



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DOKTORA PROGRAMI

**İNSAN KEMİK MORFOGENETİK PROTEİN 2’NİN (BMP2)
REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ, BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Yasin AYDIN

Danışman: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

TOKAT- 2023

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. İsa Gökçe danışmanlığında hazırlamış olduğum “İnsan Kemik Morfogenetik Protein 2’nin (BMP2) Rekombinant Olarak Üretilmesi, Biyokimyasal Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması” adlı Doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

13/03/2023

Yasin Aydın



ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle her zaman yol göstererek sıcak, sevecen ve samimi hocalığını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye,

Hücre kültürü çalışmalarını gerçekleştiren Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN'a ve doktora öğrencisi Aslı YILDIRIM'a,

Çalışmalarım esnasında tecrübe ve bilgisini paylaşmaktan imtina etmeyen, hemen her konuda yardımcı olan değerli laboratuvar üyeleri Dr. Öğr. Üyesi Rizvan İMAMOĞLU, Arş. Gör. Dr. Özlem KAPLAN, Dr. Öğr. Üyesi Sema BİLGİN, Arş. Gör. Dr. Hülya KUDUĞ, Öğr. Gör. İbrahim İNCİR ve Öğr. Gör. Dr. Yahya TAYHAN'a,

Çalışma izinleri için kolaylık gösteren görev yapmakta olduğum Hitit Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne,

Bu süreçte beni yalnız bırakmayarak her daim destekleyen sevgili eşim Merve'ye ve çocuklarımıza şükranlarımı sunarım.

ÖZET

İNSAN KEMİK MORFOGENETİK PROTEİN 2’NİN (BMP2) REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ, BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aydın, Yasin

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Şubat 2023, xi + 75 sayfa

Kemik Morfogenetik Proteinler (BMP), Transforme Edici Büyüme Faktörleri β (TGF β) süperfamilyasına mensup multifonksiyonel büyüme faktörleridir. BMP’ler temelde kıkırdak ve kemik gelişimde önemli rol oynamaktadır. Bu proteinler mezenkimal hücrelerin osteogenik hücrelere farklılaşmasını ve embriyonik ve postnatal dönem hücre proliferasyonunu uyarırlar ve yetişkin dönem kemik homeostasisinde önemli rol oynarlar. İnsan rekombinant BMP2 (rhBMP2) ise, ortopedik tedavilerde ve dişçilik alanında sıklıkla kullanılan klinik ve ticarî açıdan önemli bir terapötik proteindir. BMP2 proteinini *E. coli* ekspresyon sistemlerinde ifade edildiğinde büyük oranda inklüzyon cisimcikleri şeklinde çözünür olmayan bir forma dönüşerek agregasyona uğramaktadır. Bu çalışmada, rhBMP2 proteininin ilk başta Süperfolder Yeşil Floresan Protein (sfGFP) ile füzyon şeklinde *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücrelerinde ekspresyonu sağlanmıştır. Sonrasında farklı şaperon proteinlerini ifade eden pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 ve pTf16 plazmitleri ile *E. coli* BL21-AI hücrelerinde ko-ekspresyon gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler neticesinde ko-ekspresyon için optimum faydanın sağlandığı tig şaperonu üreten pTf16 plazmiti tercih edilmiştir. Yüksek saflıkta ve doğru katlanmış protein eldesi için ayrıca bazı alternatif yeniden katlama işlemleri uygulanmıştır. Sonuçta sfGFP-rhBMP2 füzyon proteinini 6xHis- etkiketi ile nikel bazlı afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış ve sonrasında SDS-PAGE yöntemi ile kalitatif analizi yapılmıştır. Optimum koşullarda elde edilip saflaştırılan sfGFP-rhBMP2 proteinini insan osteosarkoma-2 (Saos-2) hücreleri üzerinde test edilerek hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: BMP2, Kemik Morfogenetik Proteinler, Rekombinant Protein Üretimi, sfGFP, Şaperon Ko-ekspresyonu.

ABSTRACT

RECOMBINANT EXPRESSION, BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE HUMAN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 2 (BMP2)

Aydın, Yasin

Doctorate Thesis, Division of Bioengineering

Advisor: Prof. Dr. İsa Gökçe

February 2023, xi + 75 pages

Bone Morphogenetic Proteins (BMP) are multifunctional growth factors belonging to the Transforming Growth Factors β (TGF β) superfamily. BMPs basically play an important role in cartilage and bone development. These proteins are effective in stimulating the differentiation of mesenchymal cells into osteogenic cells. They are also effective in cell proliferation and functions in the embryonic and postnatal period, and in bone homeostasis in the adult period. BMP2 is a clinically and commercially important protein that is frequently used in orthopedic treatments and dentistry. When expressed in *E. coli* expression systems, the human recombinant BMP2 (rhBMP2) protein transform into an insoluble form, largely in the form of inclusion bodies, than undergo aggregation. In this study, rhBMP2 protein was initially expressed in *E. coli* BL21(DE3) pLysE cells as a fusion with Superfolder Green Fluorescent Protein (sfGFP). For higher production efficiency, co-expression was performed in *E. coli* BL21-AI cells with plasmids pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 and pTf16 using a system containing five different chaperone plasmids. As a result of the measurements, the pTf16 plasmid, which produces the tig chaperone with optimum benefit for co-expression, was preferred. Alternative refolding processes were also applied to obtain a high purity and correctly folded product. Ultimately, the sfGFP-rhBMP2 fusion protein was purified with the 6xHis-tag using nickel-based affinity chromatography and then qualitatively analyzed by SDS-PAGE method. Cell culture studies were carried out by testing sfGFP-rhBMP2 protein, which was obtained and purified under optimum conditions, on human osteosarcoma-2 (Saos-2) cell lines.

Key Words: BMP2, Bone Morphogenetic Protein, Recombinant Protein Production, sfGFP, Chaperone Co-expression.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK SÖZLEŞME.....	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ / GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik Morfogenetik Proteinler (BMP'ler).....	4
2.1.1. BMP'lerin sınıflandırılması ve yapısı	5
2.1.2. BMP reseptörleri ve intrasellüler sinyal iletimi	6
2.1.3. BMP'lerin biyolojik görevleri.....	9
2.1.4. BMP'lerin terapötik ve klinik kullanım alanları	11
2.1.5. İnsan kemik morfogenetik protein 2 (hBMP2) ve fizyolojik görevleri	13
2.2. Rekombinant Protein Üretimi (BMP)	15
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> 'de rekombinant protein üretimi	16
2.2.2. BMP'lerin rekombinant üretimi.....	19
2.3. Rekombinant Protein Üretiminde Yardımcı Yöntemler.....	20
2.3.1. Rekombinant füzyon protein.....	21
2.3.2. Moleküler şaperonlar (Hsp'ler).....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM	28
3.1. Materyal.....	28
3.1.1. Kullanılan cihazlar	28
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	29
3.1.3. Kullanılan çözeltiler	30
3.1.4. SDS-PAGE'de kullanılan çözeltiler.....	31
3.1.5. Protein saflaştırmada kullanılan çözeltiler	31
3.1.6. TEV proteaz stok tamponları	32
3.1.7. Afinite kromatografisi ile protein saflaştırmada kullanılan çözeltiler ..	32
3.1.8. sfGFP-BMP2 proteininin inklüzyon cisimciklerinden eldesinde kullanılan çözeltiler.....	32
3.1.9. sfGFP-BMP2 proteininin inklüzyon cisimciklerinden eldesi ve Ni-NTA agaroz kolon üzerinde yeniden katlanması ve saflaştırılmasında kullanılan çözeltiler.....	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Yapılan çalışmanın özeti	34
3.2.2. Biyoinformatik çalışmalar.....	35
3.2.3. Kompetant hücre hazırlanması.....	38
3.2.4. pET30a/sfGFP-BMP2 plazmit vektörünün <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE'ye transformasyonu	39
3.2.5. sfGFP-BMP2'nin <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE'de ifadesi.....	39
3.2.6. <i>E. coli</i> hücrelerinin parçalanması ve sfGFP-BMP2'nin afinite kromatografisi ile saflaştırılması	40

