hücrelerde uzun süre kalabilmektedir. Örneğin, EGFP hücrelerde 24 saatten daha uzun bir yarı ömre sahiptir (Bajar vd., 2016b). Ayrıca, stabil hücre hatlarında eksprese edilen FRET biyosensörleri, yüksek verimli ilaç taramasına olanak sağlayan ve FRET görüntülemeye hücre-hücre canlılığını (cell-cell viability) azaltan antibiyotik direnç varlığında kolayca elde edilebilir (Aoki vd., 2012).

Geliştirilmiş optik özelliklere sahip FP'lerin çeşitliliği, yüksek FRET verimliliğine sahip FRET çiftlerini oluşturmak için FP'lerin uyarlanması ve yüksek hassaslıkta FRET biyosensörlerinin geliştirilmesini mümkün kılmıştır (Bajar vd., 2016b). Floresan protein-FRET temelli biyosensörler, enzim aktivitesi, hücre içi iyon konsantrasyonu, konformasyonel değişimler, protein-protein etkileşimleri gibi biyokimyasal olayların görüntülenmesinde kullanılmaktadır (Bajar vd., 2016b).

Genetik olarak kodlanabilen bu biyosensörler, plazmit DNA'nın transfeksiyonu ile hücrelere, dokulara ya da tüm organizmaya aktarılabilmektedir. Böyle bir biyosensör yaklaşımının en büyük avantajı non-invazif (müdahalesiz) bir metod olması ve hücrelere zarar vermemesidir. Ayrıca floresan protein ailesinin çoğu durumda, konakçı hücreler için toksik olmadığı gösterilmiştir (Wang vd., 2009). Genetik olarak kodlanabilen floresan protein temelli biyosensörler, zaman ve mekâna ait veri akışını koruyarak hücre içindeki belirli biyokimyasal veya biyolojik tanıma süreçlerinin non-invazif bir şekilde görüntülenmesine olanak sağlamaktadır (Ibraheem ve Campbell, 2010). Bu bağlamda, floresan proteinler ve floresan temelli biyosensörler *in vivo* uygulamalarda güçlü araçlar haline gelmektedir (Wang vd., 2009).

2.3. Floresan Proteinler

Proteinlerin, hücre içindeki çeşitli biyokimyasal süreçlerin düzenlenmesinde büyük rolü olan, karmaşık biyolojik moleküllerden biri olduğu bilinmektedir. Proteinlerin ana karakteristik özelliklerinden biri, çeşitli biyolojik moleküllere spesifik olarak ve yüksek afinite ile bağlanmasıdır (Wang vd., 2009).

Floresan proteinler, kendi polipeptid dizileri içinde 3 aminoasitlik bir sekans tarafından oluşturulan kromofor yapısına sahip olup, yapısal olarak birbirine benzeyen, protein sınıfının üyeleridir. Kromofor yapısına bağlı olarak her floresan protein, bir uyarma (excitation) ve emisyon dalga boyuna sahiptir. Farklı dalga boylarında floresan ışık yayan, çok sayıda floresan proteinler bilinmektedir.

GFP (Green Fluorescent Protein) keşfedilen ilk floresan protein olarak bilinmektedir. Osamu Shimomura tarafından deniz anası *Aequorea victoria*'dan izole edilerek, bu proteinin ultraviyole ışık altında yeşil renkte parladığı keşfedilmiştir. Martin Chalfie, deneylerinden birinde *Caenorhabditis elegans* canlısına ait altı ayrı hücreyi GFP yardımıyla renklendirerek, GFP'nin çeşitli biyolojik olaylarda floresan etiket olarak kullanılmasının mümkün olduğunu göstermiştir. Roger Y. Tsien, yeşilin ötesine geçerek farklı renklerde floresan proteinleri geliştirmiştir. Bu durum, bilim insanlarının aynı anda birkaç farklı biyolojik süreci takip etmelerine olanak sağlamıştır (Wang vd., 2009). Shimomura, Chalfie ve Tsien yaptıkları çalışmalardan dolayı “yeşil floresan proteininin keşfi ve gelişimi” için 2008’de Kimya dalında Nobel Ödülü almışlardır (Hochreiter vd., 2015).

Genetik olarak kodlanabilen bir etiket olan GFP, canlı hücrelerdeki ve organizmalardaki yapıların ve süreçlerin doğrudan görüntülenmesini sağlayan benzersiz bir araç haline dönüşmüştür (Chudakov vd., 2010). Daha sonra, GFP benzeri floresan proteinlerin yapısına, biyokimyasına ve biyofiziğine yoğun bir ilgi ortaya çıkmıştır. Bu durum, floresan proteinler ile bunların moleküler ve hücre biyolojisindeki temel problemleri çözme konusundaki uygulamaların, konuya ilişkin bilimsel yayınların artmasına yol açmıştır (Chudakov vd., 2010).

2.3.1. Floresan proteinlerin başlıca özellikleri

Floresan parlaklık

Parlaklık, floresan proteinlerin en önemli özelliklerinden biridir. FP'nin yüksek parlaklığı, genellikle hücre biyolojisi uygulamaları için ek bir avantajdır. Tanım olarak, FP'nin moleküler parlaklığı, *in vitro* olarak ölçülen bir molar sönüm katsayısı ve

kuantum veriminin ürünüdür. Sönüm katsayısı, dalga boyunun bir fonksiyonu olduğu için, bir FP'nin etkin parlaklığı uyarılma ışığının dalga boyuna bağlıdır. Ayrıca etkili parlaklık, floresanı tespit etmek için kullanılan emisyon filtre setleri ile belirlenmektedir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011). FP'ler genellikle hücre içinde eksprese edilerek hücrelerin görselleştirilmesini sağlar. *In vitro* koşulda ölçülen bir floresan proteinin parlaklığı, her zaman canlı hücrelerde gözlenen gerçek parlaklığına karşılık gelmemektedir (Kremers vd., 2007). *In vivo* parlaklık, spektral özelliklerin dışında, ekspresyon hücre tipine, ekspresyon verimine, mRNA ve protein stabilitesine, kromofor olgunlaşmasının hızına ve füzyon protein partneri gibi bir dizi parametreye bağlıdır. Bu nedenle, hücrelerle ilgili belirli bir uygulamada en iyi FP'yi seçmek için, teorik bilgiler esas alınarak davranışlarını tahmin etmek imkansız olduğu için, optimal birkaç adayın taranması tavsiye edilmektedir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

Olgunlaşma: Protein katlanması ve kromofor oluşumu

Floresan protein olgunlaşması, protein katlanması ve kromofor oluşumunu içeren iki ardışık adımdan meydana gelmektedir. Bilinen tüm FP'lerin üçüncül yapısı, çözücü moleküllerin kromofor sönümlemesini önlemek için, 11 adet 'β-levha' ile sıkı bir şekilde örülmüş oldukça korunaklı bir yapıya sahiptir. GFP benzeri floresan proteinlerinin temel özelliği, proteinin floresan özelliklerinden sorumlu olan kromofor oluşumunun herhangi bir kofaktör veya enzime ihtiyaç duyulmaksızın, sadece moleküler oksijen gerektirmesidir. Kromofor, FP'nin iç amino asit rezidülerini içeren birkaç ardışık otokatalitik reaksiyonun bir sonucu olarak üretilmektedir. 1999'da ilk kırmızı floresan protein klonlanmış olmasına rağmen, yakın zamana kadar kırmızı kromofor oluşumunun gerçek mekanizması ortaya çıkarılamamıştır. RFP (red fluorescent protein)'lerin post-translasyonel modifikasyonlarının GFP'lerden daha karmaşık olduğu ve her zaman kırmızı kromofor oluşumuna yol açmadığı gösterilmiştir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

Floresan bir proteinin olgunlaşma süresi, dakikalar içinde tamamlanırken bazıları için bu durum saatler almaktadır. Floresan proteinin hızlı olgunlaşması, promotor aktivasyonu ve translasyonel olayların tespit edilmesini sağlarken, yavaş olgunlaşan

FP'ler oldukça sınırlı sayıda uygulamalara sahiptir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011). Olgunlaşma kinetiği, genellikle anaerobik koşullar altında ekspresyondan sonra, hızlı bir şekilde saflaştırılmış floresan proteinler kullanılarak ölçülmektedir (Merzlyak vd., 2007). Alternatif olarak olgunlaşma, floresan protein ekspresyonunun indüklenmesinden sonra yaşayan bakterilerde görüntülenmektedir (Kremers vd., 2007). Ayrıca *in vivo*'da üretilen bir floresan proteinin olgunlaşma oranının ve verimliliğinin; oksijen konsantrasyonuna, sıcaklığa, eksprese edilen hücrenin tipine ve füzyon protein ortağına bağlı olduğu bilinmektedir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

Oligomerleşme ve sitotoksiste

FP'lerin oligomerizasyonu ve sitotoksitesi hücre biyolojisinde kullanımları açısından önemli bir konudur. Protein dizisine ve hücre ortamına bağlı olarak, FP'ler farklı derecelerde kuartern yapı gösterebilmektedir. Ayrıca daha karmaşık yapıda olan *Anthozoan* kaynaklı floresan proteinler spesifik olmayan yüksek dereceli agregatlar oluşturabilmektedir. Bu, proteinin oligomerizasyon ve agregat oluşturma eğilimi ile hedef proteinlerin yanlış konumlandırılmasına, fonksiyonlarının bozulmasına, sinyal kaskadlarının karışmasına ve hücre toksisitesine neden olmaktadır (Piatkevich ve Verkhusha, 2011). Genellikle hücrelerde parlak floresan noktalara ve yüksek sitotoksiteye neden olan RFP'lerin agregasyonu, pozitif ve negatif yüklü yüzeyler arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. FP'lerin makromoleküller ile arasındaki etkileşimler, proteinin N-terminaline yakın pozitif yüklü amino asit kümesinin, negatif yüklü veya nötr kalıntılarla değiştirilmesiyle önemli ölçüde azaltılmaktadır (Yanushevich vd., 2002). Floresan proteinin N- ve C- terminal uçlarda yapılan optimizasyon çalışmaları ile RFP'lerin sitotoksitesi önemli ölçüde azaltılmıştır (Strack vd., 2008).

Mutagenез yoluyla doğal tip RFP'lerin monomerleştirilmesi, tetramer oluşturma yeteneğinin kaybı ile; floresan parlaklığının ve protein olgunlaşma oranlarının önemli ölçüde azalmasına neden olmaktadır (Campbell vd., 2002; Kredel vd., 2009). Füzyon yapılar için kullanılacak floresan proteinler, hedeflenen proteinin fonksiyonu ve lokalizasyonu ile etkileşimini en aza indirmek için monomerik yapıda olması gerekmektedir. Bununla birlikte, tetramerik ve dimerik FP'ler hücrelerin ve organellerin lümen boşluklarının etiketlenmesi için uygundur (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

pH stabilitesi

Floresan proteinler, geniş bir pH aralığında karardır. Bu nedenle hızlı denatürasyon ve kromofor degradasyonu ancak 2'nin altında ve 12'nin üzerindeki pH değerlerinde gözlenmektedir. Oligomerizasyon, FP'lerin genel pH stabilitesini artırma eğilimindedir (Vrzheshch vd., 2000).

Bununla birlikte, FP'lerin spektroskopik özellikleri, fizyolojik pH aralığından etkilenebilir. Bir floresan proteinin, floresan maksimum değerinin yarısına eşit olduğu pH değeri, pKa olarak belirtilir ve floresan proteinlerin pH stabilitesi karşılaştırmaları için kullanılmaktadır. Bugüne kadar geliştirilen RFP'lerin çoğunluğu, 4.0 ile 6.5 arasında değişen belirgin bir pKa değerine sahiptir. Öte yandan, golgi, endozomlar, lizozomlar, salgı granülleri ve diğer asidik organellerde floresan proteinlerin kullanımı ve görüntüleme açısından yüksek pH stabilitesi önemli bir avantajdır (Hanson vd., 2002).

Fotostabilite

Tüm organik floroforlar, uzun süreli aydınlatma sırasında geri dönüşümsüz foto-beyazlatma (foto ağartma) işlemine maruz kalmaktadır (Shaner vd., 2008). Literatürde 'photobleaching' (foto ağartma) terimi, bir floresan boya veya florofor molekülünün belirli bir süre floresan ışık yaydıktan sonra meydana gelen fotokimyasal değişim olarak bilinmektedir. Floresan proteinlerde foto-ağartma süreci, birçok küçük molekülü boyadan çok daha yavaş bir oranda gerçekleşmektedir. Ek olarak, farklı floresan

proteinler arasında hatta çok benzer optik özelliklere sahip FP'ler arasında bile foto-ağartma oranında önemli farklılıklar söz konusudur. Sınırlı sayıda görüntü gerektiren deneylerde (yaklaşık 10 veya daha az), fotostabilite genellikle önemli bir faktör değildir, ancak en fotostabil proteini seçmek, aynı hücre veya alanın çok sayıda görüntüsünü gerektiren deneylerde kritik öneme sahiptir (Shaner vd., 2008, 2005).

Nükleotid ve aminoasit sekansının optimizasyonu

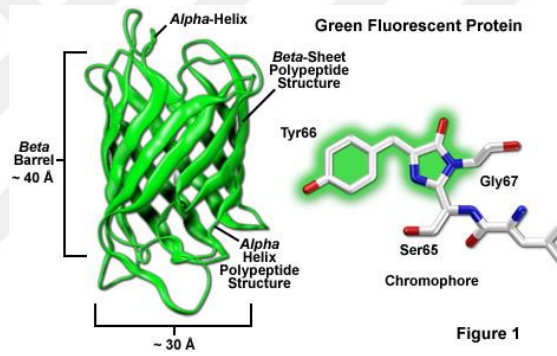
Floresan proteinlerin orijinal kaynağı olan denizanası ve mercanlar, DNA kodon kullanımı bakımından memelilerden farklıdır. Kodon optimizasyonu ile bir FP'nin, memeli hücrelerinde ekspresyonu geliştirerek, floresan sinyal önemli ölçüde arttırılmaktadır (Zolotukhin vd., 1996). Kodon kullanım analizi (ExPASy) ve mRNA yapı tahmini (Zuker, 2003) için mevcut yazılımlar, model organizma veya belirli hücre tiplerinde FP ekspresyonunun optimizasyonu için kullanılmaktadır (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

Bir FP'nin amino asit dizisinin, özellikle protein katlanmasında amino asit dış kalıntılarının ve N- ve C-terminaldeki amino asit içeriğinin analizi, FP füzyon yapılarının yanlış lokalizasyonunun önlenmesine yardımcı olmaktadır. Dış sistein kalıntıları ve N-glikozilasyon bölgeleri, endoplazmik retikulumdaki oligomerizasyon nedeniyle FP füzyonlarının yanlış katlanmasına ve yanlış lokalizasyona neden olmaktadır (Jain vd., 2001). İstenmeyen FP füzyon davranışı, tüm dış sisteinlerin ve glikozilasyon bölgelerinin yer değiştirilmesi ve hedefleme domainlerinin kesilmesi ile ortadan kaldırılmaktadır (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

2.3.2. Yeşil floresan protein ve varyantları

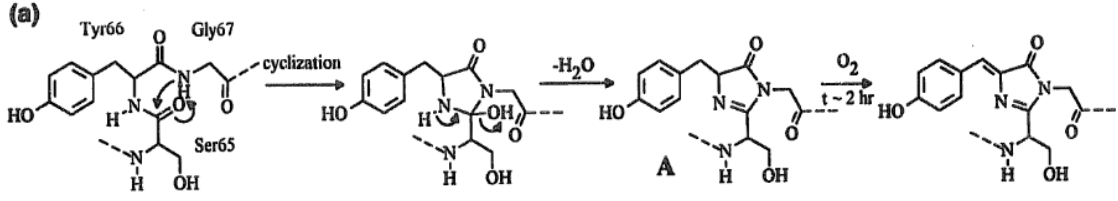
Bilinen floresan proteinlerden ilki olan, yeşil floresan protein (Green fluorescent protein-GFP) 1962'de Shimomura tarafından keşfedilerek, *Aequorea Victoria* denizanasından izole edilmiştir (Shimomura vd., 1962). GFP'nin kristal yapısı, merkezinde bir α -heliks ve etrafında 11 adet β -kırmalı tabaka ile çevrelenen silindirik benzeri bir protein olduğu gösterilmiştir (Orm vd., 1996; Yang vd., 1996). Floresan

proteinlerin silindirik yapılarından dolayı ısı ve kimyasal denatürasyonun yanı sıra proteolizise karşı dirençli olduğu bilinmektedir (Chudakov vd., 2010). Floresan protein üyelerinin hemen hemen hepsi bu genel 3 boyutlu yapıyı paylaşmaktadır (Şekil 2.4). Doğal GFP proteinin yaklaşık olarak 30 kDa olduğu SDS-jel elektroforez yöntemi ile tespit edilmiştir (Prendergast ve Mann, 1978). *A. Victoria* 'dan elde edilen yeşil floresan protein 238 amino asit içermektedir (Prasher vd., 1992). Prasher ve arkadaşları tarafından GFP geni ilk kez 1992'de klonlanmıştır. Daha sonra, *E. coli* bakterisinde GFP geninin ekspresyonu gerçekleştirilmiştir (Inouye ve Tsuji, 1994). Aynı zamanda, yapılan bir çalışma ile GFP'nin *in vivo* uygulamada floresan bir etiket olarak kullanımı gösterilmiştir (Chalfie vd., 1994).



Şekil 2.4. Yeşil floresan proteinin yapısı (Piston vd., y.y.)

GFP proteini merkezinde bulunan Ser65-Tyr66-Gly67 aminoasitlerinden (trimer=üçlü yapı) oluşan bir kromofora sahiptir (Prasher vd., 1992). Kromofor; floresan proteinlerde, floresan ışımının meydana gelmesinden sorumlu bölgedir. Kromofor polipeptid içindeki Ser-dehidroTyr-Gly rezidülerinin siklizasyonu ile oluşmaktadır (Cody vd., 1993). GFP, görünür floresan ışımını Ser65, Tyr66 ve Gly67'nin siklizasyonu ve tirozin aminoasidinin 1,2-dehidrojenasyonu ile oluşturulan bir *p*-hidroksibenzilendiimidazolinon kromoforuna borçludur. Kromofor oluşum mekanizmasındaki son adımı, atmosferik oksijen tarafından, Try66 aminoasidinin hidrosibenzil yan zincirinin oksidasyonu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.5) (Cubitt vd., 1995).

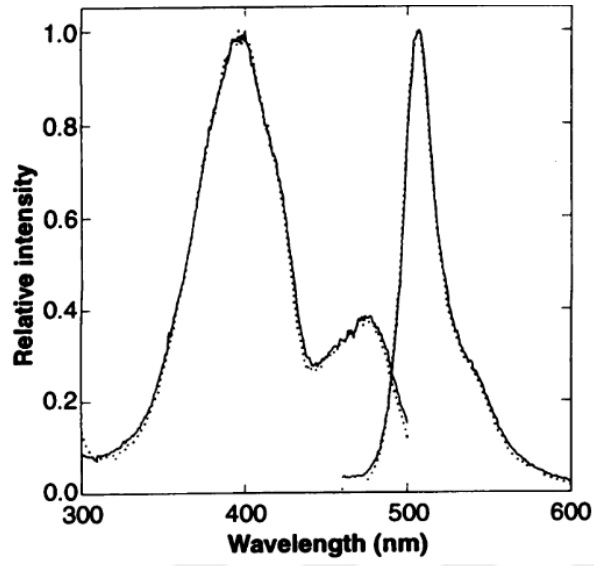


Şekil 2.5. GFP kromoforunun oluşum mekanizması (Cubitt vd., 1995)

GFP benzeri proteinlerin kromoforlarının araştırılmasına büyük çabalar sarf edilmiştir. Bu çalışmalar ile kromoforların kimyasal yapıları açığa çıkarılmıştır, ayrıca oluşumlarının genel mekanizmaları hakkında fikirler ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, daha karmaşık yapıdaki kırmızı floresan proteinlerden bahsetmeksizin, en çok çalışılan GFP kromoforu için bile, kromoforun olgunlaşması sırasında gerçekleşen moleküler olayların tam dizisi hala aktif bir tartışma konusudur (Chudakov vd., 2010).

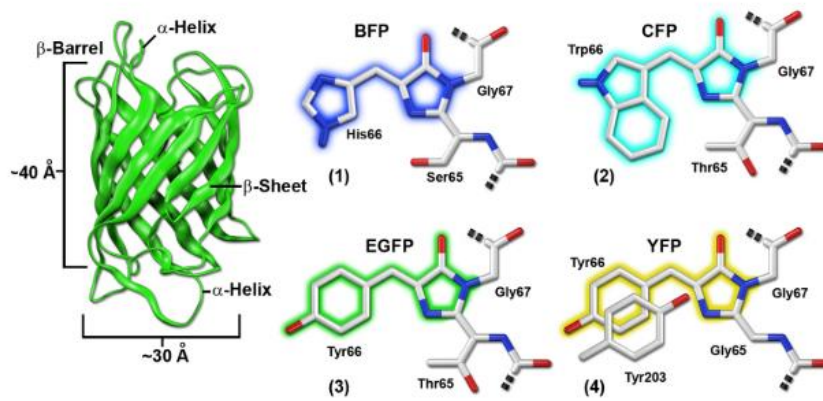
Kromofor, floresan proteinlerin tartışmasız en ilginç kısmıdır. Pigmentlerin biyosentezi yaygın olarak, birkaç spesifik enzim tarafından katalize edilen ve düşük moleküllü substratları ve kofaktörleri içeren çoklu ardışık reaksiyonlar yoluyla meydana gelmektedir. Aksine, floresan proteinler, moleküler oksijen dışında herhangi bir harici kofaktör ve substrat olmaksızın kendi iç amino asitlerini modifiye eden eşsiz bir “enzim” olarak hareket etmektedir. Bu özellik, hemen hemen her heterolog sistemde ekspresyon sonrası floresan kabiliyeti kazanarak floresan proteinlerin tüm pratik kullanımlarının temelini oluşturmaktadır (Chudakov vd., 2010).

Doğal kaynaklı GFP proteini, yardımcı bir faktörlere ihtiyaç duymaksızın, 395 nm’de uyarılma üzerine 508 nm’de maksimum emisyon vermektedir (Şekil 2.6) (Heim vd., 1994).