3.2.7.	sfGFP-BMP2'nin şaperon plazmit sistemi ile koekspresyonu.....	40
3.2.8.	sfGFP-BMP2 füzyon proteininden BMP2 peptidinin TEV proteaz kesimi ile çıkarılması	43
3.2.9.	Protein yeniden katlanması (refolding)	44
3.2.10.	Dairesel dikroizm (circular dichroism) (CD).....	47
3.2.11.	rhBMP2'nin biyolojik aktivite tayini	48
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	51
4.1.	sfGFP-BMP2'nin <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE'de ekspresyonu.....	51
4.2.	sfGFP-BMP2'nin şaperon plazmit sistemi ile ekspresyonu	51
4.3.	sfGFP-BMP2 füzyon proteinin TEV proteaz ile kesimi	53
4.4.	Yeniden katlama işlemi (Refolding)	55
4.5.	Dairesel Dikroizm (Circular Dichroism) (CD) Stereskopisi	56
4.6.	IB'den yeniden katlama yoluyla sfGFP-BMP2 füzyonundan TEV proteaz enzim kesimi ile BMP2 peptidinin çıkarılması	59
4.7.	sfGFP-BMP2 füzyon proteininin Saos-2 tip hücrelerle MTT uygulaması ..	61
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	64
6.	KAYNAKLAR	67

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Bazı BMP proteinleri ve görevleri.....	6
Çizelge 2.2 Isı Şoku Proteinleri ve <i>E. coli</i> 'deki homologları.	26
Çizelge 3.1 Kullanılan Cihazlar.....	28
Çizelge 3.2 Kullanılan kimyasallar.....	29
Çizelge 3.3 Plazmit seti içerisinde bulunan şaperon plazmitler	41
Çizelge 3.4 TEV proteaz kesimi için oluşturulan reaksiyon koşulları	44

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 BMP sinyalleşmesinde ligantların reseptörlere bağlanması, sitoplazmada taşınım ve hedef genin transkripsiyonunun uyarılması	9
Şekil 2.2 BMP2 proteinin üç boyutlu gösterimi	14
Şekil 2.3 Standart bir ekspresyon vektörünün kısımları	17
Şekil 2.4 sfGFP proteinin amino asit dizisi Mavi: Sistein aminoasitleri işaretlenmiştir.	22
Şekil 2.5 GFP proteininin üç boyutlu yapısı.....	23
Şekil 2.6 GFP proteini üç boyutlu yapısının ve kromoforun şematik gösterimi	23
Şekil 2.7 <i>E. coli</i> 'de şaperon yardımıyla protein katlanması modeli	27
Şekil 3.1 Referans alınan ve optimize edilen BMP2 DNA dizileri karşılaştırması	35
Şekil 3.2 pET30a DNA plazmitine klonlanması planlanan gen kaseti	36
Şekil 3.3 pET30a'ya klonlanan gen kasetinin nükleotit ve amino asit dizileri.....	37
Şekil 3.4 pET30a DNA plazmitine ait gen haritası	38
Şekil 3.5 Takara™ Şaperon Plazmit Kitine ait plazmitler.....	42
Şekil 3.6 CD analizi sonucu oluşturulan α -sarmal, β -iplik ve düzensiz kıvrılmaların grafik gösterimleri.....	47
Şekil 3.7 Dairesel Dikroizm (CD) ölçümleri için oluşturulan numuneler.....	48
Şekil 3.8 Çok gözlü hücre plakası MTT ve formazonun molekül yapısı	49
Şekil 3.9 MTT uygulaması yapılan 48 gözlü kültür plakası	50
Şekil 4.1 pET30a/sfGFP-BMP2 plazmit vektörü ile şaperon plazmitlerini taşıyan <i>E. coli</i> BL21-AI hücrelerinin koekspresyon sonuçları	52
Şekil 4.2 sfGFP-BMP2'nin pTf16 plazmitin ürettiği tig şaperon proteini ile koekspresyonu ve saflaştırma sonrası yapılan %12'lik SDS-PAGE analizi	53
Şekil 4.3 sfGFP-BM2 füzyon proteininin TEV Proteaz enzimi ile kesim sonrası yapılan %12'lik SDS-PAGE analizi.....	54
Şekil 4.4 sfGFP-BMP2 proteininin inklüzyon cisimciklerinden eldesi, yeniden katlanması ve Ni-NTA agaroz kolon yardımıyla saflaştırılması sonrası yapılan %12'lik SDS-PAGE analizi.....	56
Şekil 4.5 sfGFP-BMP2 proteininin inklüzyon cisimciklerinden eldesi, agaroz matriks destekli yeniden katlanması ve saflaştırılması sonrası yapılan %12'lik SDS - PAGE Analizi.....	56
Şekil 4.6 Far-UV-CD analizi - 1. numune.	57
Şekil 4.7 Far-UV-CD analizi - 2. numune	58
Şekil 4.8 Far-UV-CD analizi - 3. numune	58

Şekil 4.9 1., 2. ve 3. numunelerine ait CD eğrilerinin karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.10 Yeniden katlama yoluyla elde edilen sfGFP-BMP2'nin Saos-2 tip hücre hattıyla gerçekleştirilen canlılık testi grafiği	62



SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

bç	baz çifti
G	Gram
M	Molar
Mg	Miligram
mL	Mililitre
kDa	kilo dalton
mM	Milimolar
Nm	Nanometre
Ng	Nanogram
Rpm	dakikadaki devir sayısı
μ M	mikromolar

Kısaltmalar

Açıklama

ALK	Activin Receptor Like Kinases
ATP	Adenozin trifosfat
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
BMPR	BMP reseptörleri
C2C12	Fare miyoblast hücre hattı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FP	Floresan Protein
GFP	Yeşil Floresan Protein
GST	Glutasyon-s-Transferaz
HBI	4-(p-hydroxybenzylidene)imidazolidin-5-one
HSP	Isı Şoku Proteini
IB	İnklüzyon Cisimcikleri

IPTG	Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosit
MBP	Maltoz Bağlayan Protein
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NCBI	National Center of Biotechnology Information
Ni-NTA	Nikel Nitrilotriacetic Asit
PBS	Fosfat tamponu
PIPERES	piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
rhBMP	Rekombinant insan Kemik Morfogenetik Protein
Saos-2	İnsan osteosarkoma-2 hücre hattı
sfGFP	Superfolder Yeşil Floresan Protein
TGF β	Transforme Edici Büyüme Faktörleri β
TEV	Tobacco Etch Virus

1. GİRİŞ

Günümüzde Ar-Ge ve tedavi gibi amaçlarla tıp, eczacılık ve veterinerlik uygulamaları için ihtiyaç duyulan pek çok protein rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak ticari olarak üretilmektedir. Bu teknikler kullanılarak spesifik hedef proteinler bakteriyel ve ökaryotik ekspresyon sistemleri ile yüksek konsantrasyon ve yüksek saflıkta üretilmektedir. Bu teknoloji geliştirilmeden önce domuz serumundan saflaştırılarak kullanılan ve bazı alerjik reaksiyonlar gibi yan etkileri bulunan domuz serumu orijinli insülin yerine 1980’lerde *E. coli* sisteminde rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen insan geni orijinli insülin kullanılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeler ile yüksek miktar ve saflıkta ucuz üretim sağlanmış, ilerleyen yıllarda tıbbî açıdan önemli başka birçok protein bu teknikle üretilmeye devam edegelmiştir.