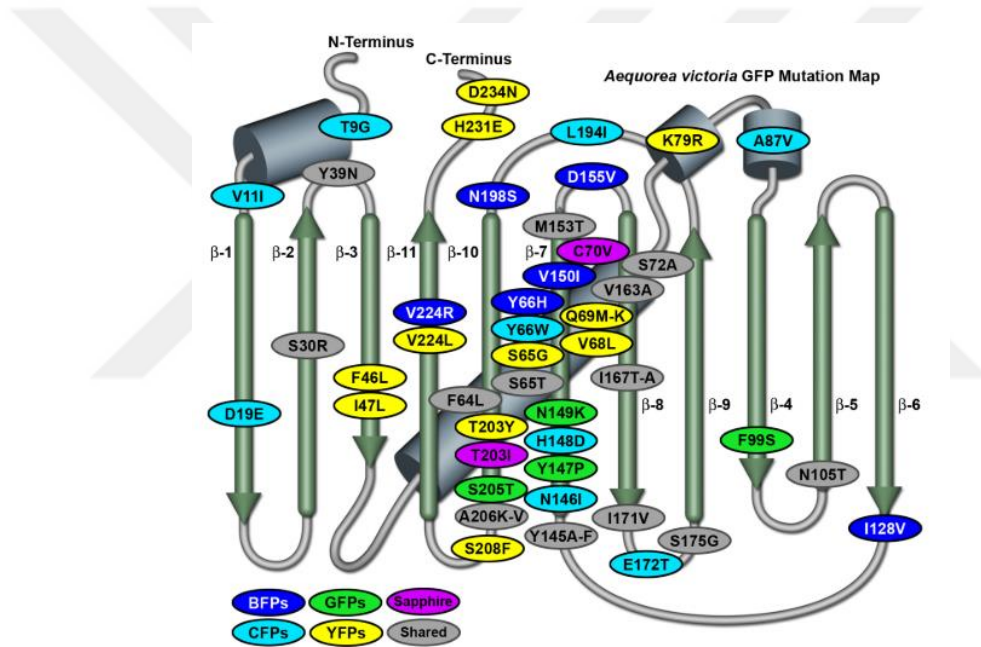
Şekil 2.6. GFP'nin uyarılma ve emisyon dalga boyu (Chalfie vd., 1994)

GFP proteinin spektral özellikleri yapılan mutasyon çalışmalarıyla değiştirilmiştir. GFP kromoforundaki Tyr66 aminoasidinin His, Trp veya Phe aminoasitleri ile yer değiştirilerek modifiye edilmesi sonucu; mavi, turkuaz, yeşil ve sarı renkte bir dizi floresan proteinler geliştirilmiştir (Şekil 2.7) (Chudakov vd., 2010).



Şekil 2.7. Yeşil floresan protein varyantları (Shaner vd., 2011)

Genel olarak, dalga boyuna özgü mutasyonlar, kromofor içeren merkez sarmalın yakınında meydana gelirken, sekans boyunca katlanma mutasyonları da meydana gelmektedir. Şekil 2.8’de GFP proteinine ait mutasyon haritasında yapılan değişiklikler sonucu fotostabilite, oligomerizasyon, pH duyarlılığı ve olgunlaşma oranları bakımından farklılık gösteren yeni floresan protein varyantları tasarlanabilmektedir (Shaner vd., 2011). Yabani tip GFP üzerinde yapılan mutasyon çalışmaları ile önce Clover varyantı sonrasında ise monomerik yapıdaki mClover3 gibi daha parlak ve fotostabil yeşil floresan proteinler geliştirilmiştir (Bajar vd., 2016a).



Şekil 2.8.Yeşil floresan proteinine ait mutasyon haritası (Shaner vd., 2011)

Floresan proteinler, canlı hücrelerde ve organizmalarda gen ürünlerini ve hücreye ait bölümleri görselleştirmek için genetik olarak kodlanmış etiketler olarak kullanılmaktadır. Yayılan sinyalleri (floresan emisyon) iyileştirmek ve çok yönlü araçlar haline getirmek için, farklı spektral ve fotofiziksel özelliklere sahip çeşitli floresan protein varyantları geliştirilmiştir. Bu farklı floresan varyantlarının çoğu *A.victoria* kaynaklı protein iskeletinden türetilmiştir (Hostettler vd., 2017).

Fakat *A.victoria* dışında farklı organizmalardan da floresan proteinler geliştirilmiştir. Shaner ve ark. tarafından *Branchiostoma lanceolatum* canlısından tetramerik yapıdaki sarı floresan protein (LanYFP) elde edilmiştir ve bu proteinden daha sonra monomerik yapıda mNeonGreen proteini geliştirilmiştir (Shaner vd., 2013).

mNeonGreen proteini 506 nm'de uyarma ve 517 nm'de emisyon dalga boylarına sahiptir. mNeonGreen, yeşil renkte floresan ışıma yapması ve monomerik yapısı bakımından, GFP kaynaklı Clover ve mClover3 varyantlarına benzemektedir. Bununla birlikte, mNeonGreen, üstün fotostabilite (hem geniş alan hem de lazer aydınlatması altında Clover'dan ~3 kat daha yüksek), gelişmiş asit toleransı ve daha hızlı olgunlaşma açısından önemli avantajlara sahiptir (Shaner vd., 2013).

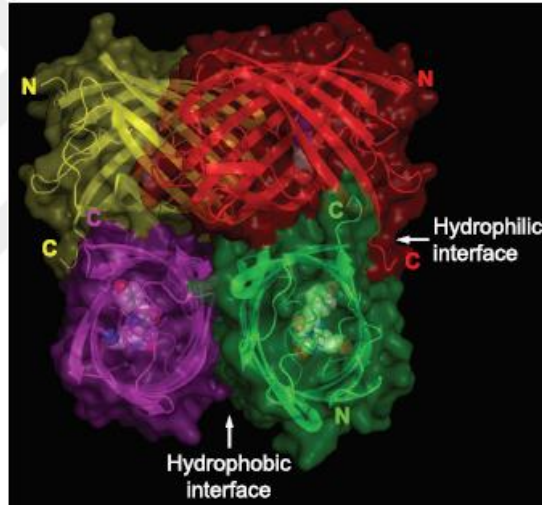
mNeonGreen, bakteriyel ve ökaryotik hücreleri içeren ayrıca fareler dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda biyolojik süreçleri araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Stockmar vd., 2018). mNeonGreen geliştiricileri, süper çözünürlüklü PALM (Photoactivated localization microscopy) mikroskobu için kullanımını ve PALM için diğer yeşil floresan proteinlere göre geliştirilmiş performanslarını göstermiş olsalar da, mNeonGreen, genellikle kırınım sınırlı mikroskoplar (diffraction-limited microscopies) tarafından kullanılmaktadır (Stockmar vd., 2018).

mNeonGreen'i PALM için gelecek vaat eden bir seçenek haline getiren en önemli özelliklerinden bazıları, ışık varlığı veya yoğunluğundaki değişikliği algılama kapasitesi (photo-switch özelliği), yüksek parlaklık, yüksek fotostabilite ve proteinin olgunlaşma süresinin kısa olmasıdır. Olgunlaşma süresi bakteri ve maya gibi hızlı bölünen organizmalarda süreçleri incelemek için önemli bir özelliktir (Stockmar vd., 2018).

mNeonGreen'i memeli hücrelerinde daha etkili kullanmak için, verimli ekspresyon elde etmek önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalarda, mNeonGreen cDNA'sında, *H.sapiens*'te nadiren kullanılan en az yedi kodon tespit edilmiştir, yapılan kodon optimizasyonu ve gerekli çalışmalar ile bu proteinin memeli hücrelerinde kullanılarak, biyolojik olayların analizi için daha yararlı hale getirilmiştir (Tanida-Miyake vd., 2018).

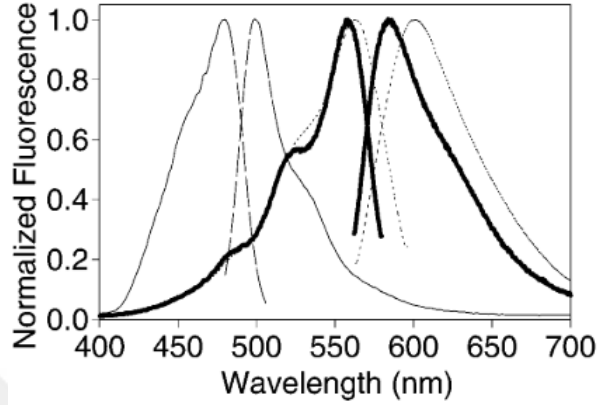
2.3.3. Kırmızı floresan protein ve varyantlar

Yaygın olarak araştırılan mercan kaynaklı ilk floresan protein *Discosoma striata*'dan izole edilmiştir ve başlangıçta drFP583 olarak adlandırılmıştır, aynı zamanda ilk kırmızı floresan protein olduğundan DsRed olarak da bilinmektedir (Matz vd., 1999). DsRed proteini, 28 kDa ağırlığında olup kromofor bölgesinin sekansı Gln66-Tyr67-Gly68 aminoasitlerinden oluşmaktadır (Matz vd., 1999). Yapılan çeşitli tekniklerle doğal DsRed'in tetramer yapı oluşturduğu gösterilmiştir ayrıca tetramer yapıyı oluşturan her bir monomer, GFP ile aynı molekül yapısını paylaşmaktadır (Şekil 2.9) (Yarbrough vd., 2001).



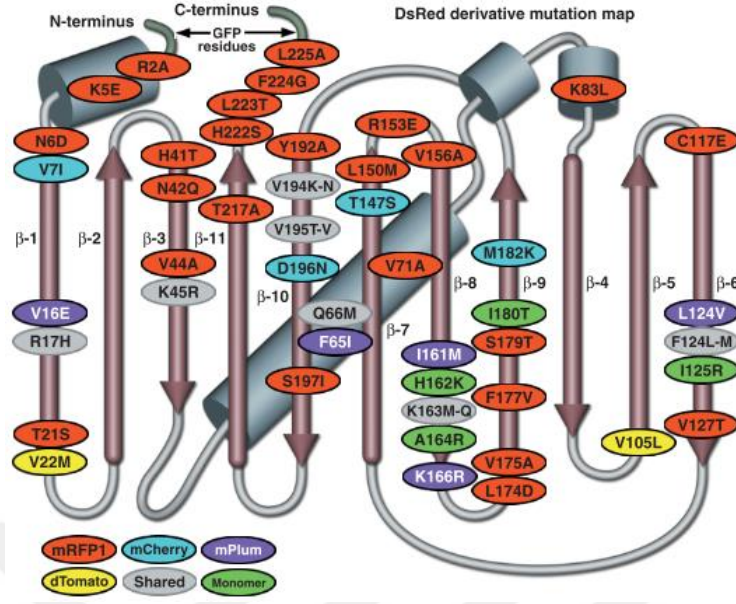
Şekil 2.9. DsRed tetramerinin genel yapısı (Chudakov vd., 2010).

Bu floresan protein tamamen olgunlaştığında, uyarılma spektrumunun 558 nm ve emisyon spektrumunun 583 nm olduğu bilinmektedir (Şekil 2.10) (Gross vd., 2000).



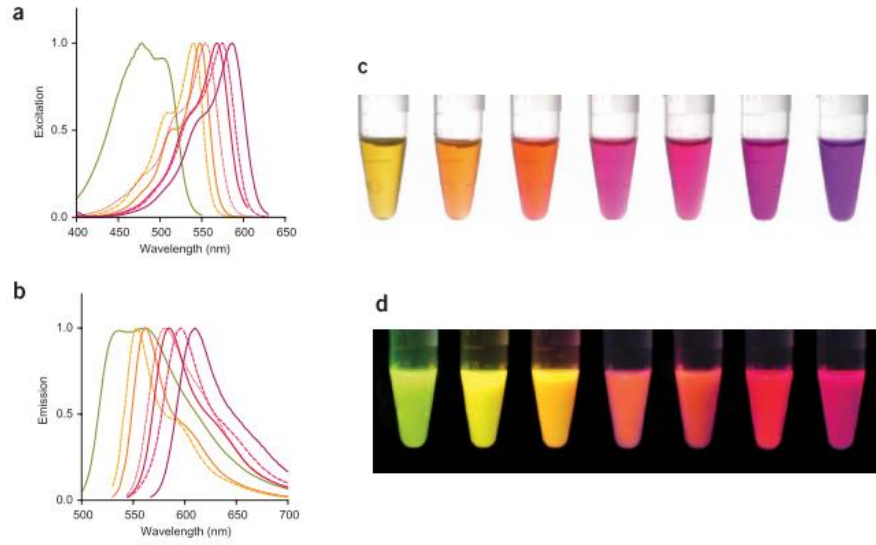
Şekil 2.10. DsRed'in uyarılma ve emisyon dalga boyu (Baird vd., 2000)

Kırmızı floresan proteini DsRed, kültüre edilmiş hücre ve organizmaların çok renkli etiketlenmesi, floresan rezonans enerji transferi kullanılarak protein-protein etkileşimleri ve hücre içi olayların görüntülenmesinde mevcut GFP proteini ile birlikte kullanımı için uygun spektral özelliklere sahiptir (Vrzheshch vd., 2000). Ancak doğal tip DsRed, olgunlaşma süresinin uzun olması, çoğu zaman toksik ve zayıf çözünürlük gibi dezavantajlara sahiptir. Bu durum, rastgele ve yönlendirilmiş mutagenез çalışmaları ile doğal proteinden 10–15 kat daha hızlı olgunlaşan DsRed varyantları geliştirilmiştir (Bevis ve Glick, 2002). DsRed proteinine ait mutasyon haritası Şekil 2.11'de gösterilmiştir. Ek olarak, DsRed2 varyantı ile peptidin amino terminalinde bazik amino asit kalıntılarının ortadan kaldırılması ile proteinin füzyon yapılarında oluşabilecek agregat oluşturma eğilimini azaltılmıştır (Bevis ve Glick, 2002).



Şekil 2.11. DsRed mutasyon haritası (Shaner vd., 2011)

Ayrıca, tetramerik yapıda olan DsRed, yapılan çalışmalarla mRFP1(monomerik kırmızı floresan protein) olarak adlandırılan monomerik varyantı geliştirilmiştir. Bu özellik sayesinde, proteinin olgunlaşması hızlandırılmış olup fotostabilitesi artırılmıştır. Böylece mRFP1 füzyon protein yapıları ve GFP ile birlikte çok renkli etiketlemeler için en uygun kırmızı floresan protein haline gelmiştir (Campbell vd., 2002). Yapılan çalışmalar ile mRFP1'den daha fotostabil, N-terminal füzyonlara daha toleranslı ve daha kısa sürede olgunlaşan farklı renklerde monomerik kırmızı floresan varyantları geliştirilmiştir. Bu kırmızı floresan varyantları, floresan miktarının verimi, parlaklığı ve spektral özellikleri bakımından birbirinden farklıdır (Şekil 2.12) (Shaner vd., 2004).



Şekil 2.12. Yeni RFP varyantları. Floresan proteinlerin uyarma (a) ve emisyon (b) eğrileri, saflaştırılmış proteinlerin (soldan sağa, mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry ve mCherry) görünür ışık altında (c) ve 480-560 nm’de uyarılma sonucu oluşan floresan görüntüsü (d) (Shaner vd., 2004)

Geliştirilmiş kırmızı floresan varyantları

mFruits (Shaner vd., 2004), mKO, TagRFP ve mKate gibi birinci nesil monomerik RFP’ler, protein lokalizasyonu, canlılık ve etkileşimler için işaretleyiciler olarak başarıyla kullanılmaktadır. Ne yazık ki, sınırlı parlaklık ve proteinlerin düşük fotostabilitesi uygulamaları engellemektedir. Bu nedenle, son zamanlarda, bu proteinleri temel alarak, arttırılmış parlaklık ve fotostabiliteye sahip bir dizi FP geliştirilmiştir. Tüm RFP’ler floresan emisyon maksimumuna göre, turuncu (550-590 nm emisyon), kırmızı (590-630 nm emisyon) ve koyu kırmızı (630 nm’den yüksek emisyon) olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

Turuncu floresan proteinler

Son zamanlarda, potansiyel olarak yararlı birkaç turuncu floresan protein (OFP) çeşitli *Anthozoan* FP’lerden türetilmiştir. Bugüne kadar mevcut en parlak monomerik OFP, yedi mutasyon ekleyerek mKO’dan türetilen mKOκ(mKusabira Orange kappa)’dır (Karasawa vd., 2004).

mKO κ proteini, mKO öncülüne göre geliştirilmiş pH stabilitesi ve olgunlaşma oranına sahiptir. mKO κ 'nın ark lambası aydınlatması altında fotostabilitesi, popüler mCherry'den yaklaşık üç kat daha düşüktür, ancak lazer aydınlatması altında her ikisi de benzer şekilde özellik göstermektedir (Sakaue-Sawano vd., 2008). Ayrıca, mKO κ bir FRET alıcısı olarak başarıyla kullanılmıştır (Tsutsui vd., 2008). Son olarak, mKO füzyonlarının zayıf lokalizasyonu, geliştirilmiş mKO κ ile değiştirilerek güçlendirilmiştir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

EqFP578 proteininin bir dizi monomerik RFP için oldukça potansiyel bir öncü olduğu ortaya çıkmıştır. Ardından eqFP578'in kapsamlı mutajenezi sonucu, parlak monomerik floresan protein TagRFP geliştirilmiştir (Merzlyak vd., 2007). Yüksek parlaklık ve hızlı olgunlaşmaya ek olarak, TagRFP iyi pH stabilitesine sahiptir ve farklı hücre tiplerinde çeşitli proteinler için iyi bir füzyon ortağı olarak performans göstermektedir. TagRFP'nin dezavantajı, ark lambası ve lazer aydınlatması altında düşük fotostabiliteye sahip olmasıdır (Piatkevich ve Verkhusha, 2011). Yapılan çalışmalar ile TagRFP ve mOrange'nin fotostabilitesini önemli ölçüde arttırılmıştır (Shaner vd., 2008).

Ek olarak, DsRed-Express2 ve E2-Orange olarak adlandırılan DsRed'in geliştirilmiş tetramerik versiyonları geliştirilmiştir. Bu FP'ler, tüm hücre etiketlemesi için veya gen aktivitesinin izlenmesi için raporör markerler olarak stabil hücre hatları ve transgenik hayvanlarda ekspresyonu daha çekici kılan minimum sitotoksiste ve yüksek olgunlaşma oranları sağlamaktadır. DsRed-Express2 ve E2-Orange'ın memeli hücrelerine göre sitotoksitesi, genel olarak geliştirilmiş GFP ile ve fotosel özellikleri bakımından birçok gelişmiş RFP ile karşılaştırılabilir durumdadır. Bununla birlikte, proteinlerin tetramerik durumu, füzyon proteinlerinde kullanımını kısıtlamaktadır. Fakat akış sitometresinde (flow cytometry) DsRed-Express2 ve E2-Orange'ın EGFP ile aynı anda kullanımı gösterilmiştir (Strack vd., 2009, 2008).

Turuncu floresan proteinlerden tdTomato proteini halen geliştirilen en parlak kırmızı floresan varyantı olup yüksek fotostabilite ve iyi olgunlaşma oranına sahiptir. Bunun yanında tdTomato, hücre ve organellerin etiketlenmesinde başarıyla kullanılabilirken proteinin dimer yapısından dolayı hedef proteinin işlevini bozabilmektedir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

Kırmızı floresan proteinler

EqFP611 olarak adlandırılan yabani tip kırmızı floresan proteininin sürekli ve yoğun optimizasyonu sonucu parlak monomerik mRuby protein geliştirilmiştir (Kredel vd., 2009). Çoğu füzyon yapıda iyi performans ve asitli ortamlara karşı dirençli olması, mRuby'yi birçok hücre biyolojisi uygulaması için yararlı kılmaktadır. mRuby, memeli hücrelerinde peroksizomların ve endoplazmik retikulumun görüntülenmesinde etkili bir işaretleyici haline dönüşmüştür. mRuby'nin bir başka avantajı, akış sitometri analizörleri ve FACS (Floresan aktive edilmiş hücre sıralama) cihazlarıyla floresansının daha iyi tespit edilmesini sağlayan uyarma ve emisyon spektrumları arasında (Stokes kayması 47 nm) bir ayrıma sahip olmasıdır. mRuby, mCherry ve mStrawberry, üstün olgunlaşma oranlarına sahip olup memeli hücrelerinde iyi parlaklık sergilemektedir. Kırmızı varyantı olan mRaspberry'nin floresan spektrumu, turuncu floresan proteinler ile iyi bir spektral ayrılmaya izin vermektedir (Wang vd., 2004).

mRuby2, yüksek kuantum verimi, geniş Stokes kayması, hızlı olgunlaşma ve yüksek fotostabilitesi nedeniyle GFP-RFP FRET çiftleri için uygun bir akseptör floroforu olduğu bilinmektedir (Lam vd., 2012). mRuby2 floresan proteini üzerinde gerçekleştirilen mutasyon çalışmaları sonucu mRuby3 geliştirilmiştir. mRuby3 proteini sırasıyla 558 ve 592 nm'de uyarma ve emisyon maksimumuna sahiptir. mRuby3 floresan proteini mRuby2'ye kıyasla %35 daha parlak hale getirilmiştir. Ayrıca mRuby3 floresan proteini, ark lambası aydınlatması altında 349 sn'lik yarılanma ömrüne sahip olmasıyla mRuby2 (123 sn.) ve TagRFP-T (337 sn.) proteinlerine göre daha fotostabil olduğu gösterilmiştir. mRuby3, mRuby2'ye kıyasla karşılaştırılabilir asit toleransı sergiler, pKa 4.8'dir. Bu sonuçlar mRuby3'ün bugüne kadar açıklanan en parlak ve en fotostabil monomerik RFP olduğunu göstermektedir. mRuby3'ün daha yüksek parlaklık ürettiği ve mRuby2'den daha verimli bir FRET alıcısı olarak işlev gördüğü memeli hücrelerinde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Bajar vd., 2016a).

Bajar ve ark. tarafından, mClover3-mRuby3 veya mNeonGreen-mRuby3 çiftinin, kültüre edilmiş hücrelerde kullanıldığında fotostabilite, parlaklık ve FRET dinamik aralığı açısından en iyi seçimlerden biri olduğu ortaya konulmuştur. Kırmızı floresan protein varyantı olan mRuby3 ise önceki türevlerine göre %200 oranında daha fotostabil ve %35 oranında daha parlak hale getirilmiştir (Bajar Bryce T. ve ark. 2016).

Son zamanlarda, geleneksel FP'lere dayanarak, cyan (mavi-yeşil) veya mavi ışıkla verimli bir şekilde uyarılabilecek çeşitli turuncu ve kırmızı floresan proteinler geliştirilmiştir. Geniş Stokes kaymasına (LSS) sahip (140 nm'den fazla) turuncu ve kırmızı floresan proteinler, özellikle çok parametrelili akış sitometrisi için ek turuncu ve kırmızı renkler olarak umut vermektedir. mKeima olarak adlandırılan ilk LSS-RFP, çok renkli iki foton mikroskobu ve floresan çapraz korelasyon spektroskopisine uygulanmıştır. Fakat düşük parlaklık ve floresanın güçlü pH bağımlılığı, proteinin uygulamalarını kısıtlamaktadır (Piatkevich ve Verkhusha, 2011). Keima örneklerinde geleneksel kırmızı floresanlı (584 nm'de uyarma pikine sahip olanlar) türlerin varlığı, yaygın RFP'lerin mKeima ile eş zamanlı olarak çok renkli görüntülenmesini engellemektedir. Kırmızı ötesi protein mKate'den türetilen LSSmKate2, mKeima'dan daha parlaktır ve fizyolojik koşullarda spektral özellikleri neredeyse pH'dan bağımsız davranış göstermektedir (Piatkevich vd., 2010). LSSmKate2'nin pKa değeri 2.7 olup bugüne kadar rapor edilen tüm RFP'ler arasında pH'ya karşı en stabil olan proteindir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

Koyu kırmızı floresan proteinler

Araştırmacılar, biyomedikal araştırmalarda, doku ve tüm vücudu görüntüleme uygulamalarını daha çekici hale getirebilecek, diğer RFP'lere göre üstünlüklerinden dolayı, koyu kırmızı FP'lere ilgi göstermektedir. Bu floresan proteinler, çok renkli mikroskopi ve canlı hücrelerin akış sitometrisi için OFP'ler ve RFP'ler ile birlikte kullanılabilir. Monomerik koyu kırmızı FP'ler, güçlü otofloresan koşullarda bile hücrel proteinleri etiketlemek için tercih edilen proteinlerdir (Piatkevich ve Verkhusha, 2011).

Yabani tip eqFP578 proteinden birkaç koyu kırmızı FP elde edilmiştir. Bunlardan biri, eqFP578 geninin rastgele mutagenesi sonucu elde edilen dimerik yapıdaki Katushka floresan proteinidir. MKate olarak adlandırılan Katushka'nın monomerik bir versiyonu, fizyolojik aralıkta floresanın yüksek pH duyarlılığı ve kantitatif analizi zorlaştıran zayıf fotoaktivasyon sergilemektedir. Daha sonra mKate'nin rastgele mutajenezi sonucu parlaklığını, fotostabilitesi ve pH stabilitesi artırılmıştır. mKate2 olarak bilinen

geliştirilmiş versiyonu, 20 dakikadan daha az yarı-zamanda hızlı olgunlaşma özelliğine sahiptir ancak kalıntı yeşil floresan özellik göstermektedir (Shcherbo vd., 2009).

Xenopus embriyolarında mKate2'nin transgenik bir ifadesi hatta yüksek ifade seviyelerinde bile düşük sitotoksosite göstermiştir. Bununla birlikte, geçici olarak transfekte edilmiş HeLa hücrelerinde sitotoksosite analizi, transfeksiyondan 24 saat sonra mKate ve Katushka'nın yüksek ekspresyonunda belirgin bir kayıp olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca mKate ve Katushka'nın sitotoksitesi bakteriyel ekspresyon ölçümleri ile desteklenmiştir (Strack vd., 2008).

Daha sonra mKate temel alınarak, 649 nm emisyon maksimumuna ulaşan mNeptune adlı parlak koyu kırmızı protein geliştirilmiştir (Lin vd., 2009). Bu protein, uyarma ve emisyon spektrumlarından dolayı canlı hücrelerin çok renkli görüntülenmesinde OFP'ler ile birlikte kullanılmaktadır. Buna karşın mNeptün'ün, mKate proteinine göre zayıf dimer, bakteri hücrelerinde artmış sitotoksosite ve kalıntı yeşil floresan oluşturma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Morozova vd., 2010).

Günümüzde, FP'lerin oligomerler oluşturmadaki doğal eğilimine karşı uzun bir mücadele sonrasında, monomerik FP'lerin renk çeşitliliği, mordan uzak kırmızıya kadar neredeyse tüm görünür spektrumu kapsamaktadır (Chudakov vd., 2010). Yaygın olarak kullanılan bazı FRET çiftleri ve özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Yaygın olarak kullanılan FRET çiftleri (Bajar vd., 2016b)

FRET Pair	Φ_D^a	ϵ_A (mM ⁻² .cm ⁻¹) ^b	r_0 (nm) ^c
ECFP-EYFP	0.4	83	4.9
mTurquoise2-sEYFP	0.93	101	5.9
mTurquoise2-mVenus	0.93	92	5.8
EGFP-mCherry	0.6	72	5.4
Clover-mRuby2	0.76	113	6.3
mClover3-mRuby3	0.78	128	6.5
mNeonGreen-mRuby3	0.8	128	6.5
eqFP650-iRFP	0.24	105	5.8
mAmetrine-tdTomato	0.58	138	6.6
LSSmOrange-mKate2	0.45	63	7.0
EGFP-sREACH	0.6	115	5.8
EGFP-ShadowG	0.6	89	4.7
EGFP-activated PA-GFP	0.6	17	4.4
EGFP-Phanta	0.6	98	5.8
mTagBFP-sfGFP	0.63	83	4.6
mVenus-mKOκ	0.57	105	6.3
CyOFP1-mCardinal	0.76	87	6.9

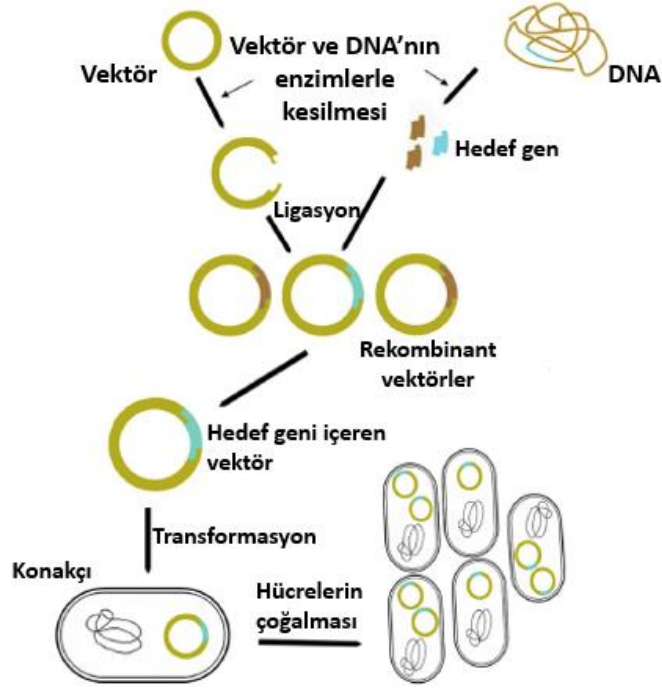
^a donörün kuantum verimi, ^b akseptörün ekstinksiyon katsayısı, ^c Förster yarıçapı

2.4. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi genel olarak, yabancı bir DNA'nın, *Escherichia coli* gibi bir bakteriyel konakçıda bağımsız çoğalabilen ekstrakromozomal DNA elemanlarına (yani plazmitlerine) moleküler olarak klonlanmasını ifade eder (Hacker ve Wurm, 2016). İstenen genin uygun bir vektöre yerleştirilmesi sonrasında bu vektörün konakçı hücrelere transformasyonu ve hücrelerin bölünmesi ile birlikte vektörün dolayısıyla içerdiği genin birçok kopyası oluşur. Bu işleme gen klonlaması adı verilmektedir. DNA molekülü için taşıyıcı rolü üstlenen küçük ve dairesel yapıdaki moleküller vektör olarak adlandırılmaktadır. Klonlamada en önemli basamak, bir organizmaya ait genomdan elde edilen DNA fragmentinin uygun bir vektöre yerleştirilmesi işlemidir. Vektör DNA'sına, çoğaltılmak istenen DNA parçasının eklenmesiyle oluşan yapıya rekombinant DNA adı verilmektedir (Kuk ve Erensoy, 2008).

Bu teknolojiye ait temel işlemler Şekil 2.13'te özetlenmiştir. Bu işlemde ilk basamak, çoğaltılmak istenen DNA'nın elde edilmesi ve uygun vektörün seçilmesi işlemidir. Bir sonraki işlem, restriksiyon enzimleri ile DNA moleküllerinin kesilmesi ve DNA ligaz enzimi ile yapışkan uca sahip DNA'ların (vektör ve çoğaltılmak istenen DNA) birleştirilmesi işlemidir. Son olarak, birleşim sonucu elde edilen rekombinant DNA'nın konakçı hücreye transferi gerçekleştirilir (Huda Yberdiyev ve Öner, 1997). Daha sonra konakçı hücrenin replike olmasıyla, rekombinant DNA molekülü de çoğalır. Böylece istenen DNA parçası çoğaltılmış olur ve sonrasında yapılacak analizler için rekombinant DNA'lar saflaştırılır (Altıntaş vd., 2017).

Rekombinant DNA teknolojisi, modern biyoteknoloji için yeni bir çağ açan DNA tabanlı önemli bir araçtır. Bu teknoloji ile yeni aşılar ve farmasötikler geliştirilerek sağlık koşullarının iyileştirilmesinde hayati bir rol oynamaktadır (Khan vd., 2016). Rekombinant proteinler, biyomedikal biyoteknolojide önemli atılımlar sağlamıştır. Sadece biyomedikal araştırmalarda değil aynı zamanda tedavide de ilaç olarak kullanılmaktadırlar. Tedavide ilk rekombinant protein, 1982'de kullanılan rekombinant insan insülinidir. Rekombinant protein endüstrisi hızla büyümektedir ve bugüne kadar, 130'dan fazla rekombinant protein, klinik kullanım için FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmıştır (Pham, 2017).



Şekil 2.13. Rekombinant DNA teknolojisine ait temel basamaklar (Pham, 2017)

2.4.1. Rekombinant DNA teknolojisinde kullanılan vektörler

Vektör, istenen geni taşıyan DNA molekülü olarak tanımlanır. Vektörler, rekombinant DNA teknolojinin önemli parçalarıdır. Konakçı organizma içerisinde ilgili geni taşıyan araçlar olarak bilinmektedir. Bugüne kadar çeşitli tiplerde vektörler geliştirilmiştir; bununla birlikte en yaygın olarak kullanılan vektörler plazmitler ve bakteriyofajlardır. Bir vektör, gen entegrasyonunu kolaylaştırmak için istenen gen içerisinde bulunan aynı restriksiyon kesim bölgelerini içermelidir. Ayrıca; vektörler, seçim ve tanımlama için antibiyotik direnç geni ve klonlama bölgeleri gibi sekanslar taşımalıdır. Konakçı organizma, rekombinant DNA'nın transfer edildiği hücreyi tanımlar. Bakteri, mantar ve hayvan hücreleri konakçı organizmalar olarak kullanılmaktadır. Vektörler konakçı organizmalara; mikroyenjeksiyon, gen tabancası, ısıtma-soğutma ve kalsiyum fosfat iyonlarını içeren çeşitli tekniklerle transfer edilmektedir (Pham, 2017).

Plazmitler hücrelerin kromozomal DNA'sından ayrı halde bulunan ve bağımsız bir şekilde replike olabilen dairesel, çift sarmallı DNA molekülleridir. 1-15 kb büyüklüğündeki yabancı DNA molekülünü klonlamada etkin olarak kullanılır (Huda Yberdiyeve ve Öner, 1997). Plazmidler birçok bakteri türünde bulunur ve tür içinde bir organizmadan diğerine konjugasyon yoluyla transfer edilebilir. Doğada, plazmitler, belirli bir biyokimyasal olaylarda işlev gören proteinleri kodlayan birkaç gen ile beraber bir operona sahiptir. Plazmitlerde, hücresel savunma (bakteriyosinler), virülans ve metabolizmaya ait genlere ek olarak antibiyotik direnç geni bulunmaktadır. Böylece plazmidin varlığı, konakçı hücreye ortamında hayatta kalma avantajı sağlar (Hacker ve Wurm, 2016). Plazmitler, genetik mühendisliğine ait teknikler kullanılarak tasarlanmış ve klonlamada kullanılan vektörler haline getirilmiştir. Plazmit vektörlerin dışında farklı boyut ve özelliklere sahip fajlar, kosmidler, bakteri yapay kromozomlar ve maya yapay kromozomları gibi vektör sistemleri bulunmaktadır (Soydemir ve Aksoy, 2017).

Gen transferlerinde, aracı molekül olarak çeşitli faj DNA'larından da yararlanılmıştır. Örneğin bakteriyofajlar, bakterilerde üreyerek lizis oluşturan bakteri virüsleridir. Birçok bakterinin kendine özgü fajı bulunmaktadır. Fajların bir kısmı kendi konakçılarında lizis meydana getirirken, bazıları da konakçı içinde bulunmasına rağmen herhangi bir zararda bulunmazlar. Bu türden fajlar bakteri genomu ile birleşerek onun bir parçası haline gelir ve onunla beraber eş zamanlı replike olur ve her hücre bölünmesi esnasında bakteri DNA'sı ile beraber kardeş hücreye aktarılır. Vektör olarak, genelde *E.coli*'ye ait fajlardan, lambda ve M13 fajları kullanılır (Arda, 2019).

Faj vektörler, plazitlere göre yapılarında daha büyük boyuttaki yabancı DNA'yı taşıyabilen ve doğrusal yapıda olan DNA molekülleridir. Fajlar, yaklaşık 50 kb büyüklüğündeki DNA'lar olup, 10-20 kb uzunluğundaki yabancı DNA molekülünü klonlamak için kullanılır (Huda Yberdiyeve ve Öner, 1997). Kozmidler, replikasyon orijin bölgesine sahip bir plazmit ve lambda faj DNA'sında bulunan *cos* bölgesinin birleştirilmesiyle oluşturulan ve daha büyük yabancı DNA'ların klonlanmasına olanak sağlayan vektörlerdir. Kozmitler yaklaşık olarak 35-50 kb büyüklüğündeki DNA moleküllerini klonlamak için kullanılır (Huda Yberdiyeve ve Öner, 1997).

Uzun yıllar boyunca, 1-30 kb'lık DNA parçalarını klonlamak için plazmitler vektör olarak kullanıldı. Fakat daha büyük DNA parçalarını bu sistemler kullanarak klonlamak zordur. Bu yüzden araştırmacılar yapay kromozomlar olarak adlandırılan 100-1000 kb büyüklüğündeki DNA'ları klonlamada kullanılan, maya yapay kromozomları gibi daha büyük vektör sistemlerini kullanmaya başladılar. Bugün, *Escherichia coli* bakterilerinde doğal olarak oluşan F plazmitini temel alan yeni plazmit vektörleri, 150-350 kb'lık DNA parçalarını klonlamak için kullanılır. Küçük bakteriyel plazmitlerin aksine F plazmiti ve onun türevi olan bakteri yapay kromozomu, stabil olması, daha büyük DNA parçalarını taşıması ve klonlama kolaylığı açısından tercih edilen bir vektör sistemidir (Carter ve Shieh, 2015).

Klonlama vektörleri dışında farklı işlemler için kullanılan vektör sistemleri bulunmaktadır. Örneğin; ekspresyon vektörleri, mekik (shuttle) plazmit vektörler, reporter vektörler, gen knockdown vektörler ve viral vektörler olmak üzere farklılaşırlar. Klonlama vektörleri, ilgilenilen DNA parçasının hücre içerisinde çoğaltılmasında, ekspresyon vektörleri ise, bir genin ifade edilmesinde kullanılırlar. Klonlama ve ifade vektörleri sadece konakçı hücrelerde replike olabilir ve taşıdıkları geni ifade edebilirler. Fakat mekik plazmit vektörler, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin her ikisinde kullanılmak üzere tasarlanabilirler. Gen knockdown vektörleri ise bir hücrenin eksprese ettiği belirli bir genin ekspresyonunu azaltmak için kullanılmaktadır. Reporter plazmitler, gen çalışmalarında kullanılır, vektör içerisinde bulunan reporter geni olarak adlandırılan ve başka genlerin ekspresyonu ile etkileşime giren DNA bölgesi içerir bu sayede hedef genlerin ifadesi incelenir. Ökaryotik hücrelere, genetik materyalin etkin bir şekilde transferi ve ekspresyonunu sağlamak adına bazı RNA ve DNA virüsleri kullanılarak rekombinant viral vektörler tasarlanmıştır. Simian virüs 40 (SV40), adenovirüs ve herpes virüs vektörleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Soydemir ve Aksoy, 2017).

2.4.2. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Protein Üretimi

Genel olarak, rekombinant DNA teknolojisi beş basamağa sahiptir: vektör DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi, hedef genin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyonu, vektör içerisine hedef genin yerleştirilmesi, konakçı hücreye transformasyon ve rekombinant DNA'ya ait ürünün (protein veya enzim) elde edilmesidir (Pham, 2017).

Hedef genin elde edilmesi

Klonlamada önemli aşamalardan biri hedef genin seçilmesidir. Bu amaçla, istenen genin bulunduğu DNA kaynağının izolasyonu, istenen gene ait DNA dizisi biliniyorsa; geliştirilmiş gen sentezleyiciler ile sentetik olarak veya istenen gene ait mRNA'dan revers transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA (komplementer DNA) eldesi olmak üzere farklı şekilde elde edilebilir (Koçoğlu ve Yalçınkaya, 1992). Hedef gen sentetik olarak elde ediliyorsa, tasarlanacak primerlere ve genin transfer edileceği vektöre uygun enzim kesim bölgelerinin ilave edilmesi önemli noktalardan birini oluşturur (Kuk ve Erensoy, 2008).

Restriksiyon enzimleri ile DNA kesimi

Çift sarmallı DNA dizilerini spesifik olarak tanıyan ve kesen restriksiyon enzimlerinin keşfi, rekombinant DNA teknolojisini mümkün kılan biyolojideki önemli keşiflerden biridir (Carter ve Shieh, 2015). Bu enzimler bakteriler tarafından çevrelerindeki yabancı DNA'yı parçalamak için doğal olarak üretilir. Moleküler biyologlar tarafından yüzlerce eşsiz restriksiyon enzimi tanımlanmış ve saflaştırılmıştır. Her restriksiyon enzimi, tanıma bölgesi olarak adlandırılan yaklaşık 6 nükleotitten oluşan özgün diziyi tanır ve keser. Bu enzimlerden bazıları çift zincirli DNA'yı küt uçlu yani düz bir şekilde keser, diğerleri ise her bir DNA parçasının uç kısımlarında, kısa tek zincirden oluşan kuyruk bırakacak şekilde kademeli keser ve bu yapı yapışkan uç olarak adlandırılır. Böylece aynı restriksiyon enzimi ile kesilen DNA parçalarının yapışkan uçlar birbirlerini tamamlayıcı baz çiftlerini oluştururlar ve bu durum kesilen hedef DNA ile vektörün birleşimi kolaylaştırır (Carter ve Shieh, 2015). Bu bağlamda hedef DNA ve vektör yapışkan uçlar oluşturacak şekilde aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmektedir.

Hedef genin vektöre yerleştirilmesi

Hedef DNA'yı bir vektöre yerleştirmek için, hem hedef DNA hem de vektör aynı restriksiyon enzimleri ile kesilerek, aynı yapışkan uçlar elde edilmelidir (Carter ve Shieh, 2015). Klasik yöntemle gen klonlaması çalışmalarında, hedef DNA'nın vektöre yerleştirilmesinden önce, restriksiyon enzimleri ile kesilen hedef genin ve vektörün agaroz jelden saflaştırılması gerekir. Saflaştırılan hedef gen ve vektör, uygun sıcaklık ve reaksiyon koşullarında T4 DNA ligaz enzimi ile birleştirilir. DNA ligaz enzimi bu işlemi, nükleotidin 5' fosfat grubu ile 3' hidroksil ucu arasında fosfodiester bağı oluşturarak gerçekleştirir. Ayrıca, DNA ligaz bu işlemi gerçekleştirebilmesi için ATP'ye ihtiyaç duymaktadır (Kuk ve Erensoy, 2008). Bu işlemin gerçekleşmesi ile rekombinant DNA'lar elde edilir.

Vektörün konak hücreye transferi ve çoğaltılması

Hedef DNA ve vektörün ligasyonu sonucu oluşan rekombinant DNA molekülü, geçirgen hale getirilmiş kompetent hücre olarak adlandırılan konakçı hücreye (genelde bakteri) transfer edilir. Bir DNA vektörünün kompetent hücreye girişi olayı transformasyon olarak adlandırılır (Carter ve Shieh, 2015). Transformasyon, genelde ucuz ve basit olan kimyasal yöntemler ile gerçekleştirilmesine karşın elektroporasyon gibi daha etkin yöntemlerde kullanılmaktadır. Transformasyonda kullanılan kompetent hücreler ticari olarak elde edilebilir veya araştırmacılar tarafından da hazırlanabilir. Bu işlemde yaygın olarak, kalsiyum klorür ve rubidyum klorür kullanılmaktadır (Kuk ve Erensoy, 2008). Örneğın, *E. coli* konak hücre olarak tercih edilecekse, hücreler transformasyon işleminden önce kalsiyum klorür ile muamele edilerek geçirgen hale getirilir. Transformasyon işlemi, aynı ortamda bulunan kompetent hücreler ve rekombinant DNA'ların, 37 °C'de kısa bir süre (genelde 2-5 dk.) bekletilmesi sırasında rekombinant DNA'ların hücreye girişi ile sağlanmaktadır (Koçoğlu ve Yalçınkaya, 1992).

Bakteriler, tek bir rekombinant DNA molekülünden fazla miktarlarda elde etmek için kullanılır, çünkü her 30 dakikada bir ikiye bölünerek çoğalırlar. Böylece konakçı hücrenin her bölünmesinde rekombinant DNA molekülü replike olacak ve hedef gen miktarı artacaktır. Transformasyondan sonra bakteriler antibiyotik içeren besi ortamlarında büyütülür, böylece sadece rekombinant DNA molekülünü içeren bakteriler, vektörde bulunan antibiyotik direnç geni sayesinde hayatta kalırlar (Carter ve Shieh, 2015).

Konakçı hücrelerden DNA'nın saflaştırılması

Transformasyon sonucu besiyerine ekimi yapılan hücrelerden onlarca koloni oluşur, bu yüzden rekombinant DNA'yı içeren kolonilerin seçilmesi gerekir. Klonlamada kullanılan birçok vektör, ampicilin, kanamisin, tetrasiklin gibi çeşitli antibiyotik direnç genleri taşır. Antibiyotikli besi ortamına ekimi yapılan hücrelerden, sadece direnç genine sahip, yani rekombinant plazmiti içeren hücreler hayatta kalır ve direnç geni içermeyen hücreler ölür. Böylece, rekombinant DNA'yı içeren kolonilerin seçimi yapılır (Kuk ve Erensoy, 2008).

Rekombinant DNA'nın birçok kopyasını oluşturmak üzere konakçı hücreye transformasyon işleminden sonra, rekombinant DNA'ların konakçı hücreden saflaştırılması gerekir. Bu aşama rekombinant DNA'ların bir sonraki adımda uygulanacak doğrulama çalışmaları için önemlidir. Saflaştırma işlemi için, agar plaktan bir bakteri koloni örneği alınır ve bakteriler taze kültür ortamında çoğaltılır, böylece bakteriler rekombinant DNA'ların birçok kopyasını üretmeye devam eder. Daha sonra, konakçı hücre DNA'sından, rekombinant plazmiti ayırmak ve saflaştırmak için rutin bakteri parçalama prosedürü uygulanır ve saflaştırma işlemi gerçekleşir. Rekombinant plazmiti konakçı hücreden saflaştırmak için büyük ölçüde basitleştirilmiş ticari kitler bulunmaktadır (Carter ve Shieh, 2015).

Klonlamanın doğrulanması

Bu aşamada ise hedef genin, vektör içerisine başarılı bir şekilde yerleştirilip yerleştirilmediğini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilir. Doğrulama için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, polimeraz zincir reaksiyonu ile doğrulamadır. Bu yöntem transformasyondan sonra elde edilen kolonilerden saflaştırılan plazmitler kullanılarak veya saflaştırma yapılmadan direk koloni örnekleri kullanılarak, PCR ile vektörün hedef geni taşıyıp taşımadığı tespit edilebilir (Kuk ve Erensoy, 2008).