Bugüne kadar yüksek konsantrasyonda rekombinant protein üretmek için prokaryotik ve ökaryotik bazı ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir. Basit bir sistem sunan ve geniş yelpazede protein üretilmesine imkan sağlayan *E. coli* organizması günümüzde en yaygın kullanılan ekspresyon konakçılarından biri olmuştur. *E. coli*’de protein ekspresyonu için, öncelikle hedef proteinin gen dizisi bir plazmite entegre edilir ve plazmitin *E. coli*’ye transformasyonu sağlanır. Plazmit seçiminde ekspresyon için tasarımı yapılmış ve yüksek kopya sayısına ulaşabilen plazmitler seçilmelidir. Genellikle plazmit bir “*lac*” promotörü içerir ve bu promotor bir laktoz analogu olan İzopropil β -D-1-tiogalaktopiranosit (IPTG)’nin belirli konsantrasyonları ile aktive edilerek hedef proteinin yüksek konsantrasyonda üretilmesi sağlanır. *E. coli* BL21 ve BL21(DE3) gibi suşlar ekspresyon için yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Bu suşlar Ion ve OmpT proteazlardan yoksun oldukları için ürettikleri proteinler degradasyona uğramazlar (Jeong ve ark., 2009). Böylece hücre tarafından ekspresyonu yapılan proteinlerin stabil halde saflaştırılmasına olanak sağlarlar.

E. coli bakteriyel sisteminde rekombinant protein üretiminin maya ve memeli sistemine göre klonlama süresi ve maliyeti gibi noktalarda bir takım avantajları vardır. Bununla birlikte bazı bakteriyel organizmalara yabancı olan ve çoğunlukla yüksek yapılı daha kompleks organizmalara ait proteinlerin üretiminde agregasyon gibi sebeplerle IB’lerin oluşması, çözünür formda protein eldesinin düşük verimde kalmasına ya da protein

varlığının gözlemlenmemesine neden olmaktadır. Bu problemlerin aşılması için, üretilcek hedef proteinin *E. coli* sisteminde yüksek verimli üretilen proteinlerle füzyon halde üretilmesi ve şaperon sistemleri ile yapılacak ko-ekspresyonla protein üretim verimliliğinin artırılması hedeflenmiştir. Agregasyon sonucu inklüzyona uğramış proteinlerin yeniden eldesi için uygulanan refolding (yeniden katlanma) gibi yöntemlerle doğru katlanmış ve fonksiyonel protein eldesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda füzyon protein olarak bir floresan proteini olan süperfolder GFP kullanılmıştır. Bilindiği gibi floresan moleküller ile etiketleme, laboratuvar çalışmalarında düşük konsantrasyonlarda bile görünür olması ve yıkıcı sonuçlara yol açmaması gibi nedenlerle biyomoleküllerin etiketlenmesinde başvurulan bir yöntemdir. Yeşil Floresan Protein (GFP) de diğer floresan moleküller gibi saptama, protein çözünürlüğünü artırma, lokalizasyon gibi amaçlarla hedef proteinlerin etiketlenmesinde kullanılmaktadır (Pédélec ve ark., 2006). Bu proteinler uygun modifikasyonlarla hücrel olayların aydınlatılmasında etiket olarak kullanılmaktadır. Mutant olarak üretilen süperfolder GFP ise daha gelişmiş özelliklere sahiptir. sfGFP, füzyon ortağının yanlış katlanmasından etkilenmez ve füzyonun çözünürlüğünden bağımsız olarak toplam ifadeyle doğru orantılı olarak saptanabilir, bu da sfGFP floresansını füzyon proteinin ifadesinin sağlam bir göstergesi yapmaktadır (Pédélec ve ark., 2006). Çalışmamızda sfGFP'nin bu gibi özellikleri rhBMP2'nin üretim verimini arttıracak düşünölmüştür.

Hücrel yaşamda üretilen çeşitli proteinlerin takibi ve kalite kontrolü şaperonlar tarafından yapılmaktadır. Bu moleküllerin yeni sentezlenen proteinlerin doğru şekilde katlanmasını sağlama, protein komplekslerinin birleşimi sırasında alt üniteleri ısı şokundan koruma ve hedeflenen açılma ve ayrılma işlemlerini kolaylaştırma gibi görevleri vardır (Saibil, 2013). Hücrede bu gibi doğal görevleri olan şaperon proteinlerden rekombinant protein üretiminde de faydalanılmaktadır. Her birinin farklı görevi ve çalışma şekli olan ısı şoku (Hsp) proteinlerinin *E. coli*'deki homologları olan *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*, *groES*-*groEL* ve tetikleme faktörü (*tig*) şaperonları rekombinant protein üretiminde kullanılmaktadır. Yine bu amaçla geliştirilmiş Takara™ Şaperon Plazmit Seti'nde yer alan beş farklı plazmit bulunmakta ve her birinde yukarıda sayılan şaperonlar farklı kombinasyonlarla sunulmaktadır (Bkz. Çizelge: 2.2).

BMP2 proteinleri kemik ve diş dokularında oluşan tahribatların giderimi terapötik uygulamalarda tıp ve diş hekimliği alanlarında önemli bir proteindir. BMP2'lerin kullanımını kısıtlayan en önemli faktör üretim maliyetlerine bağlı olarak oluşan yüksek fiyatıdır. Son yıllarda yüksek ölçekli üretimin sağlanması için araştırma odaklı çabalar devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda üretim koşulları, protein izolasyon metotları, yeniden katlanma, dimerizasyon ve saflaştırma basamakları gibi üretimi etkileyen basamaklar gözden geçirilerek iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında, Transforme Edici Büyüme Faktörleri β (TGF β) süper familyasından olan insan Kemik Morfogenetik Proteini 2 (BMP2)'nin yüksek miktar ve saflıkta ve fonksiyonel olarak eldesi amaçlanmıştır. *E. coli* BL21-AI hücrelerinde sfGFP proteini ile füzyon halde "sfGFP-BMP2" rekombinant olarak üretilmiştir. Başlangıçta, biyoinformatik çalışmalar sonucu oluşturulan gen kaseti pET30a vektörü çoklu klonlama bölgesine (MCS) klonlanacak şekilde ticari olarak temin edilmiş, sonrasında *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücrelerine transforme edilip ekspresyonu sağlanmıştır. Üretim sonrası protein eldesinin istenen seviyede olmamasından dolayı en yüksek verimin elde edildiği *tig* şaperonunu kodlayan pTf16 plazmiti ile *E. coli* BL21-AI hücrelerinde koekspresyon yapıldığında sfGFP-BMP2'nin büyük miktarlarda ekspresyonunun gerçekteştiği görölmüştür. Ancak üretilen proteinin büyük oranda çözünür formda olmadığı, inklüzyon cisimcikleri oluşturarak aggregasyona uğradığı ve pelette çökelti oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu aşamada yeniden katlama (refolding) yöntemleri ile pelette bulunan IB'lerden protein geri kazanımı ile yüksek miktarlarda çözünür formda protein eldesi sağlanmıştır. Saflaştırılan protein spektrofotometrik olarak kantitatif, SDS-PAGE tekniği ile kalitatif olarak analiz edilmiştir. sfGFP-BMP2'nin insan osteosarkoma-2 (Saos-2) hücre hattı üzerinde yapılan hücre költürü çalışmaları sonucunda proliferatif etki varlığı test edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ / GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Morfogenetik Proteinler (BMP'ler)

Kemik Morfogenetik Proteinler (BMP'ler), Transforme Edici Büyüme Faktörleri β (TGF β) süperfamilyası altında sınıflandırılan multifonksiyonel büyüme faktörleridirler. Son yıllarda BMP'lerin embriyonik gelişme ve postnatal hücre fonksiyonlarında oynadığı roller gibi biyolojik özellikleri birçok bilimsel çalışmaya konu olmuştur. Yapılan çalışmalar BMP'lerin kemik gelişimde mezenkimal hücrelerin osteogenik hücrelere farklılaşmasını uyardığını, embriyonik dönemde hücre proliferasyonunu arttırdığını ve yetişkinlerde kemik ve vasküler sistem homeostasisinde rol oynadığını ortaya koymuştur (Carreira ve ark., 2014, Goumans ve ark., 2017). Modern moleküler biyoloji, bu proteinleri genomun uyarılması ve morfo-genetik tepkinin oluşması bağlamında morfogenetik proteinler olarak adlandırmayı uygun görmüştür. Kimyasal bağlamda bakıldığında ise BMP'ler yapı olarak protein yapıdadırlar, belirli hücrelerden salınırlar ve yine farklı tipte hücre membranı üzerinde bulunan reseptörlere ligand şeklinde bağlanarak onlarda belirli bir mekanizmayı harekete geçirerek etki ederler. Hücreler uyarana cevap olarak proliferasyona uğrarlar, farklılaşırlar ve görevlerine göre konumlanırlar (Cranjeiro ve ark., 2005).