Ayrıca, kolonilerden saflaştırılan plazmit DNA'ların, restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jele yüklenmesi ile vektörün, hedef geni içerip içermediği tespit edilir. Fakat bu doğrulama çalışmalarına ek olarak ve çalışmanın güvenilirliği artırmak adına, genin vektör içerisindeki varlığını kesinleştirmek için DNA dizi analizi yapılması gerekmektedir (Kuk ve Erensoy, 2008). DNA dizi analizi, ilgili DNA sarmalının belli bir bölgesinde bulunan nükleotitlerin (A, G, C, T) tam dizilimini belirlemek için kullanılır. DNA tanımlamada bir başka yaygın yöntem, bir numunede belirli bir sekansın olup olmadığını araştırmak için kullanılan nükleik asit hibridizasyon tekniğidir (Carter ve Shieh, 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihaz	Marka-Model
Buzdolabı	Vestel- GTP 455A
Çalkalayıcı İnkübatör	Zhicheng- ZHWY/111C
Çalkalayıcı İnkübatör	Biosan ES-20
Dikey Soğutucu (+4 °C)	Uğur
Dondurucu (-80 °C)	Hettich
Etüv	Memmert
Güç kaynağı (SDS-PAGE için)	Bio-Rad
Hassas terazi	Kern
Isıtıcı Magnetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Kar makinesi	Vision
Mikro santrifüj cihazı	Hitachi (Himac CT 15E)
Mikrodalga fırın	Arçelik- MD ₅₀₀
Otoklav cihazı	HMC- Hirayama
PCR cihazı	Bio-Rad T100
Santrifüj cihazı	Hermle Z326 K
Sonikatör	Bandelin Sonopuls
Spektroflorometre	Jasco (FP-8300)
Spin Cihaz	Biosan- Combi Spin
Termostatlı Blok Isıtıcı	Biosan- Bio TDB100
UV Göstercisi	Syngene- SYTC/1422
UV-Vis Spektrofotometresi	Boeco S-30
UV-Vis Spektrofotometresi (Nanodrop)	DeNovix
Yüksek Hızlı Santrifüj	Vision- VS 30 000i

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Markası
Agar	BD Bacto™ Agar
Agaroz	Nzytech
Akrilamid	Amresco
Ampisilin Sodium Salt	Fisher bioreagents
APS	Biorad
BamHI	Takara
Bezamidin	Merck
β-Merkaptoetanol	Merck
BSA	Takara
Buffer M	Takara
Buffer K	Takara
DMSO	Merck
DNA marker (Lamda HindIII/EcoRI)	Promega
Etanol	Merck
Etidyum bromür	Biorad
Gliserol	Sigma Aldrich
HCl	Merck
IPTG	Nzytech
İmidazol	Merck
Jelden DNA izolasyon kiti	Geneaid
Kanamisin	Serva
Kloramfenikol	Alfa Aesar
LB Agar	Lab M
LB Broth	Lab M
Lizozim	Amresco
NheI	Takara
Ni-NTA rezin	Thermo Scientific

Plazmit Saflaştırma Kiti	Geneaid, Presto™ Mini Plasmid
PMSF	Serva
Protein marker	Bio-Rad, All Blue
Protein marker	Thermo Scientific
Protein marker	Bio Basic

Çizelge 3.2. (devam) Çalışmada kullanılan kimyasallar

3.1.3 Kullanılan çözeltiler

PMSF çözeltisi: 150 µg PMSF tartılarak 1 ml mutlak etanol içinde çözülmüştür ve -20 °C’de saklanmıştır.

Kloramfenikol Çözeltisi (34 mg/ml): 340 mg kloramfenikol hassas terazide tartılarak 10 ml mutlak etanolde çözülmüştür ve 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

FSB çözeltisi: 7.4 g KCl, 7.5 g CaCl₂.2H₂O, 100 g gliserol, 10 ml 1 M (pH:7.5) KCH₃COO alınarak pH:6.5’e ayarlanmıştır ve hacim 1 L’ye tamamlanmıştır ve otoklavlanmıştır.

Ampisilin (100 mg/ml): 1.5 g ampisilin tartılarak 15 ml saf suda çözülmüştür. Ardından steril 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek mikrotüplere bölünmüştür ve -20 °C’de saklanmıştır.

Kanamisin çözeltisi (50 mg/ml): 0.5 g kanamisin hassas terazi kullanılarak tartılmış ve 10 ml otoklavlanmış ultra saf suda çözülmüştür. Ardından 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında steril mikrotüplere bölünerek -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

IPTG (1 M): 2.38 g IPTG 10 ml steril suda çözüldü ve 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek mikrotüplere bölündü ve -20 °C’ye kaldırılmıştır.

LB Broth çözeltisi: 10 g tripton, 10 g NaCl ve 5 g maya ekstraktı içeren karışım 1 L suda çözülmüştür.

LB Agar: Hazırlanan 1 L’lik çözelti LB Broth çözeltisine 15 g agaroz ilave edilerek karıştırılmıştır. LB Broth çözeltisi ve LB agar hazırlandıktan sonra otoklavlanmıştır.

Agaroz Elektroforez Jeli: 1 g agaroz üzerine 100 ml 1X TAE tamponu eklenmiştir ve mikrodalga fırında agaroz kalıntısı yok olana kadar eritildikten sonra üzerine 1 µl etidyum bromür eklenerek elektroforez kasetine dökülmüştür.

SDS-PAGE’de kullanılan çözeltiler

Yürütme jeli tamponu: 182 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0.4) 1 L saf suda çözülerek pH:8.8 olarak ayarlanmıştır.

Yükleme jeli tamponu: 60.5 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0.4) 1 L saf suda çözülerek pH:6.6 olarak ayarlanmıştır.

Yürütme jeli: 2.7 ml %40 akrilamid, 2.25 ml alt tampon, 4 ml su, 50 µl %10 APS ve 20 µl TEMED otomatik pipet yardımıyla alınarak bir beherde birleştirildikten sonra jel karışımı cam kasete yüklenerek polimerleşmesi beklenmiştir.

Yükleme jeli: 0.35 ml %40 akrilamid, 1 ml üst tampon, 2.55 ml su, 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED pipet yardımıyla alınarak polimerleşmiş yürütme jeli üzerine ilave edilmiştir.

Elektroforez tamponu (1X): 3 g Tris, 14.4 g Glisin, 1 g SDS bileşikleri son hacim 1 L olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanmıştır.

SDS Örnek Yükleme tamponu (5X): 0.6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 5 ml gliserol (%50), 2 ml %10’luk SDS, 0.5 ml β-Merkaptoetanol, 1 ml %1’lik Bromfenol mavisi ve 900 µl saf su karışımından hazırlanmıştır.

SDS Jel boyama (Staining) çözeltisi: 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 ml metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından süzöldükten sonra karışımın üzerine 100 ml asetik asit ve 450 ml saf su eklenerek hazırlanmıştır.

Destaining Çözeltisi: 100 ml metanol, 100 ml asetik asit ve 800 ml saf su karışımından hazırlanmıştır.

Amonyum Persülfat (APS-%10): 0.5 g APS 5 ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

Diyaliz ve Saflaştırmada kullanılan tamponlar

1X TEV proteaz tamponu (Tampon A): 25 mM Tris-HCl ve 150 mM NaCl olacak şekilde kimyasallar tartılarak saf suda cözölmüştür ve pH:8 olarak ayarlanmıştır.

1X TEV proteaz tamponu (Tampon B): 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl ve 14 mM β - merkaptotanol olacak şekilde kimyasallar tartılarak saf suda cözölmüştür ve pH:8 olarak ayarlanmıştır.

Parçalama tamponu (Lizis buffer): 25 mM Tris-HCl ve 300 mM NaCl olacak şekilde tartım işlemi tamamlanıp saf suda cözölmüştür ve pH: 7.8'e ayarlanmıştır.

Yıkama tamponu (Wash buffer): 10 mM imidazol, 25 mM Tris-HCl ve 300 mM NaCl olacak şekilde tartılarak saf suda cözölmüştür ve pH: 7.8'e ayarlanmıştır.

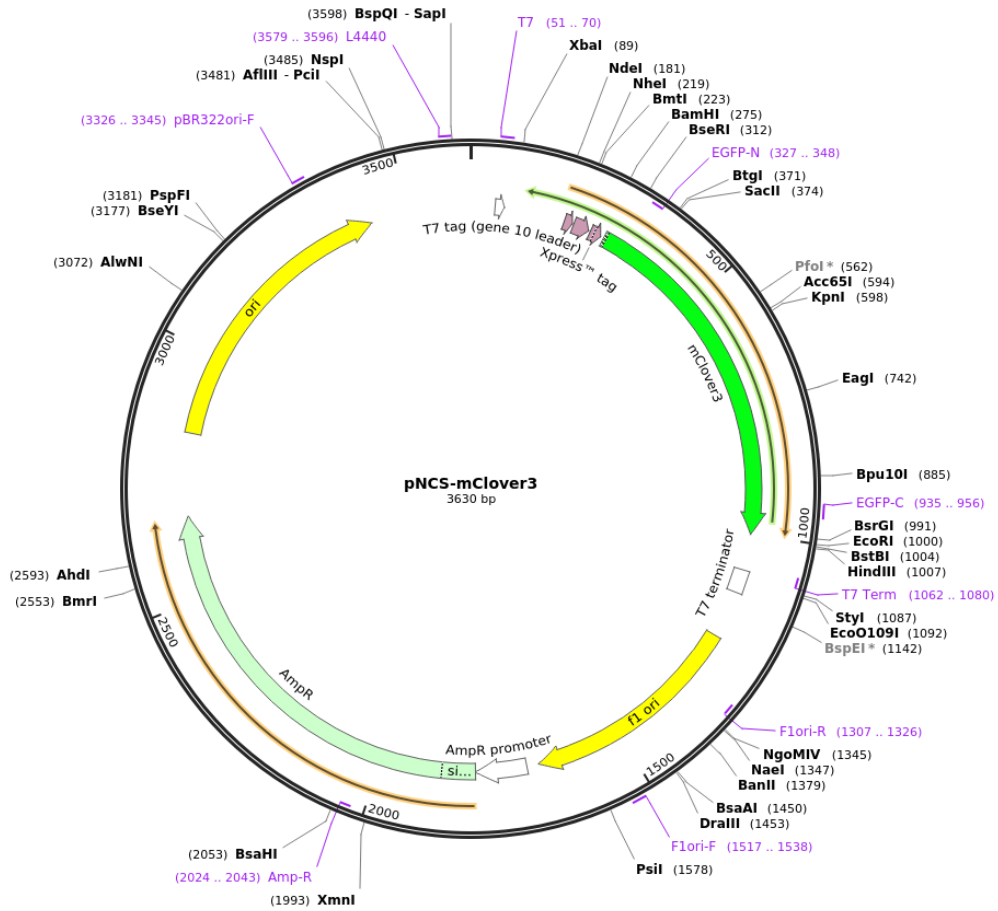
Elüsyon tamponu: 300 mM imidazol, 25 mM Tris-HCl ve 300 mM NaCl olacak şekilde tartılarak saf suda cözölmüştür ve pH: 7.8'e ayarlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. mClover3-mRuby3 FRET çifti

Plazmit tasarımı

mClover3 proteinine ait gen dizisi, plazmit içerisinde Addgene firmasından ticari olarak elde edilmiştir (Şekil 3.1). pNCS-mClover3 plazmitini kalıp olarak kullanarak mClover3 geni çoğaltmak için ileri (forward) ve geri (reverse) primerler dizayn edilmiştir. İleri primer NheI enzim dizisini, geri primer ise BamHI enzimi ve TEV proteaz tanıma dizisini içerecek şekilde tasarlanmıştır (Çizelge 3.3).



Şekil 3.1. mClover3 geni içeren plazmit (Addgene, #74236).

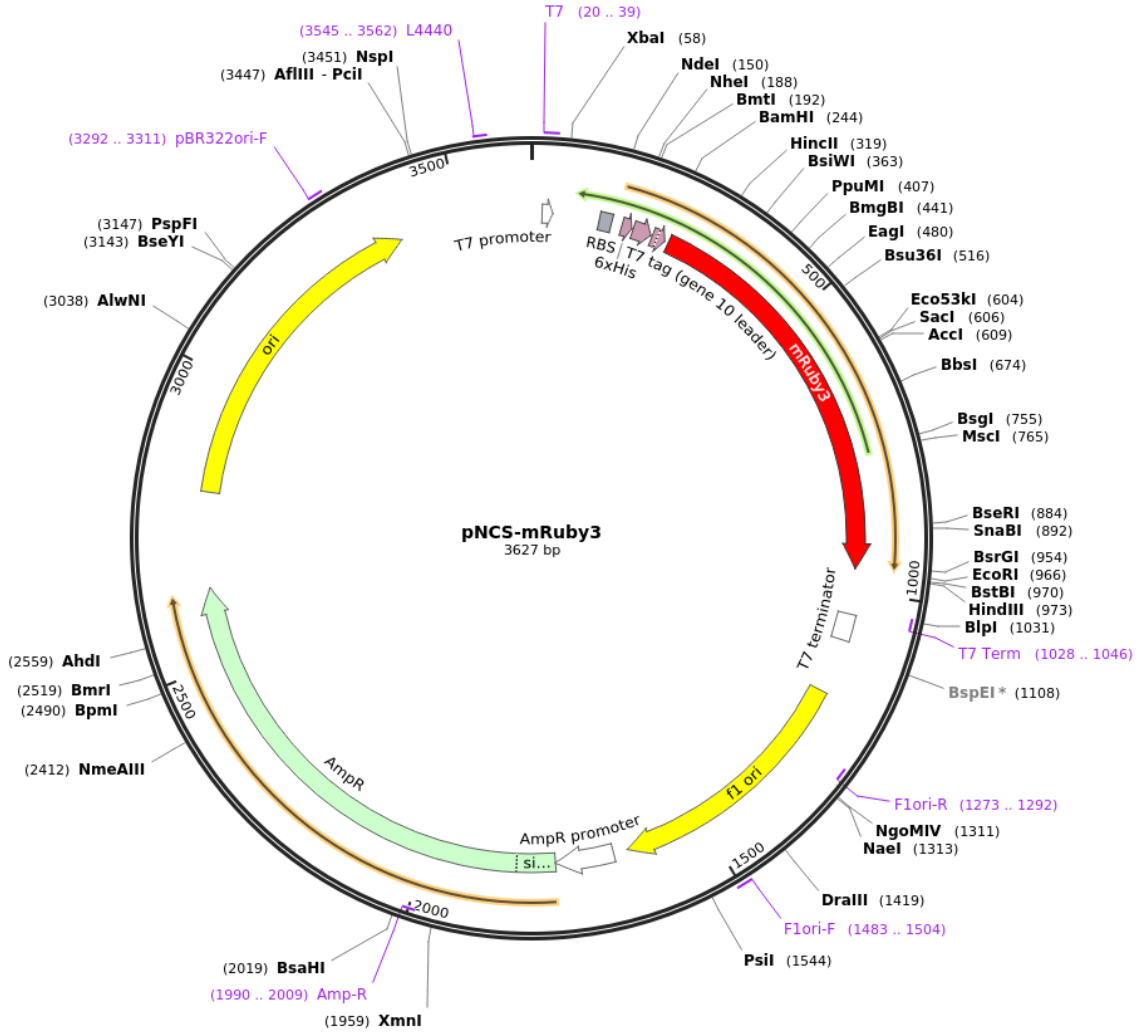
Primer tasarım aşamasında, mClover3 genini ilgili vektöre klonlamak için BamHI ve NheI enzimleri tercih edilmiştir. Bu enzimlerin seçilmesinde, klonlama yapılacak ilgili vektörde de aynı enzimlere ait restriksiyon kesim bölgelerinin mevcut olması göz önünde bulundurulmuştur. Bu bağlamda, ileri primer dizayn edilirken, mClover3 geninin çoğaltılması esnasında genin 5' ucunda NheI restriksiyon enzimi için tanıma dizisi oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Aynı şekilde mClover3 geninin sentezi sırasında, genin 3' ucunda BamHI enzimi için tanıma dizisi ve FP-FRET biyosensörünün oluşturulması için iki floresan protein arasındaki bağlantıyı sağlayacak TEV proteaz tanıma dizisini oluşturacak şekilde geri primer dizayn edilmiştir.

Tasarlanan primerler macrogen firmasından tedarik edilmiştir. Primerlere ait bilgiler Çizelge 3.3'te gösterilmiştir (gctagc: NheI, ggatcc: BamHI ve gaaaacctgtatttcagggc: TEV proteaz tanıma dizisi).

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler

Primer ismi	Primer dizisi	Uzunluk	%GC	Tm
mClover3_ileri	5'-tttttgctagcatggtgag caagggcgaggagctg-3'	36 baz çifti	52.78	77.8
mClover3_geri	5'-tttttggtatcctaccgccc tgaaaatacaggtttcaagctt gtacagctcgatccatgcc-3'	62 baz çifti	46.77	84.9

mRuby3 proteinine ait gen dizisi aynı şekilde plazmit içerisinde Addgene firmasından ticari olarak elde edilmiştir (Şekil 3.2). Bu noktada, pNCS-mRuby3 plazmiti hem çoğaltılan mClover3 geni için bir vektör hem de mRuby3 proteininin sentezi için bir gen kaynağı olarak kullanılmıştır. PCR ile çoğaltılacak mClover3 geninin, pNCS-mRuby3 vektöründe bulunan NheI ve BamHI enzim kesim bölgelerinin arasına yerleştirilerek genetik olarak ifade edilen FP-FRET biyosensörünün oluşturulması hedeflenmiştir.



Şekil 3.2. mRuby3 geni içeren ve vektör olarak kullanılan plazmit (Addgene, #74234)

Hedeflenen yapının pNCS-mRuby3 vektörü üzerinde oluşturulması durumunda, ekspresyonu gerçekleşecek mClover3-TEV tanıma dizisi-mRuby3 biyosensörüne ait aminoasit dizisi Şekil 3.3'te gösterilmiştir. Şekilde gösterilen 6-Histidin kuyruk vektör kaynaklı olarak yapıya eklenmektedir. Bu kuyruk yapısı, biyosensörün hücrede üretildikten sonra saflaştırılması, TEV proteaz tanıma bölgesi ise biyosensörün etkinliğinin tespit edilmesi açısından önemlidir.

MRGSHHHHHHGMAS MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTLL
KFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVACFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGT
YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFSHYVYTADKQKNCIKANFKI
RHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSHQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAA
GITHGMDELYKLENLYFQGGEDP MVSKGEELIKENMRMKVVMEGSVNGHQFKCTGEGEG
RPYEGTQTMRIKVIIEGGPLPFAFDILATSFMYGSRTFIKYPADIPDFFKQSFPEGFTWERVTRY
EDGGVVTVTQDTSLEDGELVYNVKVRGVNFPSPNGPVMQKKTGWEPNTEMMYPADGGL
RGYTDIALKVDGGGHLHCNFTTYRSKKTGVNKMPPGVHVDHRLERIEESDNETYVVQR
EVAVAKYSNLGGGMDELYK-

Şekil 3.3. mClover3-mRuby3 FRET çifti için tasarlanan yapının aminoasit dizisi. Gri ile renklendirilmiş dizi vektör olarak kullanılan pNCS-mRuby3 plazmitinden gelen kısım, yeşil ile renklendirilen dizi mClover3, turkuaz ile renklendirilen dizi TEV proteaz tanıma bölgesi ve kırmızı renk ise mRuby3 dizisini göstermektedir.

mClover3 geninin PCR ile çoğaltılması

PCR işlemi öncesinde, kalıp DNA olarak kullanılacak pNCS-mClover3 plazmiti ticari olarak elde edildikten sonra *E. coli* DH5a kompetent hücrelerine transformasyonu yapılarak çoğaltılmıştır. Daha sonra hücrelerden plazmitlerin saflaştırılması işlemi, “Geneaid, Presto™ Mini Plasmid” kit yardımıyla belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi ise primerler yardımıyla ve Çizelge 3.4’te belirtilen uygun konsantrasyon ve miktarlardaki bileşenler kullanılarak Çizelge 3.5’te belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşen (Konsantrasyon)	Miktar
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	0.5 µl
Forward primer (10 µM)	0.5 µl
Pfu buffer (10x)	5 µl
Kalıp DNA (127 ng/µl)	1.5 µl
Pfu DNA polimeraz	0.2 µl
Saf su (DNaz free)	41.3 µl
Toplam reaksiyon hacmi	50 µl

Primerlerin Tm değerlerinin dolayısıyla bağlanma sıcaklıklarının yüksek olmasında dolayı prosedürün 1. adımında sıcaklık değerleri üzerinde birkaç deneme yapılmıştır ve mClover3 geninin elde edildiği uygun sıcaklık değerleri Çizelge 3.5’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. PCR Prosedürü

	Sıcaklık	Zaman
1.Adım	95 °C	5 dk
	73 °C → 68°C (Her 30 sn’de 0.5 °C düşecek şekilde toplam 10 döngü)	5 dk
	72 °C	45 sn
2.Adım (25 Döngü)	95 °C	30 sn
	68 °C	30 sn
	72 °C	1 dk
	72 °C (son uzama)	2 dk

PCR işlemi tamamlandıktan sonra PCR tüplerinde bulunan her bir karışım, hazırlanan %1’lik agaroz jelde bulunan kuyucuklara yüklenerek yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Jel görüntüleme cihazında PCR ürünü tek bant şeklinde ve beklenen büyüklükte gözlemlenmiştir. Görüntüleme sonrasında ise PCR ürünü (mClover3 geni) jelden gen izolasyon için kullanılan “Geneaid, Gel Extraction” kiti ile prosedüre uygun olarak saflaştırılmıştır.

Restriksiyon enzimleri ile kesim

Vektör olarak kullanılacak pNCS-mRuby3 plazmiti de ticari olarak elde edildikten sonra *E. coli* DH5α kompetent hücrelerine transformasyonu yapılarak çoğaltılmıştır. Daha sonra hücrelerden plazmitlerin saflaştırılması işlemi “Geneaid, Presto™ Mini Plasmid” kit yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

PCR işlemi sonrası jelden saflaştırılan mClover3 geni ve hücrelerden saflaştırılan pNCS-mRuby3 plazmiti, belirlenen restriksiyon enzimleri ile iki aşamalı olarak Çizelge 3.6 ve 3.7’de belirtilen bileşenler ve miktarlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Her iki aşama sonrasında da kesim ürünleri “Geneaid, Gel Extraction” kiti ile belirtilen prosedüre uygun olarak saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.6. BamHI restriksiyon enzimi ile kesim

mClover3 geni için kesim	pNCS-mRuby3 plazmiti için kesim
21 µl → mClover3 geni (20 ng/µl)	21 µl → pNCS-mRuby3 (40 ng/µl)
3 µl → Buffer K	3 µl → Buffer K
1 µl → BamHI (15 U/µl)	1 µl → BamHI (15 U/µl)
3 µl → BSA (%0.1)	3 µl → BSA (%0.1)
2 µl → Saf su	2 µl → Saf su

Bileşenler belirtilen miktarlarda ependorflara eklendikten sonra 37 °C’de bulunan sıcak su banyosunda 3 saat kesime bırakılmıştır ve her saat ependorflara spin işlemi uygulanmıştır. 1,5 saat sonra 1 µl BamHI enzimi ilave edilerek kesime devam edilmiştir. Kesim işlemi bittikten sonra kesim ürünleri 40 µl saf su ile saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.7. NheI restriksiyon enzimi ile kesim

mClover3 geni için kesim	pNCS-mRuby3 plazmiti için kesim
40 µl → Saflaştırılmış ürün (BamHI ile kesilmiş mClover3 + saf su içerir)	40 µl → Saflaştırılmış ürün (BamHI ile kesilmiş pNCS-mRuby3 + saf su içerir)
5 µl → Buffer M	5 µl → Buffer M
1 µl → NheI (10 U/µl)	1 µl → NheI (10 U/µl)
4 µl → BSA (%0.1)	3 µl → BSA (%0.1)

Aynı şekilde NheI enzimi ile 37 °C’de 3 saat boyunca kesim gerçekleştirilmiş ve kesim ürünleri işlem sonunda “Geneaid, Gel Extraction” kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

Kesim ürünleri için ligasyon işlemi

BamHI ve NheI enzimleri ile kesilerek yapışkan uçlu hale getirilen vektör ve gen, T4 DNA ligaz enzimi kullanılarak birleştirilmiştir. Çizelge 3.8’de belirtilen miktarların pipetleme işlemi gerçekleştirilip +16 °C’de 16 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonrası ürünler, transformasyon işlemi için +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.8. Ligasyon bileşenleri ve miktarları

Ligasyon bileşenleri	Miktar
mClover3 geni (5 ng/μl)	18 μl
pNCS-mRuby3 vektörü (2 ng/μl)	3 μl
T4 DNA ligaz enzimi (350 U/ μl)	1 μl
T4 DNA ligaz tamponu (10x)	3 μl

Transformasyon

Ligasyon ürünlerinin transformasyon işlemi aşağıda belirtilen prosedürü uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

- -80 °C’de bulunan kompetent *E. coli* DH5α hücreleri alınarak çözülmesi için buz içerisinde bekletilmiştir.
- +4 °C’de bekletilen ligasyon ürünleri ve ligasyonun gerçekleşeceği boş mikrotüpler buz içerisine yerleştirilmiştir.
- 200 μl kompetent hücre alınarak boş mikrotüpe pipetleme işlemi yapılmıştır. Üzerine ise 5 μl ligasyon ürünü ilave edilerek hafifçe karıştırılmıştır ve 1 saat boyunca buz içerisinde bekletilmiştir.
- 1 saatin sonunda tüpler buzdan alınarak 42 °C’de bulunan sıcak su banyosunda 2 dk. boyunca ısı şokuna maruz bırakılmıştır.
- Ardından tekrar buza yerleştirilerek 5 dk. bekletilmiştir.
- İşlem sonunda mikrotüp üzerine 200 μl LB sıvı besiyeri eklenerek 37 °C’de 210 rpm’de 30-45 dk. boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra her bir mikrotüp içerisindeki karışım antibiyotik içeren LB agar petrilere yayma ekimi yapılarak 37 °C’de 16 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Plazmit DNA saflaştırma

37 °C’de inkübasyona bırakılan antibiyotikli petrilere koloni oluşumu gözlemlenmiştir. Ardından, 4 μl ampicilin (100 μg/μl) alınarak 4 ml’lik LB sıvı besiyeri içeren tüplere eklenmiştir. Petrilere büyüyen kolonilerden bir tane alınarak antibiyotikli sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır.

Her bir tüpe farklı koloni ekimi gerçekleştirilmiştir. LB besiyeri içeren 4 ml’lik tüpler 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gece boyu büyüyen hücreler 2 ml’lik mikrotüplere alınarak 15 000 rpm’de 1 dk. santrifüj yapılarak toplanmıştır. Bu hücrelerden plazmit DNA saflaştırma işlemi ise “Geneaid, Presto™ Mini Plasmid” kiti yardımıyla belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Doğrulama kesimi

Plazmitlerin, *E. coli* DH5α hücrelerinden saflaştırıldıktan sonra genin vektör içerisine ligasyon ile yerleşip yerleşmediğini tespit etmek amacıyla belirlenen restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirilmiştir. Plazmitlerin, BamHI ve NheI enzimleri aynı anda yüksek verimlilikte kesimin gerçekleştirilebilmesi için uygun tampon mevcut olmadığından dolayı iki aşamalı olarak kesim işlemi tercih edilmiştir (Çizelge 3.9). İlk olarak BamHI enzimi ile kesilerek kesim ürünleri “Geneaid, Gel Extraction” kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Ardından NheI enzimi ile ikinci aşamada belirtilen kesim işlemi yapılmıştır. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra kesim ürünleri %1’lik agaroz jelde yürütülerek analiz edilmiştir.

Çizelge 3.9. Doğrulama kesimi

1. Aşama	2. Aşama
10 µl → Plazmit DNA (240 ng/µl)	30 µl → Plazmit DNA + Saf su
2 µl → BSA	4 µl → Buffer M
2 µl → Buffer K	4 µl → BSA
1 µl → BamHI (15 U/µl)	1 µl → NheI (10 U/µl)
5 µl → Saf su	

DNA dizi analizi

Doğrulama kesimi sonrası elde edilen ürünlerin jelde görüntülenmesi sonucu klonlamanın gerçekleştiği düşünülen ve pozitif olarak adlandırılan plazmitler tespit edilmiştir. Bu pozitif plazmitlerden DNA dizi analizini mümkün kılacak konsantrasyonda örnekler hazırlanarak DNA dizilemeye gönderilmiştir. DNA dizileme işlemi T7 promotor primeri kullanılarak tek yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. Ardından pozitif plazmitlerden mClover3-mRuby3 FRET biyosensörünün üretimi için çalışmalara devam edilmiştir.

mClover3-mRuby3 FRET çiftinin üretimi

pNCS-mClover3 plazmiti kalıp olarak kullanılarak mClover3 geni PCR işlemi ile çoğaltılmıştır. Elde edilen mClover3 geni ve pNCS-mRuby3 plazmiti restriksiyon enzimleri ile kesilerek ligasyona bırakılmıştır. Ardından mClover3 ve mRuby3 genlerini içeren rekombinant plazmitler elde edilmiştir. Bu plazmitler yapılan doğrulama çalışması ile pozitif olarak adlandırılmıştır. Tasarlanan bu biyosensör yapısının üretimi için *E. coli* BL21 pLysE hücreleri kullanılmıştır. Pozitif plazmitler, yukarıda belirtilen transformasyon prosedüre uygun olarak hücrelere transfer edilmiştir. Transformasyon işlemi sonrasında hücreler ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiği içeren LB agar besiyerine yayma metoduyla ekim işlemi gerçekleştirilmiştir ve 37 °C’de 16 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucu petride gözlemlenen kolonilerinden örnekler alınarak, ampisilin ve kloramfenikol içeren 4 ml’lik LB sıvı besiyerlerine tek koloni ekimi yapılmıştır ve 37 °C’de 240 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 4 ml’lik tüplerden 1 ml hücre kültürü alınarak ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiği içeren 50 ml’lik LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. İnokülasyondan yaklaşık 2 saat sonra belirli aralıklarla 50 ml’lik sıvı kültürden örnekler alınarak spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda OD (optik yoğunluk) takibi yapılmıştır. Hücrelerin OD değeri 0.6 olduğunda 50 µl IPTG (1 M) ilave edilerek tasarlanan biyosensörün üretimi indüklenmiştir. İndükleme işleminden sonra kültür 37 °C’de 240 rpm’de 3 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İndüklemeden önce ve indüklemeden sonraki 3. saatin sonunda hücre kültüründen 1 ml örnek alınarak SDS-PAGE analizi için hazırlanmıştır.

3.2.2. mNeonGreen-mRuby3 FRET çifti

Plazmit tasarımı

mNeonGreen proteinine ait DNA dizisi NCBI'dan elde edilmiştir (KC295282.1). Ardından DNA dizisi JCat kodon optimizasyonu programı kullanılarak *E. coli* K12 organizması için kodon optimizasyonu yapılmıştır (<http://www.jcat.de/>). mRuby3 proteinine ait DNA dizisi Addgene veri tabanından elde edilmiştir (plazmit katalog numarası: 74234). Biyosensöre ait DNA dizisi 5'-mNeonGreen-TEV proteaz tanıma dizisi-mRuby3-3' şeklinde tasarlanmıştır. mNeonGreen DNA dizisinin 5' ucuna, NdeI ve NcoI enzimleri için tanıma bölgeleri eklenmiştir. mRuby3 DNA dizisinin 3' ucuna ise sırasıyla histidin kuyruk (6x-His), stop kodonu ve HindIII enzimi için tanıma bölgesi eklenmiştir. Bu işlemler, ilgili dizinin farklı vektörlere klonlanmasını mümkün kılacak şekilde modifiye edilmiştir. TEV proteaz tanıma dizisinin 5' ucuna BamHI, 3' ucuna ise EcoRI enzimi için tanıma dizisi eklenmiştir. Bu işlem, sonraki çalışmalarda TEV proteaz tanıma dizisinin çıkarılarak farklı tanıma dizilerinin eklenmesiyle yeni biyosensörlerin geliştirilmesi açısından önemlidir. Ayrıca, TEV kesim bölgesinin her iki yanına linker uzunluğunun optimizasyonu ve stabilizasyon için serin ve glisin aminoasitlerine ait kodonlar eklenmiştir (Şekil 3.4).

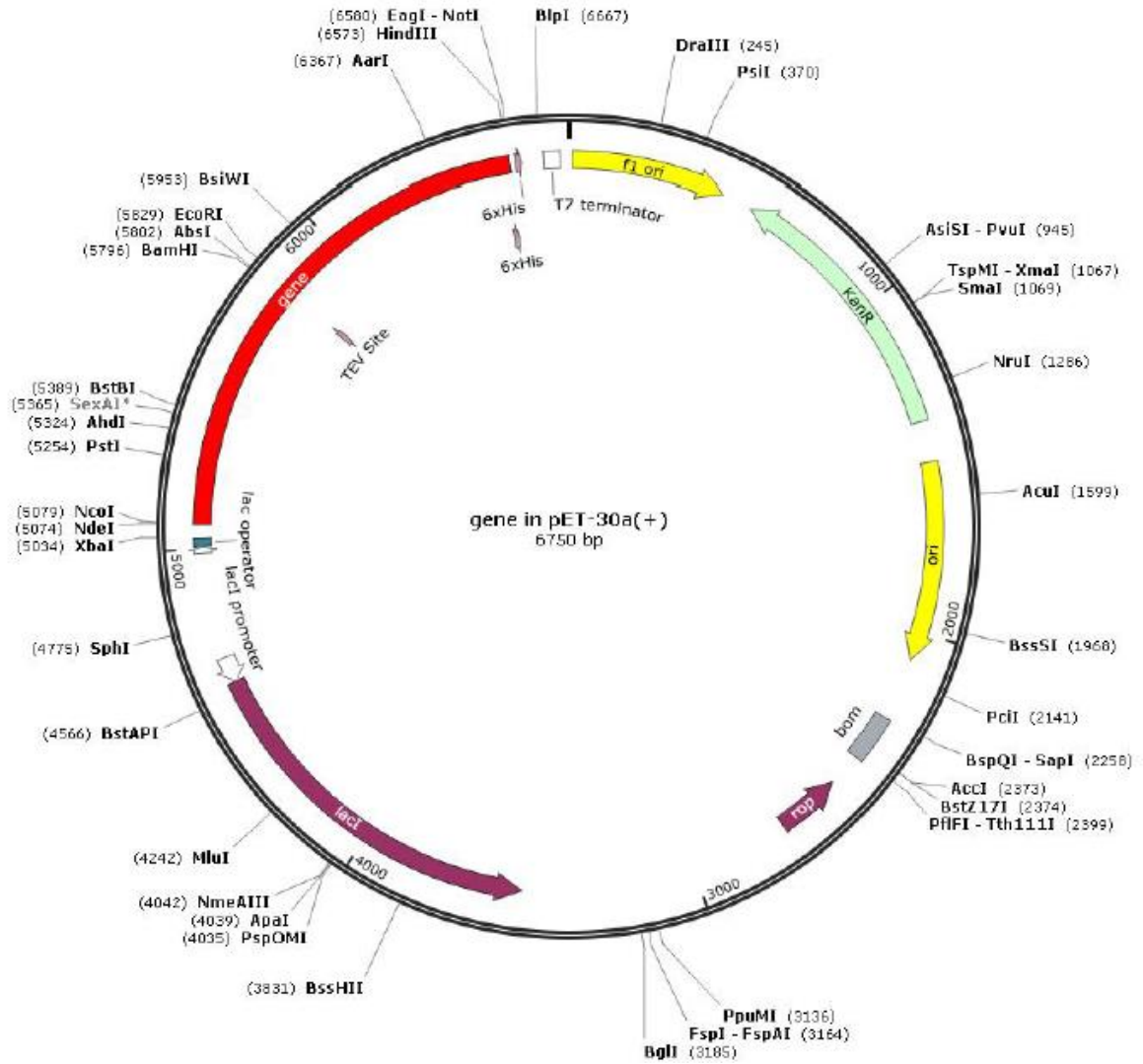
Son olarak, tasarlanan DNA dizisinde istenmeyen restriksiyon enzim kesimlerinin önüne geçmek amacıyla, NEB cutter V2.0 programı kullanılarak dizi üzerindeki kesim bölgeleri tespit edilmiş ve aminoasit dizisinde değişikliğe neden olmayacak şekilde gerekli düzenlemeler yapılmıştır. İlgili dizi, pET-30a vektörü içerisine klonlanmış şekilde Biomatik firmasından tedarik edilmiştir (Şekil 3.5).

```

cat atg CCA TGG ATG GTT TCT AAA GGT GAA GAA GAC AAC ATG GCT TCT CTG
CCG GCT ACC CAC GAA CTG CAC ATC TTC GGT TCT ATC AAC GGT GTT GAC TTC
GAC ATG GTT GGT CAG GGC ACC GGT AAC CCG AAC GAC GGT TAC GAA GAA CTG
AAC CTG AAA TCT ACC AAA GGT GAC CTG CAG TTC TCT CCG TGG ATt CTG GTT
CCG CAC ATC GGT TAC GGT TTC CAC CAG TAC CTG CCG TAC CCG GAC GGT ATG
TCT CCG TTC CAG GCT GCT ATG GTT GAC GGT TCT GGT TAC CAG GTT CAC CGT
ACC ATG CAG TTC GAA GAC GGT GCT TCT CTG ACC GTT AAC TAC CGT TAC ACC
TAC GAA GGT TCT CAC ATC AAA GGT GAA GCT CAG GTT AAA GGC ACC GGT TTC
CCG GCT GAC GGT CCG GTT ATG ACC AAC TCT CTG ACC GCT GCT GAC TGG TGC
CGT TCT AAA AAA ACC TAC CCG AAC GAC AAA ACC ATC ATC TCT ACC TTC AAA
TGG TCT TAC ACC ACC GGT AAC GGT AAA CGT TAC CGT TCT ACC GCT CGT ACC
ACC TAC ACC TTC GCT AAA CCG ATG GCT GCT AAC TAC CTG AAA AAC CAG CCG
ATG TAC GTT TTC CGT AAA ACC GAA CTG AAA CAC TCT AAA ACC GAA CTG AAC
TTC AAA GAA TGG CAG AAA GCg TTC ACC GAC GTT ATG GGT ATG GAC GAA CTG
TAC AAA ggc gga tcc CTC GAG GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC GAA TTC tct
ggc ggc GTT TCT AAA GGT GAA GAA CTG ATC AAA GAA AAC ATG CGT ATG AAA
GTT GTT ATG GAA GGT TCT GTT AAC GGT CAC CAG TTC AAA TGC ACC GGT GAA
GGT GAA GGT CGT CCG TAC GAA GGT GTT CAG ACC ATG CGT ATC AAA GTT ATC
GAA GGT GGT CCG CTG CCG TTC GCT TTC GAC ATC CTG GCT ACC TCT TTC ATG
TAC GGT TCT CGT ACC TTC ATC AAA TAC CCG GCT GAC ATC CCG GAC TTC TTC
AAA CAG TCT TTC CCG GAA GGT TTC ACC TGG GAA CGT GTT ACC CGT TAC GAA
GAC GGT GGT GTT GTT ACC GTT ACC CAG GAC ACC TCT CTG GAA GAC GGT GAA
CTG GTT TAC AAC GTT AAA GTT CGT GGT GTT AAC TTC CCG TCT AAC GGT CCG
GTT ATG CAG AAA AAA ACC AAA GGT TGG GAA CCG AAC ACC GAA ATG ATG TAC
CCG GCT GAC GGT GGT CTG CGT GGT TAC ACC GAC ATC GCT CTG AAA GTT GAC
GGT GGT GGT CAC CTG CAC TGC AAC TTC GTT ACC ACC TAC CGT TCT AAA AAA
ACC GTT GGT AAC ATC AAA ATG CCG GGT GTT CAC GCT GTT GAC CAC CGT CTG
GAA CGT ATC GAA GAA TCT GAC AAC GAA ACC TAC GTT GTT CAG CGT GAA GTT
GCT GTT GCT AAA TAC TCT AAC CTG GGT GGT GGT ATG GAC GAA CTG TAC AAA
CAT CAT CAT CAT CAT CAT TAA AAG CTT

```

Şekil 3.4. mNeonGreen-mRuby3 FRET çifti için tasarlanan plazmit. mNeonGreen DNA dizisi içerisinde renklendirilmiş yerler istenmeyen restriksiyon kesimini önlemek için, amino asit dizisini değiştirmeden kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Turkuaz ile renklendirilmiş kısım, TEV proteaz tanıma bölgesidir.



Şekil 3.5. mNeonGreen-mRuby3 genlerini içeren pET-30a vektörü (Biomatik, 2019)

mNeonGreen-mRuby3 FRET biyosensörünün üretimi

Ticari olarak elde edilen mNeonGreen-mRuby3 plazmiti 100 ng/μl konsantrasyona seyreltildikten sonra 1 μl plazmit alınarak, kompetent *E. coli* BL21 pLysE, *E. coli* C41(DE3) ve *E. coli* DH5α hücrelerine başlık 3.2.1’de belirtilen prosedüre uygun olarak transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından BL21 pLysE hücreleri, kanamisin ve kloramfenikol; C41(DE3) ve DH5α hücreleri ise sadece kanamisin antibiyotiği içeren LB agar besiyerlerine yayma ekimi yapılmıştır.

Petriler 37 °C’de 16 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası petrilere gözlemlenen koloniler alınarak, ilgili hücrelere ait antibiyotikleri içeren, 4 ml’lik LB sıvı besiyerlerine tek koloni ekimi yapılmıştır ve 37 °C’de 240 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında *E. coli* BL21 pLysE, *E. coli* C41(DE3) ve *E. coli* DH5α hücreleri için uygulanan prosedürler aşağıda belirtilmiştir.

E. coli BL21 pLysE hücrelerinin 16 saatlik inkübasyon sonrasında, 4 ml’lik tüplerden 1 ml hücre kültürü alınarak, kanamisin ve kloramfenikol antibiyotiklerini içeren 50 ml’lik LB sıvı kültürlerine inokülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 50 ml’lik sıvı kültürlerde büyüyen *E. coli* BL21 pLysE hücrelerinden, inokülasyondan sonra belirli aralıklarla örnekler alınarak spektrofotometrede 600 nm’de OD ölçümleri yapılmıştır. OD değeri 0.6 olduğunda 50 µl IPTG (1 M) ile indüklenmiştir. Ardından hücreler 37 °C’de 240 rpm’de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 2 saatlik inkübasyon sonrasında ve indüklemeden önce SDS-PAGE analizi için hücre kültürlerinden 1 ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler SDS yükleme tamponu ile muamele edilerek 100 °C’de 5 dk. kaynatılarak hazır hale getirilmiştir. *E. coli* BL21 pLysE hücrelerinden protein saflaştırma işlemi yapılmaksızın sadece SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiştir.

E. coli C41(DE3) hücrelerinin 16 saatlik inkübasyonu sonrasında 4 ml’lik sıvı kültür, kanamisin antibiyotiği içeren 600 ml’lik LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. OD değeri 0.6 olduğunda 600 µl IPTG (1 M) ile indüklenmiştir. İndükleme işleminden 3 saat sonra hücreler 8 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Daha sonra parçalanmak üzere -20 °C’de saklanmıştır. SDS-PAGE analizi için indükleme öncesi ve sonrasına ait hücre örnekleri alınmıştır.

E. coli DH5α hücreleri ise 13-16 saatlik inkübasyon sonrasında kanamisin antibiyotiği içeren 600 ml’lik LB sıvı besiyerine 4 ml hücre kültürü inoküle edilerek, IPTG ile indükleme işlemi yapılmaksızın 37 °C’de 240 rpm’de yaklaşık 20 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler 8 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplandıktan sonra parçalanmak üzere -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Hücrelerin parçalanması

-20 °C’de bulunan hücreler çıkarılarak çözülmesi için buza gömülmüştür. Santrifüj tüplerinde bulunan hücrelerin üzerine lizis tamponu eklenerek vorteks yardımıyla hücreler süspanse hale getirilmiştir. Ardından bu karışım cam bir behere alınarak üzerine lizozim enzimi, PMSF ve benamidin eklenmiştir. Beher içerisindeki hücreler yaklaşık +4 °C’de 1 saat boyunca sonikatör yardımıyla parçalanmıştır. Parçalama sonrası, 6 000 rpm’de 10 dk. santrifüj işlemi yapılarak parçalanmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası çökmeyen hücre lizatı ise 30 000 rpm’de 1 saat santrifüj edilerek hidrofobik bileşenler çöktürülmüştür.

Afinite kromatografisi ve saflaştırma işlemi

Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, yaklaşık 1 ml Ni-NTA agaroz rezin içeren kolona yüklenmiştir. Bu sayede proteinlerin kolona tutunma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kolondan yıkama tamponu geçirilerek kolona zayıf tutunan proteinlerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son olarak, imidazol içeren elüsyon tamponunun geçirilmesiyle, kolona tutunmuş proteinlerin saflaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Kolona tutunmuş proteinler küçük fraksiyonlar halinde saflaştırılmıştır. Elde edilen proteinlerin saflığı ve miktarı spektrofotometre cihazında analiz edilmiştir. Saflaştırma işleminin her aşamasında örnekler alınarak SDS-PAGE analizde kullanmak üzere SDS yükleme tamponu ile muamele edilip 100 °C’de 5 dk. kaynatılarak hazır hale getirilmiştir.

3.2.3. TEV proteaz enziminin üretilmesi ve saflaştırılması

TEV proteaz geni içeren plazmitin, başlık 3.2.1’de uygulanan prosedüre uygun olarak *E. coli* BL21 pLysE hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrası hücreler ampisilin ve kloramfenikol antibiyotikleri içeren LB agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 16 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 4 ml’lik LB besiyerlerine tek koloni ekimi yapılarak 37 °C’de 240 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 4 ml’lik hücre kültürü, ampisilin ve kloramfenikol antibiyotiklerini içeren 600 ml’lik LB sıvı besiyerine inoküle edilerek 37 °C ve 240

rpm’de büyümeye bırakılmıştır. Hücreler, OD değeri 0.6 olduğunda IPTG (1 M) ile indüklenerek 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, inkübasyon sonrası hücreler 8 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplandıktan sonra parçalama işlemi için -20 °C’de saklanmıştır. Başlık 3.2.2’de belirtilen prosedüre uygun olarak hücrelerin parçalanması ve saflaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirli aşamalarda alınan örnekler SDS-PAGE’de analiz edilmiştir.