Bu güne kadar çok sayıda BMP izole edilip tanımlanmıştır. 1965 yılında yapılan bir çalışmada demineralize ve liyofilize kemik parçalarının ektopik bölgelere implantasyonu sonucu yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir (Urist, 1965). Yine demineralize kemik dokusunun ektopik bölgelerde kemik dokusu oluşumunu uyardığı gözlemlenmiştir (Reddi, 2000). Buradaki ektopik kemik oluşumundan sorumlu faktörler “Kemik Morfogenetik Proteinleri” olarak adlandırılmışlardır; zira bu faktörler tipik bir proteaz olan tripsin enzimi ile muameleye tabi tutulduklarında etkilerini yitirmekteydiler. Çok sayıda farklı tip ve özellikte BMP proteinleri ektopik kemik dokusundan izole edilip tanımlanmıştır (Katagiri ve Watabe, 2016). BMP'ler osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, kondrositler ve plateletler tarafından sentezlenebilmekte ancak üretimleri sadece kemik dokusu ile kısıtlı kalmamaktadır. Bu proteinler farklı dokularda çok sayıda hücre tipinin gelişiminde hücre proliferasyonu ve farklılaşması, diş morfogenezi, organogenez, embriyonik gelişme, apoptoziz, kemotaksi ve çok sayıda dokunun tamiri gibi kritik roller oynamaktadırlar (Ducy ve Karsenty, 2000). BMP'ler mezenkimal

hücreleri osteoblastik hücrelere farklılaştırarak endokondral ossifikasyon (kemikleşme) ve kondrojenezi uyarmakta bu sayede de iskelet sağlamlığının devamı ve kırıkların onarılmasında kritik rol oynamaktadır (Leboy ve ark. 2001).

2.1.1. BMP'lerin sınıflandırılması ve yapısı

Bu güne kadar 20 farklı insan BMP proteini bulunup tanımlanmış ve amino asit benzerlikleri ve bilinen fonksiyonlarına göre sınıflandırılmışlardır (Chen ve ark. 2004). Bu proteinler BMP-1'den BMP-18'e kadar numaralanmış olup ilave olarak BMP-3b (GDF10) ve BMP-8b proteinleri bulunmaktadır. BMP'lerin timüs bezi, kemik iliği, beyin, omurilik, iskelet kasları, akciğer, karaciğer, böbrek, pankreas ve prostat gibi çeşitli dokulardan sentezlenmekte; kemik ve eklem morfogenezi, iskelet onarımı ve rejenerasyonu ile çeşitli organların morfogenezinde biyolojik görevleri bulunmaktadır (Bragdon ve ark. 2011). Bu 20 proteinin her birisi osteogenik değildir. Prokolajen I, II ve III'ü karboksi ucundan kesen ve metalloproteaz olan BMP-1 TGF β familyasına dahil olmamasına rağmen *in vivo*'da kırıkta oluşumunu uyarmaktadır (Kessler ve ark., 1991, Nakashima ve ark. 2002). TGF β süperfamilyasına ait proteinler insanda ve diğer türlerdeki protein sekans benzerliklerine göre sınıflandırılmışlardır. İskelet dokusu olmayan yumuşak dokularda yapılan implantasyonlarda heterotopik kemik oluşumunu uyarmasından dolayı birçok BMP “growth and differentiation factor” “GDF” olarak adlandırılmışlardır (Katagiri ve Watabe, 2016). BMP familyası amino asit sekansına göre dört subfamilyaya ayrılmıştır (a) BMP2 ve BMP8; (b) BMP3, BMP3G (GDF10); (c) BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a ve BMP8b; (d) GDF5, GDF6 ve GDF7 (Nakashima ve ark. 2002). BMP ailesinin bu bireysel üyeleri ayrıca matür domenlerinin sahip olduğu amino asit sekans benzerliğine göre alt ailelere bölünmüştür. Diğer bir çalışmada BMP-2 ve BMP4 proteinlerinin %80 oranında amino asit sekans benzerliğine, BMP5, BMP6, BMP7 ve BMP8'in ise %78 oranında amino asit sekans benzerliğine sahip oldukları; bu iki grup arasında matür proteinlerin sekans benzerliği noktasında %55 ile %65 oranında bir benzerlik olduğu gösterilmiştir (Hoffmann ve Gross, 2001).

Çizelge 2.1 Bazı BMP proteinleri ve görevleri (Aihamuwa ve ark., 2017)

BMP'ler	Görevleri
BMP2	Osteoindüksiyon, osteoblast farklılaşması ve apoptoz
BMP3	Kemik dokuda en fazla bulunan BMP, osteogenezi inhibe eder
BMP4	Osteoindüksiyon, akciğer ve göz gelişimi
BMP5	Kondrogenez
BMP6	Osteoblast gelişimi, kondrogenez
BMP7 (OP-1)	Böbrek ve gözde osteogenez gelişim
BMP8 (OP-2)	Osteoindüksiyon
BMP9	Sinir sistemi, hepatik retikuloendotel sistem, hepatogenez.
BMP10	Kardiyak gelişim
BMP11 (GDF8)	Mezodermal modelleme ve nöronal dokular
BMP12 (GDF7)	Tendon – iliak doku formasyonunun indüklenmesi
BMP13 (GDF6)	Tendon – iliak doku formasyonunun indüklenmesi
BMP14 (GDF5)	Tendon – ligamet formasyonunun indüklenmesi
BMP15	Fölkül uyarıcı hormon (FSH) aktivitesinin düzenlenmesi

TGF β familyasının diğer üyeleri gibi BMP'ler de pre-pro-polipeptitler olarak sentezlenmektedirler (Xiao ve ark., 2007). 400 – 500 amino asit büyüklüğünde olan bu peptitler sekresyon yönünü belirleyen bir N-terminal ve bir pro-domen yapısına ilave olarak, daha sonra serin endonükleaz ile Ar-X-X-Arg amino asit dizisinden proteolitik kesime maruz kalacak bir C-terminal içeren matür peptitten oluşmuştur. Örnek olarak BMP4 prekürsör protein furin tarafından kesilmedikçe pre-protein halden serbest matür protein haline geçememektedir (Nelsen ve Christian, 2009). 50 ila 100 amino asitten oluşan bu matür BMP monomerleri 7 sistein amino asidi içermekte ve bunların altısı molekül içi disülfid bağlarını oluşturmakta yedincisi ise diğer BMP monomeri ile kovalent disülfid bağını oluşturmakta ve böylece BMP reseptörünü aktiveştirecek biyolojik olarak aktif dimerik ligant molekül vücuda gelmektedir (Nohe ve ark., 2004).