3.2.4. TEV proteaz kesimi

Kolondan imidazol yardımıyla saflaştırılan TEV proteaz enzimi ve mNeonGreen-mRuby3 füzyon proteininden imidazolun uzaklaştırılması için 1x TEV proteaz tamponuna karşı yaklaşık 16 saat diyaliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonrası TEV proteaz enzimi (3,5 mg/ml) ve mNeonGreen-mRuby3 füzyon proteininin (6 mg/ml) konsantrasyonları spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Ardından 6 adet mikrotüp içerisine Çizelge 3.10’da belirtildiği şekilde, miktar ve bileşenler eklenerek etiketleme işlemi yapılmıştır. 1 ve 2 numaralı tüp kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca β -merkaptotanol’ün renk değişimi üzerinde bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla 4 ve 6 numaralı tüplerde β -merkaptotanol içeren tampon kullanılarak reaksiyonlar oluşturulmuştur. mNeonGreen-mRuby3 füzyon proteini TEV proteaz enzimi ile 30 °C’de 3 saat kesime bırakılmıştır.

Çizelge 3.10. mNeonGreen-mRuby3 füzyon proteininin TEV proteaz enzimi ile kesimi (A: merkaptotanol içermeyen 1x TEV proteaz tamponu, B: β -merkaptotanol içeren 1x TEV proteaz tamponu)

	1	2	3	4	5	6
TEV proteaz enzimi	-	50 μ l	65 μ l	-	25 μ l	25 μ l
1x TEV tamponu	165 μ l A	150 μ l A	100 μ l A	140 μ l A + 25 μ l B	140 μ l A	140 μ l B
mNeonGreen-mRuby3 proteini	35 μ l	-	35 μ l	35 μ l	35 μ l	35 μ l

Kesim işlemi tamamlandıktan sonra mikrotüplerde meydana gelen renk değişimi görüntülenmiştir (Şekil 4.9). Ayrıca kesim ürünlerinden örnekler alınarak SDS-PAGE’de analiz edilmiştir (Şekil 4.10).

3.2.5. Spektrofluorometre analizi

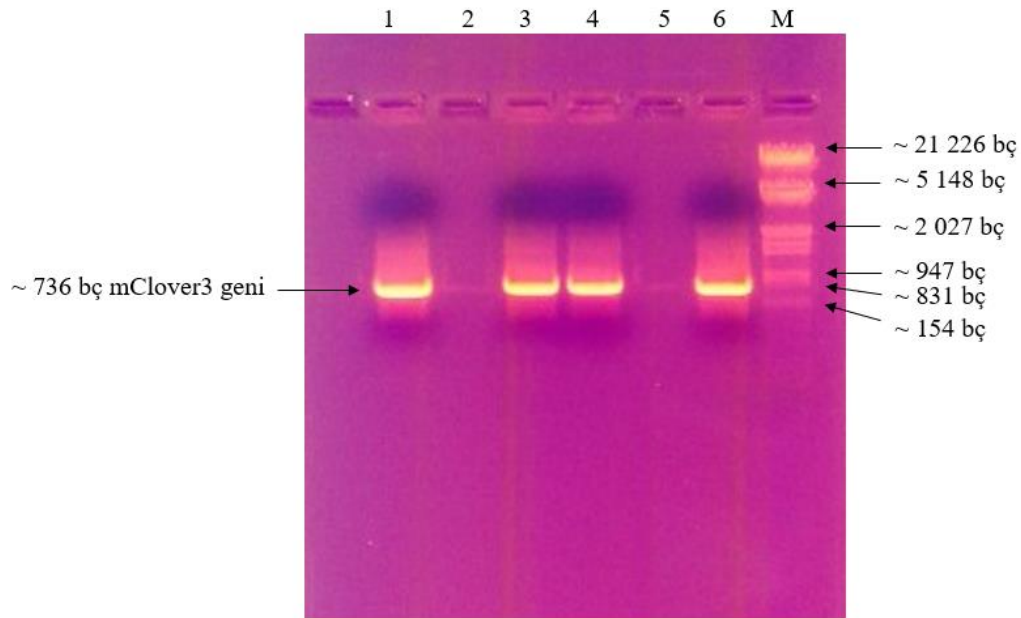
Üretilen FP-FRET biyosensörünün TEV enzimi ile kesimi sonrası elde edilen ürünlerin spektrofluorometre cihazında emisyon dalga boylarına bakılmıştır. 1, 3, 4, 5 ve 6 numaralı mikrotüplerde bulunan kesim ürünlerinden 50 µl örnek alınarak ölçümün yapılabilmesi için uygun konsantrasyona seyreltilmiştir. Ardından 510-700 nm dalga boyu aralığında emisyon ölçümü yapılmıştır. Ölçümler cihazda emisyon modu programında, 5 nm veri aralığında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11).

4. BULGULAR

4.1. mClover3-mRuby3 FRET Çifti

4.1.1. mClover3 geninin PCR ile çoğaltılması

Başlık 3.2.1’de belirtilen prosedürü uygun olarak gerçekleştirilen PCR işlemine ait ürünler %1’lik agaroz jelde yürütülmüştür. Ardından çoğaltılan mClover3 geni, jelden kesilerek “Geneaid, Gel Extraction” kiti yardımıyla saflaştırılmıştır.

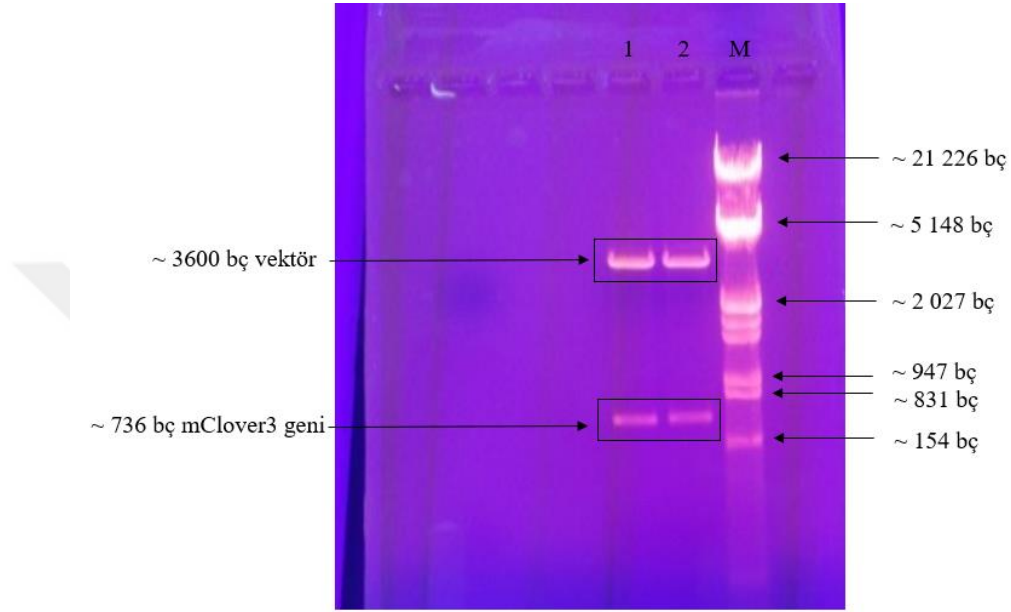


Şekil 4.1. mClover3 geninin PCR işlemi ile çoğaltılması ve %1’lik agaroz jelde yürütülmesi sonucu elde edilen jel görüntüsü. 1,3,4 ve 6. kuyucuklarda görüntülenen bantlar mClover3 geni ve son kuyucukta ise DNA marker (Promega, Lamda HindIII/EcoRI)

4.1.2. Restriksiyon enzimleri ile doğrulama kesimi

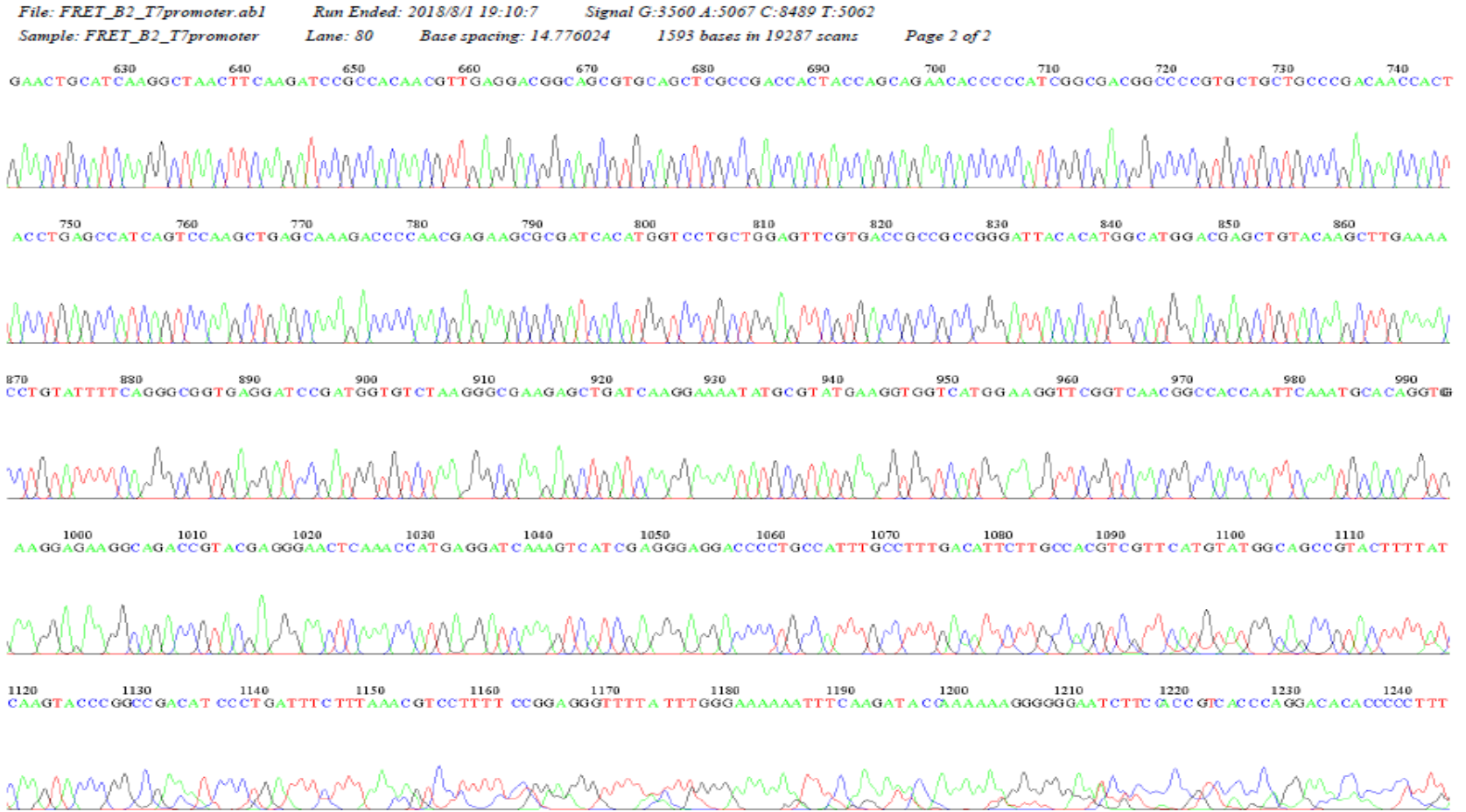
PCR işlemi ile elde edilen mClover3 geni ve *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyon yapılarak çoğaltılan pNCS-mRuby3 vektörü belirlenen restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyon yapılarak ve petride büyüyen kolonilerden, antibiyotik içeren 4 ml’lik LB sıvı besiyerine ekim işlemi yapılmıştır.

Daha sonra sıvı kültürde büyüyen hücrelerden plazmit DNA saflaştırma işlemi yapılmıştır ve saflaştırılan plazmitler klonlamada kullanılan restriksiyon enzimleri ile doğrulama kesimi işlemi 3.2.2’de belirtilen prosedüre uygun olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2. Ligasyon sonrası hücrelerden saflaştırılan plazmitlerin doğrulama kesimine ait ürünlerin %1’lik agaroz jel görüntüsü. 1 ve 2 numaralı kuyucuklar, kesim sonucu oluşan yaklaşık 736 bç uzunluğundaki mClover3 genini içeren pozitif plazmitler; M harfi, DNA marker (Promega, Lamda HindIII/EcoRI)

4.1.3. DNA dizi analizi



Şekil 4.3. Pozitif plazmite ait DNA dizi analizinin kromatogram görüntüsü (Macrogen)

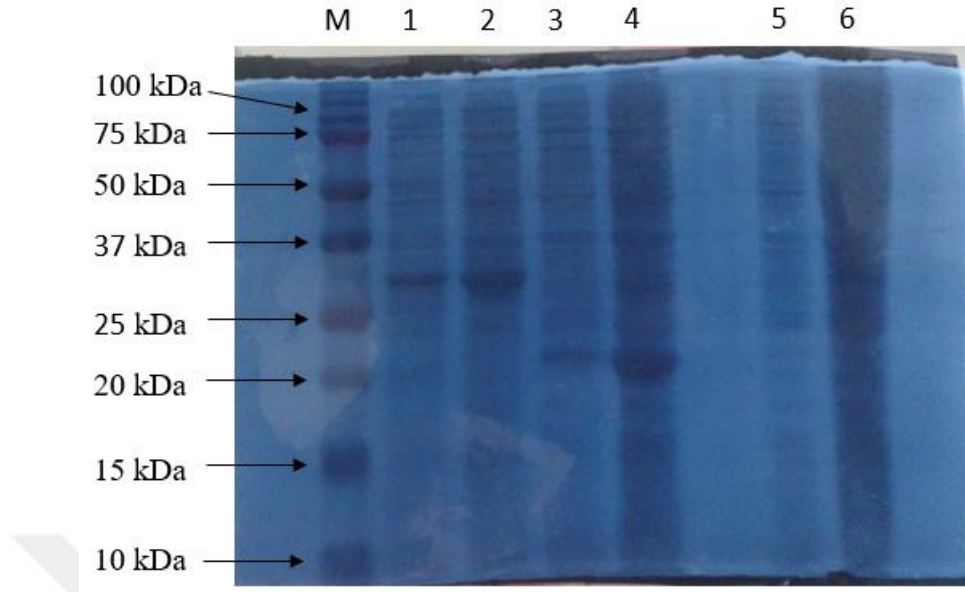
Teorik olarak tasarlanan DNA dizisi ile pozitif plazmite ait kromatogramdan (Şekil 4.3) elde edilen DNA dizisi, çoklu dizi karşılaştırma programı ‘Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment’ kullanılarak karşılaştırılmıştır. PCR ile çoğaltılan mClover3 geninin, pNCS-mRuby3 vektörü içerisine klonlama işlemi gerçekleştiği görülmüştür. Ardından kromatogramdan elde edilen DNA dizisi ‘ExPASy Translate Tool’ programı kullanılarak amino asit dizisine dönüştürülmüştür (Şekil 4.4). Fakat PCR işlemi sırasında, DNA dizisinde meydana gelen mutasyon sonucu çerçeve kayması oluşmuştur. ‘ExPASy ProtParam’ programı kullanılarak, çerçeve kayması sonucu elde edilen aminoasit dizisinin yaklaşık 24 kDa ağırlığında bir protein sentezlediği görülmüştür.

```
MRGSHHHHHGMASMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLT  
LFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVACFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDD  
GTYKTRADEVKFEGLTLVNRIELKGIDFKEDGNILGTSWSTTSTATTSISRPTSRRTASR  
LTSRSATTLRTAACSSPTTTSRTPPSATAPCCCPTTTT-AISPS-AKTPTRSAITWSCW  
SS-PPPGHLMAWTSCTSLKTCIFRAVRIRWCLRAKS-SRKICV-RWSWKVRSTATNSNA  
QVEGEGRPYEGTQTMRIKVIEGGPLPFAFDILATSFMYGSRTFIKYPADIPDFFKRPFP  
EGFIWEKISRYQKRGESSTVTQDTPPLGRANSSTTSRGERGEIFSQRGRGWKKKTKGVG
```

Şekil 4.4. Dizileme sonucu elde edilen amino asit sekansı

4.1.4. SDS-PAGE görüntüsü

Restriksiyon enzimleri ile yapılan doğrulama kesimi sonrası pozitif olarak belirlenen plazmitlerin *E. coli* BL21 pLysE hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyon sonrası petrilerden alınan koloniler ampisilin ve kloramfenikol içeren 4 ml’lik LB sıvı besiyerlerine ekim yapılarak 37 °C ve 240 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücre kültürleri ilgili antibiyotikleri içeren 50 ml’lik LB besiyerlerine inoküle edilerek 37 °C ve 240 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin OD değeri 0.6 olduğunda protein üretimi için ITPG ile indüklenmiştir. Hücre kültüründen alınan örnekler SDS-PAGE’de analiz edilmiştir (Şekil 4.5). Yapılan çalışmalar sonucu yaklaşık 55 kDa ağırlığında olması beklenen FP-FRET füzyon proteinin üretimi gerçekleşmemiştir.

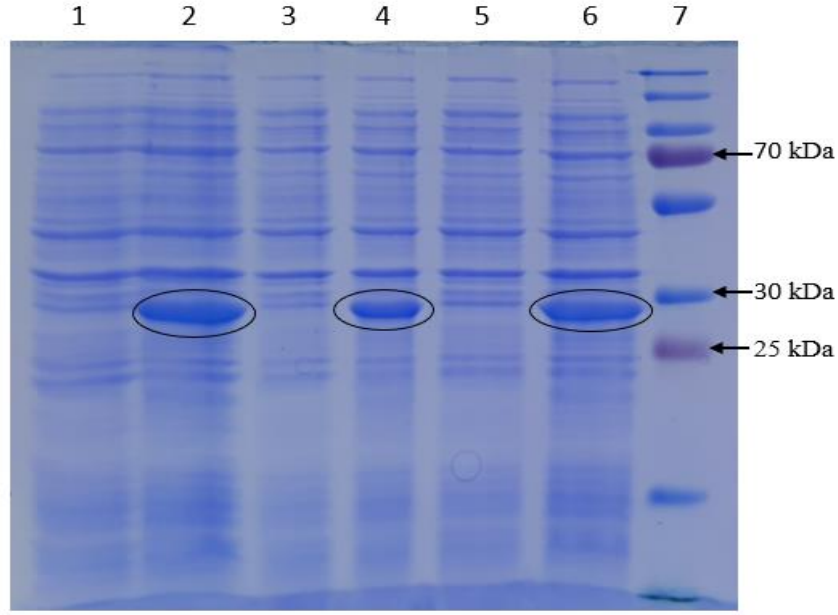


Şekil 4.5. mClover3-mRuby3 çiftine ait SDS-PAGE görüntüsü. 1 ve 3 numara, pozitif plazmiti içeren indüklenme öncesi hücreler; 2 ve 4, pozitif plazmiti içeren indüklenme sonrası hücreler, 5 ve 6 numara sırasıyla indüklenme öncesi ve sonrası kontrol *E. coli* BL21 pLysE hücreleri ve M, protein marker (Biorad, Precision Plus Protein Standarts, All Blue)

4.2. mNeonGreen-mRuby3 FRET Çifti

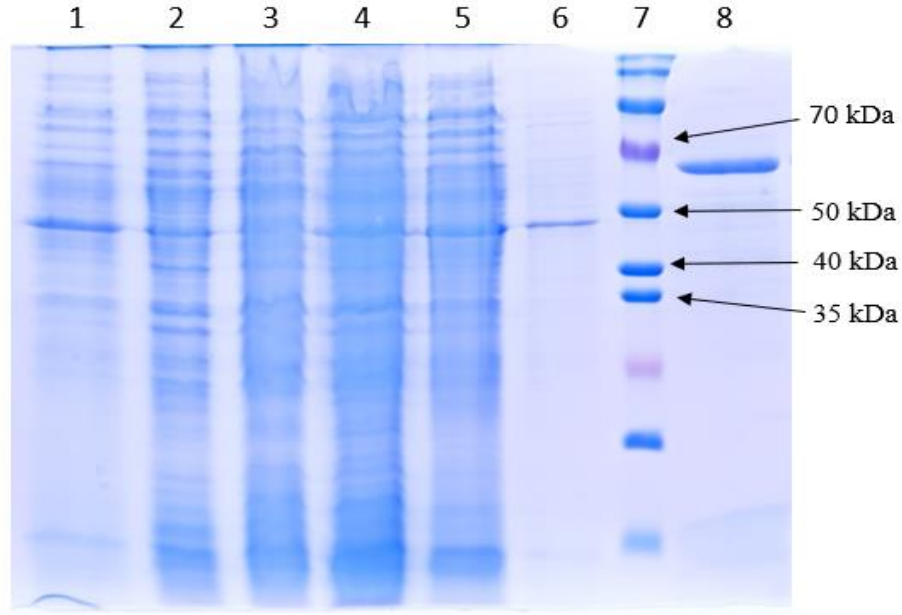
4.2.1. mNeonGreen-mRuby3 çiftinin üretilmesi ve saflaştırılması

mNeonGreen-mRuby3 plazmiti *E. coli* BL21 pLysE hücrelerine transfer edilmiştir. Transformasyon petrisinden 3 farklı koloni alınarak kanamisin ve kloramfenikol içeren 4 ml'lik LB sıvı besiyerlere tek koloni ekimi yapılmıştır 37 °C ve 240 rpm'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürler ilgili antibiyotikleri içeren 50 ml'lik LB sıvı besiyerlerine inoküle edilmiştir. OD değeri 0.6 olduğunda hücre kültürleri IPTG ile indüklenmiştir. Ardından hücreler 37 °C ve 240 rpm'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücre kültürlerinden örnekler alınarak SDS-PAGE'de analiz edilmiştir (Şekil 4.6).



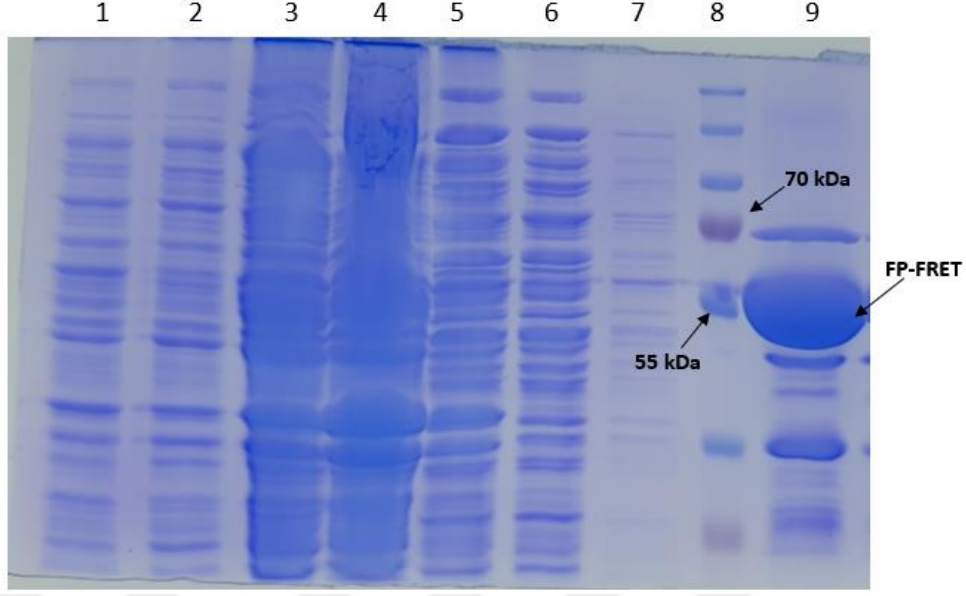
Şekil 4.6. mNeonGreen-mRuby3 çiftinin *E. coli* BL21 pLysE hücrelerinde üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü. 1, 3 ve 5. Kuyucuklar indüklemeye öncesi *E. coli* BL21 pLysE hücrelerine ait örnekler, 2, 4 ve 6. İndüklemeye sonrası *E. coli* BL21 pLysE hücreleri, 7. Protein marker (Thermo Scientific, PageRuler Plus Prestained Protein Ladder)

mNeonGreen-mRuby3 plazmitinin *E. coli* C41(DE3) hücrelerine transferi sonrası oluşan kolonilerden, kanamisin antibiyotiği içeren 4 ml'lik LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır. 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 4 ml'lik kültürün tamamı, kanamisin antibiyotiği içeren 600 ml'lik LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. OD değeri 0.6 olduğunda hücreler IPTG ile indüklenmiştir. İndüklemeye işleminden 3 saat sonra hücreler 8 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek toplanmıştır. Ardından hücreler başlık 3.2.2'de belirtilen prosedürlere uygun şekilde parçalanmış ve saflaştırılmıştır. Belirli aşamalarda alınan örnekler SDS-PAGE'de analiz edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. mNeonGreen-mRuby3 çiftinin *E. coli* C41(DE3) hücrelerinde üretimine ait SDS-PAGE görüntüsü 1. İndükleme öncesi hücre kültüründen alınan örnek, 2. İndükleme sonrası kültür örneği, 3. Ultrasantrifüj sonrası pelet, 4. Ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 5. Süpernatantın kolona verildikten sonra aşağıda biriken sıvıdan alınan örnek, 6. Kolondan yıkama tamponunun geçirilmesinden sonra aşağıda biriken sıvıdan alınan örnek, 7. Protein marker (Bio Basic Prestained Protein Ladder) 8. Elüsyon

mNeonGreen-mRuby3 plazmitinin *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyonu sonrasında kanamisin antibiyotiği içeren LB agar besiyerine yayma ekim yapılarak 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saatlik inkübasyon sonrasında 4 μ l kanamisin (50 mg/ml) antibiyotiği içeren 4 ml’lik LB sıvı besiyerine tek koloni ekimi yapılmıştır ve 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 4 ml’lik hücre kültürünün tamamı 600 μ l kanamisin (50 mg/ml) antibiyotiği içeren 600 ml’lik LB sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. IPTG ile indükleme işlemi yapılmaksızın 37 °C’de 240 rpm’de yaklaşık 20 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler 8 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek toplandıktan sonra hücreler başlık 3.2.11’de belirtilen şekilde parçalanmıştır. Daha sonra başlık 3.2.2’de belirtilen prosedürü uygun olarak saflaştırılmıştır. Belirli aşamalarda alınan örnekler SDS-PAGE’de analiz edilmiştir (Şekil 4.8).

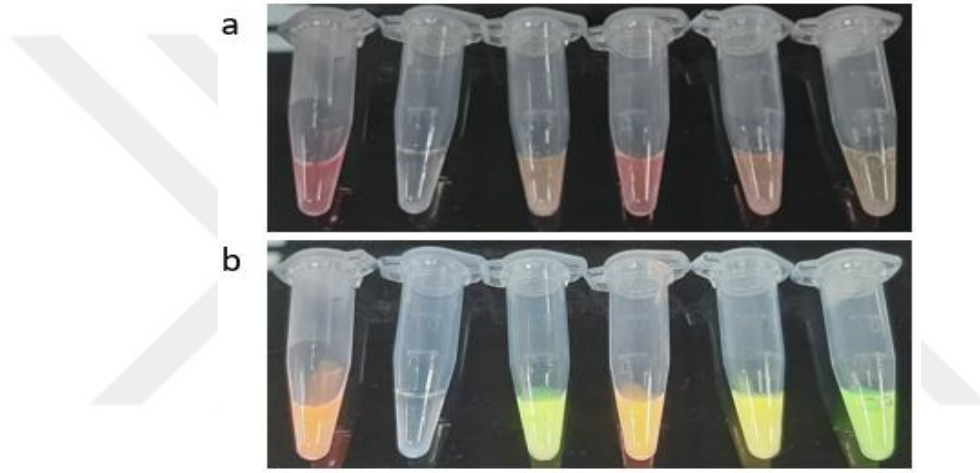


Şekil 4.8. mNeonGreen-mRuby3 FRET çiftinin *E. coli* DH5 α hücrelerinden saflaştırılmasına ait SDS-PAGE görüntüsü. 1. Hücre inokülasyonundan 2 saat sonra kültürden alınan örnek, 2. İnokülasyondan 4 saat sonra hücre kültüründen alınan örnek, 3. Parçalama sonrası peletten alınan örnek, 4. Ultrasantrifüj sonrası pelet, 5. Ultrasantrifüj sonrası süpernatant, 6. Süpernatantın kolona verildikten sonra aşağıda biriken sıvıdan alınan örnek, 7. Kolondan yıkama tamponunun geçirilmesiyle aşağıda biriken sıvıdan alınan örnek, 8. Protein marker (Thermo Scientific Prestained protein ladder), 9. Kolondan elüsyon tamponu geçirdikten sonra aşağıda biriken sıvıdan alınan örnek

4.2.2. mNeonGreen-mRuby3 çiftinin TEV proteaz ile kesimi

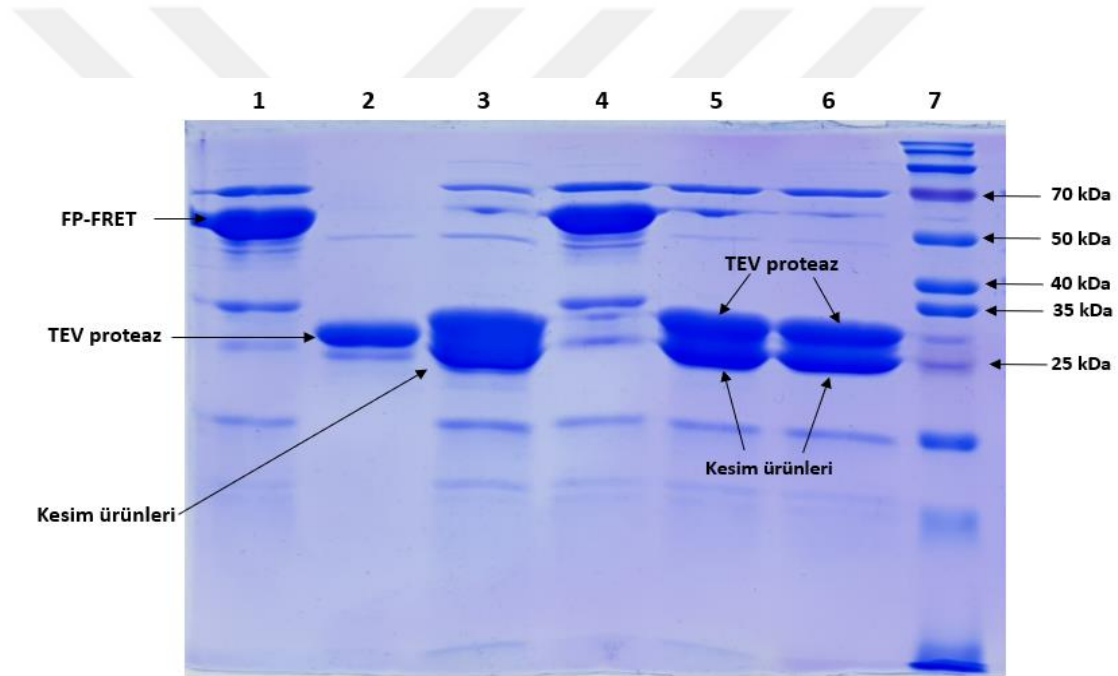
Saflaştırılan mNeonGreen-mRuby3 FRET çifti TEV proteaz enzimi ile başlık 3.2.4'te belirtilen prosedüre uygun olarak ve Çizelge 3.10'da belirtilen şekilde etiketlenerek kesime bırakılmıştır. Kesim sonrası mikrotüpler Şekil 4.9(a)'da gösterilmiştir. Kesim öncesi mikrotüplerin görüntüsü Şekil 4.9(a)'da bulunan 1. ve 4. (soldan) mikrotüpler ile aynı renktedir çünkü bu mikrotüpler TEV proteaz enzimi içermez. Bu yüzden kesim sonrasında 1. ve 4. mikrotüplerde renk değişiminin meydana gelmesi beklenmemektedir. Fakat 3., 5. ve 6. mikrotüplerde renk değişimin meydana geldiği görülmektedir. Bu durum, mNeonGreen-mRuby3 FRET biyosensöründe ilgili bölgenin TEV enzimi ile kesilerek FP-FRET biyosensöründe renk değişimi meydana getirdiğini ifade etmektedir. Ayrıca 5. ve 6. mikrotüplerde meydana gelen reaksiyonlarda β -Merkaptoetanol'ün renk değişimi üzerine etkisi incelenmiştir.

5. mikrotüpte β -Merkaptoetanol içermeyen, 6. mikrotüpte ise β -Merkaptoetanol içeren tampon kullanılmıştır. 6. mikrotüpte rengin daha çok açıldığı gözlemlenmiştir. Fakat β -Merkaptoetanol içermeyen 3. mikrotüp ile karşılaştırıldığında gözle görülür bir fark olmadığı görülmektedir. Bu yüzden β -Merkaptoetanol'ün renk değişimi üzerinde doğrudan etkisi olduğu söylenemez. Renk değişiminin meydana gelmesi için TEV enzimi ile kesim işleminin gerçekleşmesi gerektiği görülmektedir. Şekil 4.9(b)'da kesim sonrası ürünlerin UV ışık altındaki floresan ışımaları gözlemlenmektedir.



Şekil 4.9. (a) 1-6. (soldan) numuneler kesim sonrası ürünlere ait görüntüsü, (b) UV ışık altındaki görüntüsü

Kesim sonrası ürünlerde meydana renk değişimleri gözlemlendikten sonra kesim ürünlerinin SDS-PAGE’de analizi gerçekleştirilmiştir. Kesim bileşenlerinin gösterildiği Çizelge 3.10’da belirtildiği üzere, 1 ve 4 numaralı kuyucuklarda sadece yaklaşık 55 kDa ağırlığındaki mNeonGreen-mRuby3 FRET çifti bulunmaktadır. 2 numaralı kuyucukta ise sadece yaklaşık 27 kDa ağırlığındaki TEV proteaz enzimi gözlenmektedir. 3, 5 ve 6 numaralı kuyucuklarda ise mikrotüplere eklenen 55 kDa ağırlığındaki mNeonGreen-mRuby3 FRET çiftinin TEV proteaz ile kesilmesi sonucu, biyosensöre ait yaklaşık 26 kDa ağırlığındaki fragmentler ve 27 kDa ağırlığındaki TEV proteaz görülmektedir (Şekil 4.10).

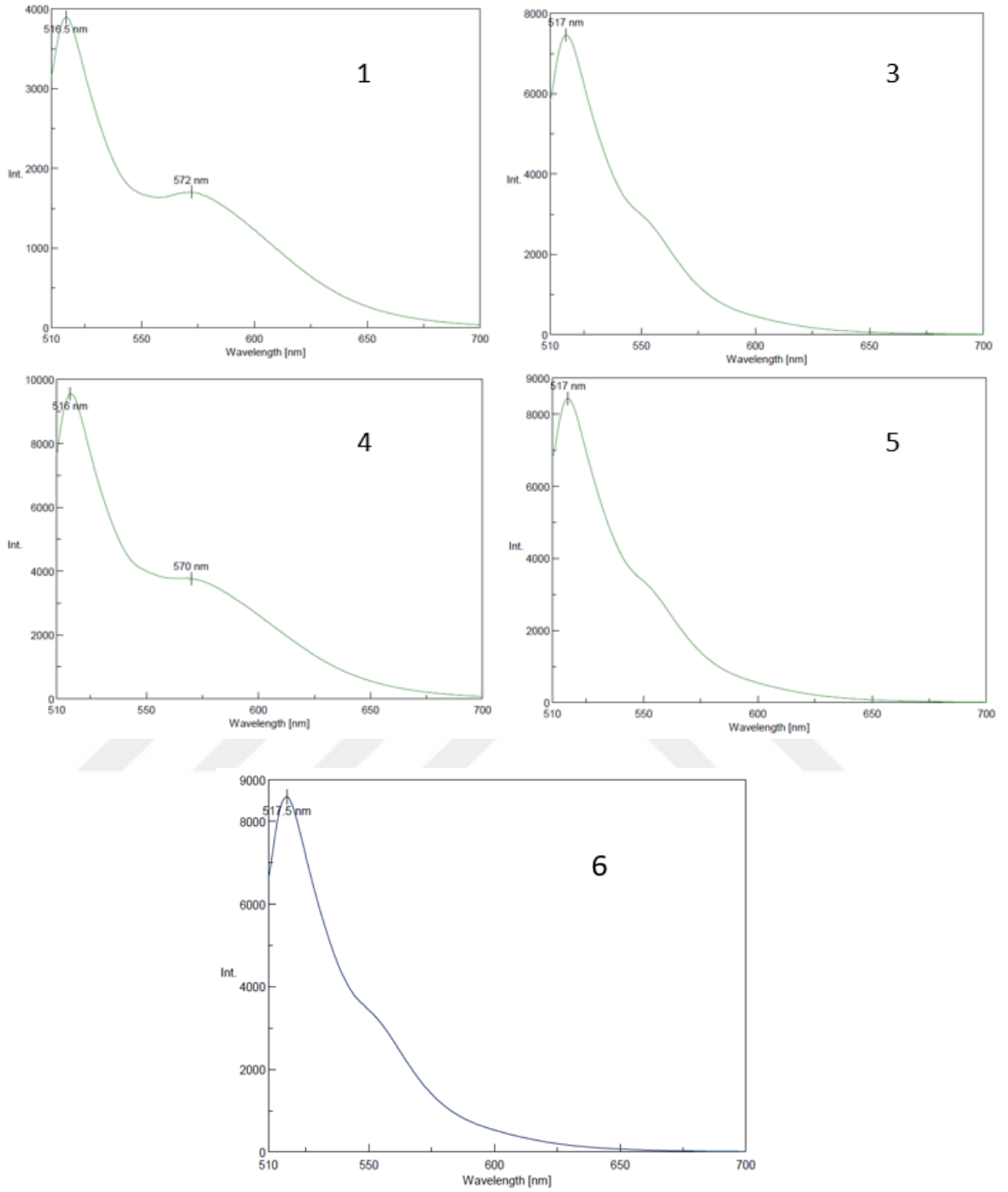


Şekil 4.10. mNeonGreen-mRuby3 FRET biyosensörünün TEV proteaz ile kesimine ait SDS-PAGE görüntüsü. 1 ve 4 numaralı kuyucuklar sadece FP-FRET biyosensörünü, 2 numaralı kuyucuk sadece TEV proteaz enzimini içermektedir. 3, 5 ve 6 numaralı kuyucuklar ise FP-FRET biyosensörünün TEV proteaz ile kesimi sonucu oluşan ürünleri ve TEV proteaz enzimini içermektedir. 7, Protein marker (Bio Basic Prestained Protein Ladder)

4.2.3. Spektrofluorometre analizi

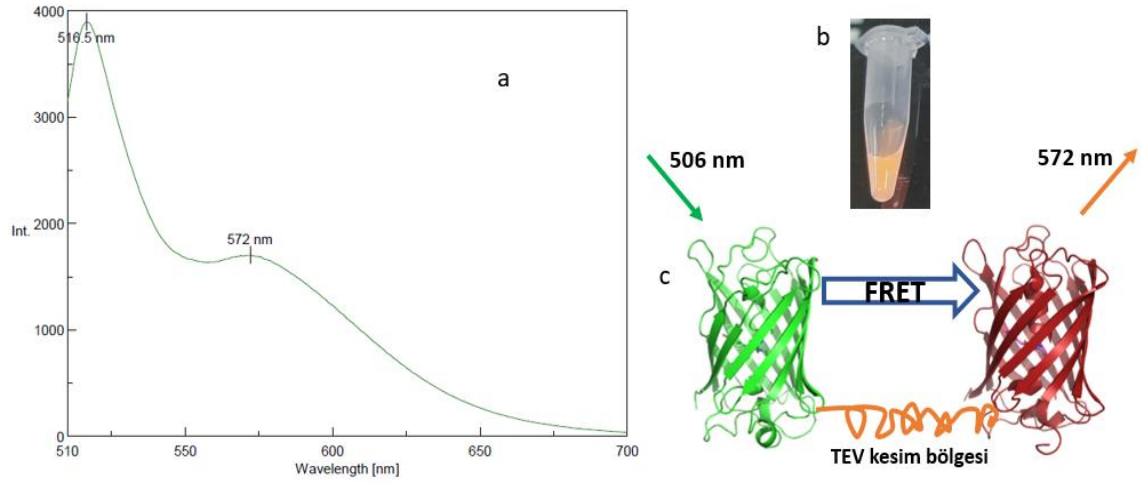
mNeonGreen-mRuby3 FRET çiftinin TEV enzimi ile kesilerek SDS-PAGE’de kantitatif analizi yapıldıktan sonra spektrofluorometre cihazında, kesim ürünlerinin emisyon dalga boylarına ait ölçümler gerçekleştirilmiştir. 2 numaralı örnek hariç tutularak (mNeonGreen-mRuby3 FRET çifti içermez) 1, 3, 4, 5 ve 6 numaralı kesim ürünleri 507 nm dalga boyunda uyarılarak 510-700 nm arasındaki emisyon dalga boylarına bakılmıştır. SDS-PAGE’de analiz edildiği üzere, 1 ve 4 numaralı örnekler kontrol olarak kullanıldığından kesim işlemi gerçekleşmemiştir. Bu yüzden mNeonGreen-mRuby3 çifti arasındaki bağlantı bölgesi korunmaktadır. Şekil 4.11’de 1 ve 4 numaralı grafiklerde görüldüğü gibi 507 nm dalga boyunda uyarılan mNeonGreen-mRuby3 FRET çifti 517 nm ve 572 nm olmak üzere iki dalga boyunda pik vermektedir. 517 nm’de bulunan pik, mNeonGreen floresan proteinin emisyon dalga boyudur (Rezonans enerji transferindeki verim arttıkça bu emisyondaki pikin azalması beklenir). 572 nm ise, uyarılan mNeonGreen enerjisinin bir kısmını emisyon enerjisi olarak kullanırken kalan kısmını mRuby3 floresan proteinine transfer ederek mRuby3 proteinin uyarılmasını sağlar. Bu şekilde uyarılan mRuby3 floresan proteini 572 nm dalga boyunda emisyon vermektedir.

Fakat 3, 5 ve 6 numaralı örneklerde TEV enzimi ile kesim işleminin gerçekleştiği yani mNeonGreen-mRuby3 çifti arasındaki bağlantının kesilerek, mNeonGreen ve mRuby3 şeklinde iki ayrı floresan protein meydana getirdiği bilinmektedir. Bu durum, iki floresan arasında doğrudan rezonans enerji transferinin gerçekleşmeyeceğini ifade etmektedir. Şekil 4.11’de 3,5 ve 6 numaralı grafikte kesim ürünlerinin 507 nm dalga boyunda uyarılması sonucunda 517 nm dalga boyunda emisyon vererek rezonans enerji transferinin gerçekleşmediği gözlemlenmektedir.

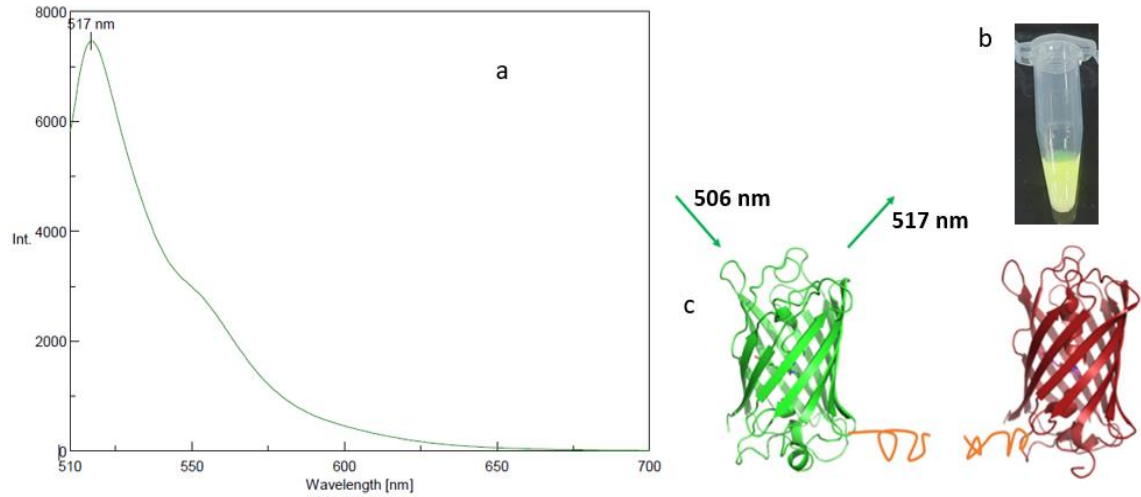


Şekil 4.11. mNeonGreen-mRuby3 biyosensörünün kesimi sonrası emisyon ölçümleri. TEV proteaz kesimi sonrası 1, 3, 4, 5 ve 6 numaralı kesim ürünlerine ait emisyon dalga boyları

E. coli DH5 α hücrelerinde üretilen ve saflaştırılan mNeonGreen-mRuby3 FRET biyosensörünün TEV enzimi ile kesime uğramadan önceki ve sonraki emisyon dalga boylarında ve floresan ışıma meydana gelen değişiklikler Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilmektedir.