2.1.2. BMP reseptörleri ve intrasellüler sinyal iletimi

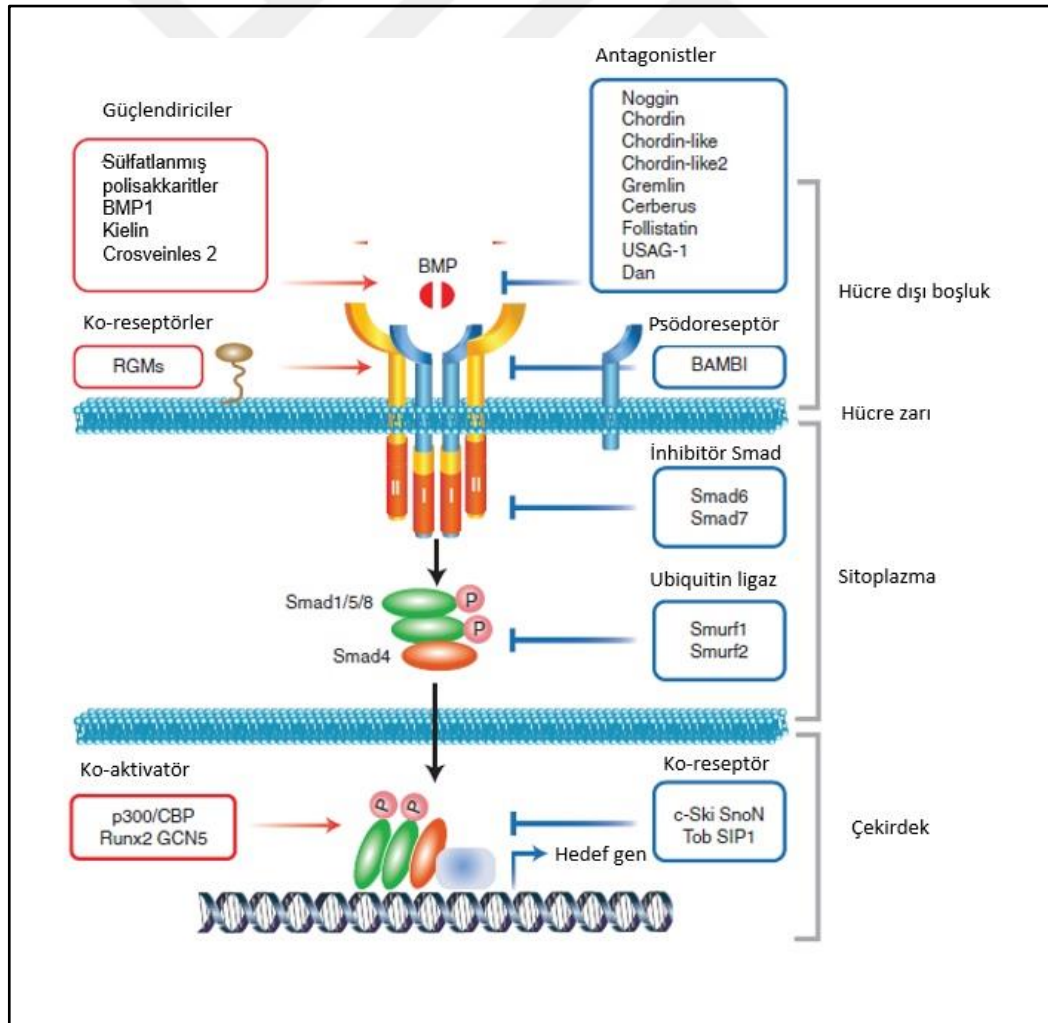
BMP ailesine ait proteinler BMP reseptörlerine (BMPR) bağlanırlar. BMP'ler diğer TGF β üyeleri gibi iki tip serin – tirozin kinaz transmembran reseptörleri üzerine etki ederler. Bu reseptörler Tip I ve Tip II reseptörleri olarak gruplandırılmaktadır. BMP'ler

diğer TGF β grubu büyüme faktörlerinden farklı olarak Tip II reseptörlerin olmadığı durumlarda da Tip I reseptörlerine bağlanabilirler, ancak bu reseptörlerin birlikte bulunma durumlarında bağlanma afiniteleri dramatik olarak artmaktadır (Rosenzweig ve ark., 1995). BMP'lerin hücre içi üretimi için gerekli sinyali başlatan düzenek BMP reseptörlerinin ekstrasellüler domenine BMP ligandının bağlanması ile oluşmaktadır. 10 – 12 sistein rezidüsünden oluşan ekstrasellüler domen, bir transmembran domen ve intrasellüler serin – tirozin kinaz domenden oluşmaktadır (Bragdon ve ark., 2011).

BMP'ler için üç çeşit Tip II reseptörü bulunmaktadır; bunlar: BMP Tip II reseptör (BMPRII), memelilerde Aktivin Tip II reseptör (ActII) ve Aktivin Tip IIB (ActIIB) reseptörleridir. BMPRII reseptörleri BMP'lere özgü olmakla beraber ActII ve ActIIB reseptörleri; BMP'ler, aktivinler ve miyostatinler ile ortak reseptörlerdir (Rosenzweig ve ark., 1995). Tip II reseptörler genelde BMP ligantlarının Tip I reseptörlere bağlanmasını kontrol ederler. TGF β familyasının diğer üyeleri gibi Tip II reseptörlerin serin – threonin kinazları da bazal aktiflik gösterir ve Tip I reseptörlerin glisin – serin (G-S) amino asitlerce zengin domenlerini fosforile eder. TGF β familyası proteinleri için 7 çeşit Tip I reseptör bulunur (Aktivin Receptor-Like Kinases 1- 7). Bunlar ALK3 (BMPRIA), ALK& (BMPRIB), ALK2 ve ALK1 genelde birçok BMP için Tip I reseptör şeklinde etki eder. ALK3 ve ALK6 birbirine yapısal olarak yüksek homoloji göstermektedir. ALK2 ve ALK3 birçok hücre tarafından eksprese edilmektedirler. ALK6 ise kısıtlı olarak eksprese edilmekte ve ALK1 ekspresyonu yalnızca endotel hücrelerine ve birkaç belli başlı hücre tipine özgü kalmaktadır. Aktiflenmiş Tip I reseptör kinazlar bundan sonra sitoplazmada bulunan Smad proteinlerini fosforile etmektedir (Miyazono ve ark., 2010). BMP'lerin Tip I reseptörlere bağlanma sipesifiteleri tip II reseptörlerinin bağlanma özelliklerine ve hücre tipine bağlıdır. BMP2 ve BMP4 proteinleri ALK3 ve ALK6'ya bağlanırken, BMP6 ve BMP7 proteinleri ALK6'ya zayıfça ve ALK2'ye kuvvetlice bağlanmaktadır (Yu ve ark. 1995).

Memelilerde sekiz adet farklı Smad proteini (Smad 1 – 8) tanımlanmıştır. Aktifleşmiş BMP I Tip reseptörler, R-Smad 'ları (receptor-regulated Smads) fosforile ederler. İlk bağlanmadan sonra Tip II reseptörler Tip I reseptörleri fosforile eder ve Smad kompleksleri aracılığıyla intrasellüler sinyalleşme aktive edilir (Şekil 2.1). Smad1, Smad5 ve Smad8 (BMP-spesifik R-Smad'lar) karboksi-terminalde S-S-X-S motifini

oluşturular. Fosforile edilmiş ve aktifleşmiş R-Smad proteinleri sonrasında Smad4 (Common partner Smad – Co-Smad) ile kompleks oluştururlar, daha sonra kompleks nükleusa hareket eder (Katagiri ve Watabe, 2016). İki tane R-Smad ve bir Co-Smad'dan oluşan kompleks pek çok transkripsiyonel ko-aktivatör ile ya da ko-represör ile bağlanabilir. Bunlar hedef genin transkripsiyonunu düzenlemek üzere regülatör elemanlara bağlanırlar (Katagiri ve Watabe, 2016). Noggin, kordin, gremlin ve follistatin gibi BMP antagonistleri sinyal yolağını inaktive edebilir. Benzer şekilde I-Smad'lar (Smad6 - Smad7) Tip I BMP reseptörlerine bağlanarak R-Smad ve Co-Smad heteromerizasyonunu engellerler. Smurf yapısı R-Smad kompleksi ile etkileşime girer ve Smad proteinlerinin degradasyonunu düzenler (Chen ve ark., 2004; Murakami ve ark., 2003). Nükleus içerisinde ise çok sayıda ko-represörler ve ko-aktivatörler bulunmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 BMP sinyalleşmesinde ligantların reseptörlere bağlanması, sitoplazmada taşınım ve hedef genin transkripsiyonunun uyarılması (Katagiri ve Watabe, 2016'dan uyarlanmıştır)

2.1.3. BMP'lerin biyolojik görevleri

BMP proteinleri insan vücudunda embriyogenezden başlayarak tüm yaşam boyunca belli görevler için kullanılmaktadır. Bu proteinler adipositler, tenositler ve miyositler gibi birden çok hücre tipine farklılaşmaya izin verecek şekilde pluripotensi özelliği bulunan olan ortak bir farklılaşmamış mezenkimal kök hücre popülasyonundan gelişen osteoblastların ve kondrositlerin çoğalmasını ve/veya farklılaşmasını düzenler (Katagiri ve Watabe, 2016). BMP'ler kemik dokuda osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar ve kondrositler, plateletler ve endotel hücreleri tarafından sentezlenmektedir. BMP'lerin en yüksek etkisi mezenkimal ve embriyonik hücrelerin osteoblast farklılaşması için indüklenmesi ile kıkırdak oluşumunun ve alkalın fosfataz aktivitesinin stimüle edilmesinde gözlemlenebilir. Diğer hormon ve sitokinler kemik metabolizması için gerekli ve yeterli düzenlemeyi sağlayamazlar (Granjeiro ve ark., 2005). BMP proteinleri embriyonik dönem mezoderm formasyonu sırasında kalp ve kıkırdak oluşumunda görev aldıkları gibi doğum sonrası dönemde de kemik oluşumu ve metabolizmasında görev alırlar (Javier ve ark., 2012). BMP5, BMP8a, BMP9 ve BMP13 kemik ve kıkırdak oluşumunda görev alırlar (King ve ark., 1994; David ve ark., 2007; Shen ve ark., 2009). BMP'ler sadece kemik ve kıkırdak morfogenezinde görev almamakta, büyüme ve gelişmenin farklı evrelerinde kemik osteogenezinde de görevleri bulunmaktadır (Ducy ve Karsenty, 2000). BMP2, BMP4, BMP6 ve BMP7 kemik ve kıkırdak oluşumunu uyarırken (Wolfman ve ark., 1997), yine BMP2, BMP4, BMP7, BMP14 ve BMP16 proteinleri iskelet tamir ve rejenerasyonunda görev almaktadır (Bragdon ve ark., 2011). İn vitro çalışmalarda BMP2, BMP6 ve BMP9 proteinleri pluripotent hücrelerde alkalın fosfataz ve osteokalsin ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2003). Osteojenik BMP'ler, yumuşak dokuda endokondral ossifikasyon yoluyla heterotopik kemiği indükler. Farklılaşmamış mezenkimal hücreler, implantasyondan sonraki bir hafta içinde Tip II kollajen ve çeşitli proteoglikanlar gibi kıkırdağa özgü hücre dışı matrisleri salgılayan kondrositlere farklılaşırlar. Mezenkimal hücrelerde olduğu gibi, osteoblast hücreleri rhBMP-2 ile muameleye tabi tutulduğunda alkalın fosfataz, osteokalsin,

osteopontin ve kemik siyaloprotein seviyelerinde yükselme tespit edilmiştir (Wang ve ark., 1993).

BMP proteinlerinin kırıkta ve kemik doku dışında da etkileri gözlemlenmektedir. İskelet kasları, BMP'lerin hedef dokuları arasındadır. BMP sinyali, embriyonik gelişim sırasında ve bazı patolojik durumlarda iskelet kası dokusunda iskelet dokusu gelişimini indükler. İskelet kası dokusu sadece çok çekirdekli kas liflerini değil, aynı zamanda uydu hücreleri, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve mezenkimal interstisyel hücreler dahil olmak üzere birkaç tip mononükleer hücre içermektedir (Lounev ve ark., 2009). Bu hücreler, BMP'ler tarafından indüklenen kondrositlerin ve osteoblastların potansiyel progenitör hücreleridir (Medici ve ark. 2010). Osteojenik BMP'ler C2C12 miyoblastlarında osteoblastik farklılaşmayı indüklediği için uydu hücreleri ve miyoblastların, kondrositlerin ve osteoblastların progenitör hücreleri olduğuna inanılıyordu (Katagiri ve ark. 1994). Ancak yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, iskelet kasındaki osteojenik BMP sinyaline yanıt olarak birkaç progenitör hücre tipinin osteoblastlara ve kondrositlere farklılaşabileceğini göstermektedir (Katagiri ve Watabe, 2016).

BMP sinyali, adipogenezde pre-adipositlerin olgunlaşması ve farklılaşmamış progenitör hücrelerin yönlendirilmesinde önemli roller oynamaktadır. BMP2, BMP4 ve BMP7 miyosit, adiposit, kondrosit ve osteoblast benzeri hücrelere farklılaşmak için pluripotensi gösteren C3H10T1/2 hücrelerinin adipogenezini uyarmaktadır (Asahina ve ark., 1996; Bächner ve ark., 1998). BMP'ler beyaz ve kahverengi adipoz doku oluşumu için önemlidir. Kahverengi yağ dokusu, Myf5 eksprese eden hücrelerin BMP7 ile stimülasyonu sonrası gelişmektedir (Tseng ve ark., 2008). BMP8b ise kahverengi yağ dokusunda eksprese edilir ve termojenezi hem lokal olarak hem de merkezi sinir sistemleri yoluyla sistemik olarak artırır (Whittle ve ark., 2012).

BMP proteinlerinin fizyolojik etkileri hastalıklar üzerinden de güçlü şekilde görülmektedir. Mutasyon gibi sebeplerle BMP aktivitesinin kaybolması çeşitli iskelet anomalilerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Örnek olarak BMP5 geninde oluşan mutasyon sonucunda farelerde “kısa kulak” oluşumu gözlenmesiyle beraber; gelişmede, iskelet yapılarında ve kırık tamir mekanizmasında bozukluklar ortaya çıkmaktadır

(Kingsley ve ark., 1992). Multiple sinostoz sendromu BMP/GDF aktivitesinin normalden yüksek olması ile ortaya çıkan ve yetişkinlerde eklemlerin kaynaşmasına sebep olan bir hastalıktır. Buna genelde noggin proteinin işlev bozukluğu ya da mutasyon sebebiyle ortaya çıkan GDF'nin yüksek aktivitesi sebep olmaktadır (Dawson ve ark., 2006).

BMP'ler yukarıda sayılan temel biyolojik görev ve tesir alanlarının yanı sıra demir homeostasisi, diş oluşumu, saç folikül gelişimi, böbrek oluşumu gibi önemli görevleri de ifa etmektedir. BMP'ler ayrıca tümör oluşumu ve baskılanmasında etkin rol oynamaktadır. BMP ligand ve supresör molekülleri kanserli dokular için geliştirilecek terapötik stratejilerde kullanılabilir. Yine BMP sinyallerinin kaybı ya da artışına bağlı hastalıklar BMP aktivatör ve inhibitörlerinin kullanımı ile ilgili olanaklar sunmaktadır (Katagiri ve Watabe, 2016).

2.1.4. BMP'lerin terapötik ve klinik kullanım alanları

BMP'lerin osteoindüktif kapasitesi yapılan modelleme çalışmalarında gösterilmiş ve klinik deneylerde değerlendirilmiştir. Keşfedilmesinden sonraki yıllar içerisinde hayvan deneylerinde ve klinik deneylerde gösterilen olumlu sonuçlar sonrasında rekombinant teknoloji kullanılarak üretilen patentli BMP ürünleri farklı tedavilerde kullanılmaya başlanmıştır. Bu rekombinant proteinlerin kullanımının daha çok ortopedi ve dişçilik alanlarında yoğunlaştığı görülmektedir. Bu proteinler klinik olarak uzun kemiklerde meydana gelen kırıkların tedavisinde (Lissenberg-Thunnissen ve ark., 2001), yüz ve ağız çevresi kırıklarında, diş ve çene kemiği tedavilerinde kullanılmaktadır (Boyne ve ark., 1998; Boyne, 2001). BMP'lerin defekt olan bölgeye direk implantasyonu yapılarak kritik düzeydeki kemik defektlerinin tedavisi amaçlanır (Murata ve ark., 1999; Khan ve ark., 2004).

BMP'ler ile yapılan ilk klinik çalışmalar daha çok spinal füzyon deneyleridir ve olumlu sonuçlar gösterilmiştir. Bununla beraber BMP'lerin (rhBMP-2) lokal alveoler çıkıntının korunması veya augmentasyonu (Howell ve ark., 1997) veya maksiller sinüs tabanının augmentasyonu (Boyne ve ark., 1997) için etkisini analiz eden klinik deneyler gerçekleştirilmiştir. Ren geyiklerinden elde edilen kemik ekstraktlarının farelerde direk uygulanması ile kas doku üzerinde ektopik kemik oluşumu gözlemlenmiş ve ratlarda kritik büyüklükte femur kırıklarının iyileşmesi gözlemlenmiştir (Tölle ve ark., 2011). Diş

hekimliğinde yapılan çalışmalarda ise, BMP'ler periodontal (periodontal hastalık nedeniyle kaybedilen kemik dokusunun rejenerasyonu), implant (implantların yerleştirilmesi için kemik hacminde artış, maksiller sinüs büyütme) ve restoratif-endodontik (pulpotomiler) prosedürlerde test edilmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Granjeiro ve ark., 2005).