Şekil 4.12. FP-FRET biyosensörünün kesim öncesine ait görselleri. 1 numaralı örneğe ait emisyon ölçümü (a), saflaştırılan mNeonGreen-mRuby3 biyosensörünün uyarılması sonucu meydana gelen floresan ışıma görüntüsü (b), biyosensörün şematize hali (c)



Şekil 4.13. FP-FRET biyosensörünün kesim sonrasına ait görselleri. 3 numaralı kesim ürününe ait emisyon dalga boyu grafiği (a), biyosensörün uyarılması sonucu meydana gelen floresan ışıma görüntüsü (b), biyosensörün şematize edilmiş hali (c)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

FP-FRET biyosensörlerinin, transfeksiyon aracılığıyla *in vitro* ve *in vivo* koşullarda hücre içerisine girişinin kolay olmasına karşın, kimyasal boya veya kuantum noktacık temelli FRET biyosensörlerinin hücrelere girişinde birtakım zorluklar bulunmaktadır. Ayrıca, kimyasal boya veya kuantum noktacık temelli FRET biyosensörleri canlı hücrelerde stabil değildir (Masharina vd., 2012). Genetik olarak kodlanabilen bu biyosensörler, plazmit DNA'nın transfeksiyonu ile hücrelere, dokulara ya da tüm organizmaya aktarılabilmektedir. Böyle bir biyosensör yaklaşımının en büyük avantajı non-invazif bir metot olması ve hücrelere zarar vermemesidir. Floresan proteinlerin çoğu durumda, konakçı hücreler için toksik olmadığı gösterilmiştir (Wang vd., 2009). Bununla birlikte, FP-FRET biyosensörleri, FP'lerin yüksek hücre içi stabilitesi nedeniyle hücrelerde uzun süre kalabilmektedir. Geliştirilmiş optik özelliklere sahip FP'lerin çeşitliliği, yüksek FRET verimliliğine sahip FRET çiftlerini oluşturmak için FP'lerin seçilmesini ve yüksek hassaslıkta FRET biyosensörlerinin geliştirilmesini mümkün kılmıştır (Bajar vd., 2016b). Genetik olarak kodlanabilen floresan protein temelli biyosensörler, zaman ve mekâna ait veri akışını koruyarak hücre içindeki belirli biyokimyasal veya biyolojik tanıma süreçlerinin görüntülenmesine olanak sağlamaktadır (Ibraheem ve Campbell, 2010). Bu bağlamda, floresan proteinler ve floresan temelli biyosensörler *in vivo* uygulamalarda güçlü araçlar haline gelmektedir (Wang vd., 2009).

Tüm FRET biyosensörlerde, optimum FRET çiftlerinin seçilmesi, tasarlanacak biyosensörlerin performansı açısından en önemli parametredir (Piston ve Kremers, 2007). Bajar ve ark. (2016) tarafından mClover3-mRuby3 veya mNeonGreen-mRuby3 çiftinin, kültüre edilmiş hücrelerde kullanıldığında fotostabilite, parlaklık ve FRET dinamik aralığı açısından en iyi seçimlerden biri olduğu ortaya konulmuştur.

Ayrıca FP-FRET biyosensörlerinde bağlayıcı (linker) uzunluğu da önemli parametrelerden biridir. Çoğu durumda, füzyon proteininin iki bileşenini birleştiren linker yeterince uzun ve esnek olmadığında, ilgili proteinler arasında sterik engelleme veya katlanma etkileşimi meydana gelebilir. Genel olarak, linker esnek, çözünür ve proteolize karşı dirençli olmalı ve ikincil bir yapıya veya agregaya sahip olmamalıdır (Shimozono ve Miyawaki, 2008). Genetik olarak kodlanan FP-FRET biyosensörlerinin

tasarımı kullanım amacına göre birtakım farklılıklar göstermektedir. Genel olarak, iyonlar, moleküller, enzimatik aktivite, oksidasyon-redüksiyon olayları, membran potansiyeli ve kanal konformasyonundaki değişiklikler ve hücre döngüsünün aşamaları gibi çeşitli hücresel hedefler için çok sayıda farklı biyosensörler geliştirilmiştir (Palmer vd., 2011). Bu yüzden FP-FRET biyosensörlerinde kullanılan ideal bir linker uzunluğu yoktur. Yapılan çalışmanın amacına uygun olarak farklı linker uzunlukları kullanılmaktadır. Örneğin, Mitra ve ark (1996) tarafından, Faktör Xa proteaz aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmada 20 amino asit uzunluğunda bir linker kullanılmıştır (Mitra vd., 1996). Tripsin enziminin proteolitik aktivitesi üzerine yapılan bir diğer çalışmada ise 25 amino asitlik bir linker oluşturulmuştur (Heim ve Tsien, 1996). Kaspaz-3 enzim aktivitesine ait biyosensör tasarımında 20 amino asitlik bir linker kullanılmıştır (Nguyen ve Daugherty, 2005). MMP-2 enzim aktivitesinin tespiti için geliştirilen FP-FRET biyosensöründe 12 aminoasit içeren linker kullanılmıştır (Yang vd., 2007). mNeonGreen-mRuby3 floresan çiftlerinin kullanıldığı bir çalışmada FRET etkinliğinin incelenmesinde ise 8 amino asitlik bir linker kullanılmıştır (McCulloch vd., 2020).

Ayrıca linker esnekliği söz konusu olduğunda bir peptit zincirine en büyük esnekliği veren amino asit, en küçük yan zincire sahip olan glisindir. Bu nedenle, füzyon proteinleri genellikle iki bileşen arasında bir glisin sekansı içerecek şekilde tasarlanmıştır (Shimozono ve Miyawaki, 2008). Glisin ve serin amino asitlerinden oluşan esnek polipeptit bağlayıcılar, tasarlanmış füzyon proteinlerin önemli bileşenleridir. Glisin ve serin tekrarlarını içeren bağlayıcılar üzerinde birtakım çalışmalar yapılmıştır. FRET etkinliğinin artan linker uzunluğu ile azaldığı ve daha az glisin içeren bağlayıcılarda FRET etkinliğinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca düşük glisin içeriğine sahip bağlayıcılarda esneklik azalmıştır (Van Rosmalen vd., 2017).

Sunulan tez çalışmasında mClover3, mNeonGreen ve mRuby3 floresan proteinleri kullanılarak mClover3-mRuby3 ve mNeonGreen-mRuby3 biyosensörleri tasarlanmıştır. Bu bağlamda ilk olarak mClover3-mRuby3 FRET biyosensöründe floresan proteinler arasında TEV proteaz kesim sekansını içerecek şekilde toplamda 12 amino asit uzunluğunda (LENLYFQGGEDP) linker kullanılmıştır. mNeonGreen-mRuby3 biyosensöründe ise 17 amino asit (GGSLEENLYFQGEFSGG) içeren bir linker tasarlanmıştır. Bu linker uzunluğu içerisinde TEV proteaz kesim bölgesi ve restriksiyon

enzimlerine ait sekanslar bulunmaktadır. Ayrıca linker stabilizasyonu, esnekliği ve etkili linker uzunluğunun elde edilebilmesi için simetrik olacak şekilde bağlantının her iki ucuna GGS dizisi eklenmiştir.

mClover3-mRuby3 FRET çiftinin oluşturulmasında mClover3 geninin PCR ile sentezi gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi ile mClover3 geninin 3' ucuna TEV proteaz kesim sekansı reverse primer ile eklenmiştir. mClover3 geninin pNCS-mRuby3 vektörüne ligasyonu gerçekleştirilerek istenilen rekombinat yapı elde edilmiştir. Fakat mClover3-mRuby3 biyosensörünün *E. coli* BL21 pLysE hücrelerinde üretimin gerçekleşmediği yapılan SDS-PAGE analizi ile gösterilmiştir. SDS-PAGE'de görüntülenen yaklaşık 20 ve 28 kDa'na karşılık gelen bantlar, ilgili gen bölgelerinin klonlama öncesi PCR ile çoğaltılması aşamasında gerçekleştiği düşünülen mutasyonlardan dolayı çerçeve kayması sonucu farklı boyutlarda üretilen proteinler olarak değerlendirilmektedir. DNA dizileme sonuçları da bu değerlendirmeyi desteklemektedir (Başlık 4.1.3.). Bu problemi ortadan kaldırmak için PCR aşamasında iyileştirmeler yapılmıştır. Pfu enzimi ve DMSO kullanılarak nükleotit atlama ve primerlerin yüksek Tm sıcaklığından dolayı istenmeyen bağlanmaları en aza indirmek için denemeler yapılmıştır. Ancak zorlu PCR koşullarından dolayı mutasyonlar meydana gelmiş ve bu sorun giderilememiştir.

mNeonGreen-mRuby3 FRET biyosensörünün *E. coli* BL21 pLysE ve *E. coli* C41(DE3) hücrelerinde üretimi başarısız olmuştur. Fakat *E. coli* DH5α hücrelerinde yapılan transformasyon ile IPTG indüklemesi yapılmaksızın yaklaşık 20 saatlik bir inkübasyon sonucu biyosensör üretimi gerçekleştirilmiştir. Afinite kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. TEV proteaz enziminin aktivitesi mNeonGreen-mRuby3 FRET biyosensörünü kullanarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile enzim aktivite tayininde kullanılabilir bir FP-FRET biyosensörü tasarlanmış, rekombinant DNA teknikleri kullanılarak *E. coli* DH5 α hücrelerinde üretilmiş ve saflaştırılmıştır. Spektrofluorometre cihazında gerçekleştirilen aktivite testleri sonucu emisyon dalga boyunda meydana gelen değişimler, McCullock ve ark. tarafından gerçekleştirilen emisyon ölçümleri ile benzerlik göstermektedir (McCullock vd., 2020). Daha sonraki çalışmalarda FP-FRET biyosensörüne ait linker uzunlukları, enzim tanıma bölgeleri veya floresan proteinlerde gerekli değişiklikler yapılarak, önemli biyolojik süreçlerde belirteç olarak kullanılan enzimlerin (matriks metalloproteinazlar vb.) aktivite tayini mümkün kılacak şekilde geliştirilmesi hedeflenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Altıntaş, L., Enver, H., Tutun, H., 2017. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Veteriner İlaç Geliştirmede Kullanımı Recombinant DNA Technology and Use in Veterinary Drug Development. MAKÜ Sağlık Bilim. Enstitüsü Derg. 5, 193–204.
- Anonim, 2019. Fluorescence Resonance Energy Transfer.
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Fundamentals/Fluorescence_Resonance_Energy_Transfer) (12.7.2019).
- Aoki, K., Komatsu, N., Hirata, E., Kamioka, Y., Matsuda, M., 2012. Stable expression of FRET biosensors: A new light in cancer research. Cancer Sci. 103, 614–619.
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02196.x>
- Arda M., 2019. Klonlamada Kullanılan Vektörler.
<http://www.mikrobiyoloji.org/> (21.07.2019).
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y., 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 11984–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11984>
- Bajar, B.T., Wang, E.S., Lam, A.J., Kim, B.B., Jacobs, C.L., Howe, E.S., Davidson, M.W., Lin, M.Z., Chu, J., 2016a. Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. Sci. Rep. 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep20889>
- Bajar, B.T., Wang, E.S., Zhang, S., Lin, M.Z., Chu, J., 2016b. A guide to fluorescent protein FRET pairs. Sensors (Switzerland) 16. <https://doi.org/10.3390/s16091488>
- Bevis, B.J., Glick, B.S., 2002. Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). Nat. Biotechnol. 20, 83–87.
<https://doi.org/10.1038/nbt0102-83>
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A., Tsien, R.Y., 2002. A monomeric red fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 7877–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.082243699>
- Carter, M., Shieh, J., 2015. Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. Guid. to Res. Tech. Neurosci. 219–237. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800511-8.00010-1>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. Science (80-.). 263, 802–805.
- Chudakov, D.M., Matz, M. V., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., 2010. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. Physiol. Rev. 90, 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., Ward, W.W., 1993. Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the Aequorea Green-Fluorescent Protein. Biochemistry 32, 1212–1218.
<https://doi.org/10.1021/bi00056a003>
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y., 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. Trends Biochem. Sci. 20, 448–455. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89099-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89099-4)
- Gross, L.A., Baird, G.S., Hoffman, R.C., Baldrige, K.K., Tsien, R.Y., 2000. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 11990–5.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11990>
- Hacker, D.L., Wurm, F.M., 2016. Recombinant DNA Technology for Production of Protein Therapeutics in Cultured Mammalian Cells, Reference Module in Life Sciences. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.09079-8>
- Hanson, G.T., McAnaney, T.B., Park, E.S., Rendell, M.E.P., Yarbrough, D.K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S.G., Montrose, M.H., Remington, S.J., 2002. Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry* 41, 15477–15488. <https://doi.org/10.1021/bi026609p>
- Heim, R., Prasher, D.C., Tsien, R.Y., 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12501–4. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.26.12501>
- Heim, R., Tsien, R.Y., 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 6, 178–182. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00450-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00450-5)
- Hochreiter, B., Garcia, A.P., Schmid, J.A., 2015. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences. *Sensors (Switzerland)* 15, 26281–26314. <https://doi.org/10.3390/s151026281>
- Hostettler, L., Grundy, L., Käser-Pébernard, S., Wicky, C., Schafer, W.R., Glauser, D.A., 2017. The Bright Fluorescent Protein mNeonGreen Facilitates Protein Expression Analysis In Vivo . *G3 Genes|Genomes|Genetics* 7, 607–615. <https://doi.org/10.1534/g3.116.038133>
- Huda Yberdiyev, H., Öner, F., 1997. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretilen Peptid-Protein İlaçlar. *J. Pharm. Sci* 22, 27–38.
- Hussain S.A., 2019. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Department of Physics, Tripura University, Suryamaninagar-799130, Tripura, India. <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/0908/0908.1815.pdf> (12.7.2019).
- Ibraheem, A., Campbell, R.E., 2010. Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.09.033>
- Inouye, S., Tsuji, F.I., 1994. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 341, 277–80.
- Jain, R.K., Joyce, P.B.M., Molinete, M., Halban, P.A., Gorr, S.-U., 2001. Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells, *Biochem. J.*
- Jares-Erijman, E.A., Jovin, T.M., 2003. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1038/nbt896>
- Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A., 2004. Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem. J.* 381, 307–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20040321>
- Khan, S., Ullah, M.W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., Hou, H., 2016. Role of recombinant DNA technology to improve life. *Int. J. Genomics* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>
- Koçoğlu, T., Yalçınkaya, T., 1992. Rekombinant DNA Teknolojisi. *Mikrobiyol. Bul.* 26, 177–188. <https://doi.org/10.17693/yunus.41050>
- Kredel, S., Oswald, F., Nienhaus, K., Deuschle, K., Röcker, C., Wolff, M., Heilker, R.,

- Nienhaus, G.U., Wiedenmann, J., 2009. mRuby, a Bright Monomeric Red Fluorescent Protein for Labeling of Subcellular Structures. *PLoS One* 4, e4391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004391>
- Kremers, G.-J., Goedhart, J., Van Den Heuvel, D.J., Gerritsen, H.C., Gadella, T.W.J., 2007. Improved Green and Blue Fluorescent Proteins for Expression in Bacteria and Mammalian Cells. *Biochemistry* 46, 3775–3783. <https://doi.org/10.1021/bi0622874>
- Kuk, S., Erensoy, A., 2008. Gen Klonlama , Plazmit Seçimi ve Fasciola hepatica Cathepsin L1 Uygulamaları. *Türkiye Parazitoloji Derg.* 32, 16–22.
- Lam, A.J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J.D., Cranfill, P.J., Baird, M.A., McKeown, M.R., Wiedenmann, J., Davidson, M.W., Schnitzer, M.J., Tsien, R.Y., Lin, M.Z., 2012. Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 9, 1005–1012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2171>
- Lin, M.Z., McKeown, M.R., Ng, H.L., Aguilera, T.A., Shaner, N.C., Campbell, R.E., Adams, S.R., Gross, L.A., Ma, W., Alber, T., Tsien, R.Y., 2009. Autofluorescent Proteins with Excitation in the Optical Window for Intravital Imaging in Mammals. *Chem. Biol.* 16, 1169–1179. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.10.009>
- Maria-Chantal Chirio-Lebrun, M.P., 1998. Fluorescence resonance energy transfer (FRET): theory and experiments. *Biochem. Educ.* 26, 320–323.
- Masharina, A., Reymond, L., Maurel, D., Umezawa, K., Johnsson, K., 2012. A Fluorescent Sensor for GABA and Synthetic GABA. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 19026–19034. <https://doi.org/10.1021/ja306320s>
- Matz, M. V, Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A., 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17, 969–973. <https://doi.org/10.1038/13657>
- McCulloch, T.W., MacLean, D.M., Kammermeier, P.J., 2020. Comparing the performance of mScarlet-I, mRuby3, and mCherry as FRET acceptors for mNeonGreen. *PLoS One* 15, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219886>
- Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W.J., Chudakov, D.M., 2007. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat. Methods* 4, 555–557. <https://doi.org/10.1038/nmeth1062>
- Mitra, R.D., Silva, C.M., Youvan, D.C., 1996. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* 173, 13–17. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00768-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00768-7)
- Miyawaki, A., 2011. Development of Probes for Cellular Functions Using Fluorescent Proteins and Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 357–373. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-094736>
- Morozova, K.S., Piatkevich, K.D., Gould, T.J., Zhang, J., Bewersdorf, J., Verkhusha, V. V., 2010. Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy. *Biophys. J.* 99, L13–L15. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.04.025>
- Nguyen, A.W., Daugherty, P.S., 2005. Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat. Biotechnol.* 23, 355–360.

- <https://doi.org/10.1038/nbt1066>
- Orm, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J., 1996. Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein. *Science* (80-.). 273, 1392–1395. <https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392>
- Palmer, A.E., Qin, Y., Park, J.G., McCombs, J.E., 2011. Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends Biotechnol.* 29, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.004>
- Pham, P. V., 2017. Medical biotechnology: Techniques and applications. *Omi. Technol. Bio-engineering Towar. Improv. Qual. Life* 1, 449–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1>
- Piatkevich, K.D., Hult, J., Subach, O.M., Wu, B., Abdulla, A., Segall, J.E., Verkhusha, V. V., 2010. Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 5369–5374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914365107>
- Piatkevich, K.D., Verkhusha, V. V., 2011. Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry. *Methods Cell Biol.* 102, 431–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374912-3.00017-1>
- Piston, D.W., Campbell, R.E., Day, R.N., Davidson, M.W., y.y. ZEISS Microscopy Online Campus | Introduction to Fluorescent Proteins [WWW Document]. URL <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html> (erişim 12.7.18).
- Piston, D.W., Kremers, G.J., 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem. Sci.* 32, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.003>
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein (Bioluminescence; Cnidaria; aequorin; energy transfer; chromophore; cloning). *Biochem. Mol. Biol. Mayo Found.* 111, 284–2065.
- Prendergast, F.G., Mann, K.G., 1978. Chemical and Physical Properties of Aequorin and the Green Fluorescent Protein Isolated from *Aequorea forskålea*. *Biochemistry* 17, 3448–3453. <https://doi.org/10.1021/bi00610a004>
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., Miyawaki, A., 2008. Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* 132, 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.033>
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E., Tsien, R.Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567–1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>
- Shaner, N.C., Lambert, G.G., Chamma, A., Ni, Y., Paula, J., Baird, M.A., Sell, B.R., Allen, J.R., Day, R.N., Davidson, M.W., Wang, J., 2013. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* 10, 407–409. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>
- Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., Tsien, R.Y., 2008. Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 5, 545–551. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1209>
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., Davidson, M.W., 2011. Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell Sci.* 124, 2321–2321. <https://doi.org/10.1242/jcs.094722>

- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2, 905–909. <https://doi.org/10.1038/NMETH819>
- Shcherbo, D., Murphy, C.S., Ermakova, G. V, Solovieva, E.A., Chepurnykh, T. V, Shcheglov, A.S., Verkhusha, V. V, Pletnev, V.Z., Hazelwood, K.L., Roche, P.M., Lukyanov, S., Zaraisky, A.G., Davidson, M.W., Chudakov, D.M., 2009. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem. Soc.* 418, 567–574. <https://doi.org/10.1042/BJ20081949>
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., 1962. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223–229. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>
- Shimozono, S., Miyawaki, A., 2008. Engineering FRET Constructs Using CFP and YFP. *Methods Cell Biol.* 85, 381–393. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)85016-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)85016-9)
- Soydemir, E., Aksoy, Z.B., 2017. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı. *Güncel Gastroenteroloji Derg.* 14–17.
- Stockmar, I., Feddersen, H., Cramer, K., Gruber, S., Jung, K., Bramkamp, M., Shin, J.Y., 2018. Optimization of sample preparation and green color imaging using the mNeonGreen fluorescent protein in bacterial cells for photoactivated localization microscopy. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28472-0>
- Strack, R.L., Bhattacharyya, D., Glick, B.S., Keenan, R.J., 2009. Noncytotoxic orange and red/green derivatives of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. *BMC Biotechnol.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-32>
- Strack, R.L., Strongin, D.E., Bhattacharyya, D., Tao, W., Berman, A., Broxmeyer, H.E., Keenan, R.J., Glick, B.S., 2008. A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat. Methods* 5, 955–957. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1264>
- Tanida-Miyake, E., Koike, M., Uchiyama, Y., Tanida, I., 2018. Optimization of mNeonGreen for Homo sapiens increases its fluorescent intensity in mammalian cells. *PLoS One* 13, 3–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191108>
- Tokmakoff, A., 1959. FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER 321.
- Tsutsui, H., Karasawa, S., Okamura, Y., Miyawaki, A., 2008. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nat. Methods* 5, 683–685. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1235>
- Van Rosmalen, M., Krom, M., Merks, M., 2017. Tuning the Flexibility of Glycine-Serine Linkers to Allow Rational Design of Multidomain Proteins. *Biochemistry* 56, 6565–6574. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00902>
- Vrzheschch, P. V., Akovbian, N.A., Varfolomeyev, S.D., Verkhusha, V. V., 2000. Denaturation and partial renaturation of a tightly tetramerized DsRed protein under mildly acidic conditions. *FEBS Lett.* 487, 203–208. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02344-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02344-9)
- Wang, H., Nakata, E., Hamachi, I., 2009. Recent Progress in Strategies for the Creation of Protein-Based Fluorescent Biosensors. *ChemBioChem* 10, 2560–2577. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900249>
- Wang, L., Jackson, W.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y., 2004. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16745–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407752101>
- Yang, F., Moss, L.G., Phillips, G.N., 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14, 1246–1251. <https://doi.org/10.1038/nbt0898-773>

- Yang, J., Zhang, Z., Lin, J., Lu, J., Liu, B.F., Zeng, S., Luo, Q., 2007. Detection of MMP activity in living cells by a genetically encoded surface-displayed FRET sensor. *Biochim Biophys Acta* 1773, 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.002>
- Yanushevich, Y.G., Staroverov, D.B., Savitsky, A.P., Fradkov, A.F., Gurskaya, N.G., Bulina, M.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A., 2002. A strategy for the generation of non-aggregating mutants of *Anthozoa* fluorescent proteins. *FEBS Lett.* 511, 11–14. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03263-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03263-X)
- Yarbrough, D., Wachter, R.M., Kallio, K., Matz, M. V, Remington, S.J., 2001. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 462–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.462>
- Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W.W., Guy, J., Muzyczka, N., 1996. A “humanized” green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J. Virol.* 70, 4646–4654. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.7.4646-4654.1996>
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: İbrahim İNCİR
Doğum Yeri ve Tarihi: Erzurum, 05.03.1993
Yabancı Dili: İngilizce
e-mail: ibrahim.incir12@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü	05.06.2017