Rekonstrüktif operasyonlarda greftleme ve flep oluşturma teknikleri kullanılmaktadır. Bu sayede BMP indüksiyonu ile kemik oluşumu sağlanıp daha sonra oluşturulan doku defekt bölgesine aktarılmaktadır (Kusumoto ve ark. 2000). BMP lerin terapötik potansiyeli, sıçanlarda, tavşanlarda, köpeklerde ve diğer bazı insan dışı türlerde, kritik boyuttaki uzun kemik defektlerinin iyileşmesiyle gösterilmiştir (Murakami ve ark., 2002).

BMP uygulamalarında taşıyıcı sistemlerin kullanılmasına da başvurulmaktadır. Köpeklerde yapılan bir deneyde, üç taraflı kemik içi defektlerin tedavisi için taşıyıcı sistemi (kolajen köpük) ile beraber uygulanan rhBMP2 sonucunda ankiloz ve apikal kemik rezorpsiyonu gibi yan etkiler olmadan kemik oluşum hızında artış gösterilmiştir (Choi ve ark., 2002). Hayvan modellerinde gerçekleştirilen BMP doz çalışmaları, 3 ila 3.5 mg BMP'nin, hemen hemen tüm spinal füzyon (intertransvers füzyon) vakalarında yeni kemiği indüklemek ve kemik defektini köprülemek için yeterli olduğunu göstermiştir (Rengachary, 2002). İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, emilebilir bir kollajen süngere uygulanan 1.5 mg/mL rhBMP-2'nin açık tibia kırığı olan 450 hastanın tedavisinde etkinliği gösterilmiştir (Burkus ve ark., 2003). Yine açık tibia kırığı olan hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada proteinin kemik onarımını arttırdığı bildirilmiştir. Bu hastalarda kırık bölgesine 1.5 mg/mL rhBMP2 uygulanmış ve ikincil müdahale ve enfeksiyon riskinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Govender ve ark. 2002).

1988 yılında Wozney ve ark. BMP2 proteinini kodlayan genin klonlanmasını gerçekleştirmesiyle birlikte saf insan rekombinat BMP2 üretiminin önü açılmıştır. BMP proteinlerinin terapötik potansiyeli göz önüne alınarak rekombinant olarak üretilen BMP2 ve BMP7 proteinlerinin klinik çalışmalarda kullanımı ABD Gıda ve İlaç Bakanlığı (FDA) tarafından 2001 yılında onaylanmıştır. Günümüzde bir rekombinant insan BMP7 (rhBMP7) olan OP-1®, spinal füzyon ameliyatlarında kullanım için onaylanırken, bir BMP2 biyoimplant olan Infuse® spinal füzyon, tibial kırık onarımı ve sinüs ve alveolar

kret greftleme için düzenleyici kurumlar tarafından onaylanmıştır. Yine bir rekombinant insan BMP2 proteini olan InductOS® adıyla üretilen ticari ürün tibial kırıklarda yeni kemik doku oluşumu tedavilerinde kullanılmak üzere FDA tarafından insan kullanımı için onaylanmıştır. Günümüzde rekombinant olarak üretilen BMP2 ve BMP7 patentli ürünleri ameliyatlarda kullanılmaktadır (Carreira ve ark. 2014).

2.1.5. İnsan kemik morfogenetik protein 2 (hBMP2) ve fizyolojik görevleri

Fizyolojik ve patolojik birçok mekanizmada önemli görevleri olduğu bilinen BMP'lerin henüz aydınlatılmamış birçok fonksiyonu olabileceği ve üzerinde daha birçok araştırmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir. BMP'lerin en bilinenlerinden olan hBMP2'nin protein ekspresyonu dalak, böbrek, akciğer ve pankreasta yapılmakta, kemik ve kırık dokuda rejenerasyonunda ve kalp oluşumunda önemli roller oynamaktadır (Bragdon ve ark. 2011).

Normal koşullarda BMP2 kırıkta glikozaminoglikanlarla kompleks halde bulunmaktadır, ve kemik dokunun fiziksel zarara uğradığı durumlarda mezenkimal hücrelerin proliferasyonunu indükleyerek onların osteoblastlara farklılaşmasını uyarmaktadır (Chen ve ark., 2004). İnsan genomunda BMP2'yi kodlayan gen 20. kromozom p12 lokasyonunda bulunmaktadır (Nakase ve ark., 1994). BMP2 proteini; hedgehog sinyal yolağında, TGF β sinyal yolağında ve sitokin – sitokin reseptör etkileşimlerinde rol almaktadır (Chen ve ark., 1998). BMP2'nin, BMP familyasından diğer bazı BMP proteinleri gibi pek çok hücre tipinde osteoblast farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir (Marie ve ark., 2002). Yine BMP2'nin beyaz adipogenezde rol aldığı ve metabolik etkileri rapor edilmiştir (Jin ve ark., 2006). BMP2, BMP, ve BMP9'un murin pluripotent C3H10T1/2 hücrelerinde alkalın fosfataz aktivitesini ve osteokalsin ekspresyonunu indüklemeye en güçlü BMP'ler olduğu rapor edilmiştir (Cheng ve ark., 2003). BMP2 proteini implantasyon uygulanması ile 7 günde kırık ve 14 günde kemik oluşumunun indüklendiği ve daha yüksek dozlar uygulandığı takdirde bu sürenin kısalacağı gösterilmiştir (Wang ve ark., 1990). Yüksek dozlarda bu süre 5 güne düşmektedir. BMP2, BMP4 ve BMP7'nin C3H10T1/2 hücrelerinin miyosit, adiposit, osteoblast-benzeri hücreler ve kondrositlere farklılaşmada pluripotensi uyardığı gösterilmiştir (Bächner ve ark., 1998).



Şekil 2.2 BMP2 proteinin üç boyutlu gösterimi (Anonim, 2021a)

Dimerik yapının her bir monomeri farklı renkte gösterilmiştir (yeşil ve kahverengi). Şerit gösterimleri β -kırmalı yapıları ve heliks gösterimleri ise α -heliks yapılarını göstermektedir.

Yabanıl tip BMP2 protein iki polipeptit zincirinden oluşan bir homodimerdir, bunlar Cys78 amino asiti üzerinden birbirine disülfid (S-S) bağları ile bağlanırlar (Scheufler ve ark., 1999). BMP2 monomerik formda 114 amino asitten oluşmaktadır. BMP2’de bulunan her bir monomer üç tane disülfid bağı taşımaktadır. Dimerize olmuş proteinin 3 boyutlu yapısı düşünüldüğünde toplamda yedi adet disülfid bağı oluşumu gerçekleşmektedir (Sharapova ve ark., 2010). BMP2 sadece dimerik formda olduğu zaman fonksiyonel yapısını göstermektedir ve disülfid bağları protein moelkülünün stabilizasyonu sağlamaktadır (Hillger ve ark., 2005). Homodimerik hBMP2 proteininin üç boyutlu yapısının şematik gösteriminde α -sarmal, β -kırmalı ve random kıvrılmalar gösterilmektedir (Şekil 2.2). Osteogenik hücrelerdeki serin/tirozin kinazlar ile etkileşime geçtiklerinde osteoblastların proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarmaktadırlar (Reddi, 2000). Rekombinant insan BMP2 proteini ile insan ve hayvan dokularından doğrudan elde edilen BMP2 protein numuneleri ile yapılan karşılaştırma çalışmalarında; bu farklı kaynaklardan elde edilen BMP2 proteinlerinin benzer aktivite gösterdiği *in vivo* ve *in vitro*’da osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını uyardığı tespit edilmiştir (Ishikawa ve ark., 2007, Bessa ve ark., 2008).

2.2. Rekombinant Protein Üretimi (BMP)

Rekombinant proteinlerin üretimi bir ekspresyon sistemini gerektirmektedir. Dolayısıyla ekspresyon sistemi seçimi, üretilen nihai BMP moleküllerinin etkinliği ve kalitesi için belirleyici faktör haline gelmektedir. Günümüzde, ifade sistemleri için çok sayıda alternatif bulunmaktadır ancak bu sistemler temelde bakteriyel sistemler, maya temelli sistemler, Baculovirus/insekt hücre sistemi (BEVS) ve memeli hücreleri şeklinde sınıflandırılabilir. Bu sistemlerin herbirisinin güçlü ve zayıf yönleri bulunmaktadır.

Memeli ekspresyon sistemi kullanılarak üretilen memeli orijinli proteinler, dokular tarafından üretilen orijinal endojen BMP'lerle karşılaştırıldığında en benzer özellikleri gösterir, çünkü bu sistem posttranslasyon protein modifikasyonunun tüm aşamalarını gerçekleştirmekte ve böylece rekombinant insan proteinlerini doğru şekilde modifiye edilmesini mümkün kılmaktadır (Brondyk, 2009). BEVS sistemi de memeli hücre dizilerine benzer şekilde avantajlar taşımakta ancak her iki ekspresyon sisteminin bakımı diğer ifade sistemlerine göre son derece yüksek maliyet oluşturmakta ve düşük üretim hızı ve düşük düzeyde kalan protein üretimi dezavantaj oluşturmaktadır. Memeli hücre ekspresyon sisteminde yapışan hücre dizilerinin ölçeğini büyütmek zor olabileceğinden, endüstriyel üretimde genellikle sonraki işleme kolaylığı için süspansiyonda ve serumsuz ortamda büyümek üzere uyarlanmış hücre dizileri kullanılır. Bu hücreler, ajitasyon veya havalandırmadan kaynaklanan kayma gerilimine karşı hassas olabilir ve genel hücre büyümesini ve canlılığını etkileyebilecek hücre kümelenmeleri oluşturmaları muhtemeldir. (Wurm, 2004).

Protein üretimi için ekspresyon sistemi olarak kullanılan maya sistemleri basit ve düşük maliyetli kültür ortamlarında bile yüksek büyüme oranları göstermektedir. Memeli hücrelerine benzer şekilde glikolizleme ve disülfid köprüleri oluşumu gibi posttranslasyonel modifikasyonları gerçekleştirerek doğru katlanmış protein üretimini sağlarlar. Ancak bu ekspresyon sistemi kullanılarak üretilen BMP7'nin, memeli hücrelerinde ifade edilenden çok daha düşük biyolojik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Kujala ve ark., 2004).

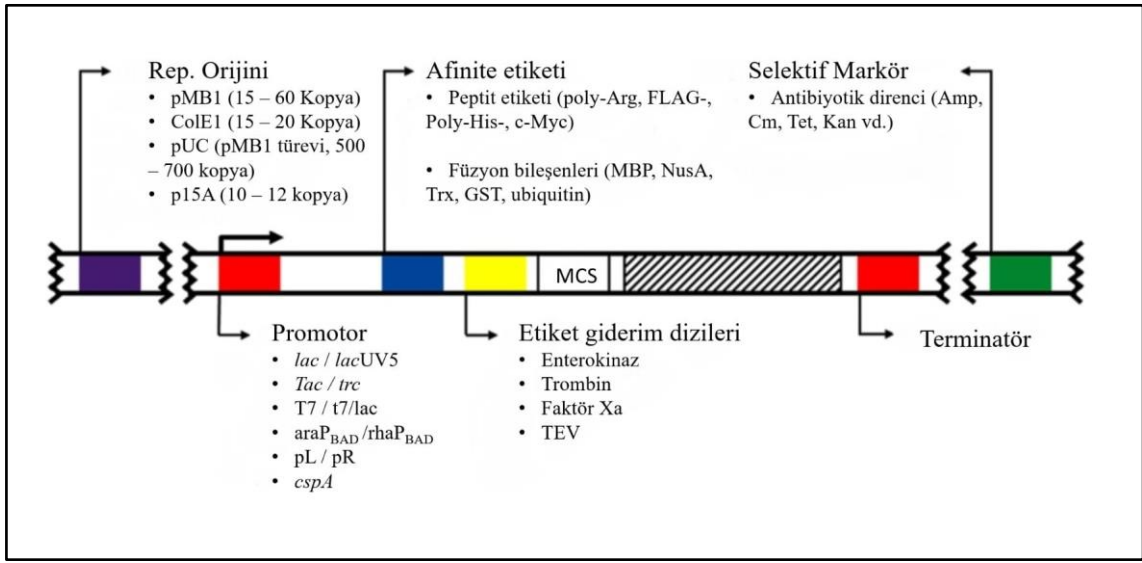
Bakteriyel ekspresyon sistemlerinde çoğu protein diğer ekspresyon sistemlerine göre yüksek hacimde üretilmektedir. *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* organizmaları en

yaygın olan bakteriyel ekspresyon sistemleridir. *E. coli* sistemi posttranslasyon modifikasyon sistemi olmaması gibi dezavantajlarına rağmen yüksek büyüme oranları, yüksek konsantrasyonda protein verimi ve düşük bakım gereksinimleri nedeniyle, büyük ölçekli protein üretimi için en uygun bakteri grubudur. Bunun yanında memeli sistemine göre yüksek verim, daha hızlı büyüme, yüksek hücre yoğunlukları, kolay kullanım, ticari üretim için kolay ölçeklendirme ve düşük üretim maliyeti gibi özellikleri tercih sebebidir (Pope ve Kent, 1996; Sezonov ve ark., 2007).

2.2.1. *Escherichia coli*'de rekombinant protein üretimi

Mikroorganizmal konakçı sistemleri arasında bakteri, maya, mantar ve tek hücreli algler yoluyla rekombinant protein ekspresyonu yapılmaktadır. Her bir sistemin güçlü ve zayıf yönleri olmakla birlikte bu durum en başta üretilen proteine bağlıdır (Adrio ve Demain, 2010). Ökaryotik posttranslasyonel modifikasyon (örn: protein glkolizasyonu) gerektiren bir proteinin üretimi için prokaryotik bir sistem uygun olmayabilir (Sahdev ve ark., 2008). Ancak prokaryotik bir organizma olan *Escherichia coli*, rekombinant protein üretimi için başlıca kullanılan organizmalardan biridir. Uzun yıllardır hücresel fabrika şeklinde kullanımıyla birlikte *E. coli* sistemi üzerinde binlerce araştırma yapılmış ve köklü ve çok bilinen ve iyi geliştirilmiş bir sistem halini almıştır. Heterolog proteinlerin yüksek düzeyde üretilmesi için geliştirilmiş geniş bir klonlama ve ekspresyon plazmitleri kataloğu, çok sayıda tasarlanmış suş ve birçok yetiştirme stratejisine her gün yenileri eklenmektedir. *E. coli* eşsiz bir büyüme ivmesine sahiptir. Glikoz içeren besi ortamında hücrelerin iki katına çıkma süresi sadece 20 dakika kadardır (Sezonov ve ark., 2007). Bu 1/100 oranında seyreltilmiş bir başlatıcı kültürün birkaç saat içerisinde durağan faza ulaşabilmesi anlamına gelmektedir. Yüksek hücre konsantrasyonlu kültürler kolayca elde edilmekte (Choi ve ark., 2006.), besi ortamı ucuz bileşenlerden oluşmakta ve yabancı DNA fragmenti taşıyan bir plazmitin transformasyonu 5 dakika gibi kısa bir sürede yapılabilmektedir (Pope ve Kent, 1996). Günümüzde yaygın kullanılan ekspresyon plazmitler; replikonların, promotörlerin, seçim markörlerinin, çoklu klonlama bölgelerinin ve füzyon proteini / füzyon proteini giderim stratejilerinin çoklu kombinasyonlarından oluşmaktadır (Şekil 2.3). Bu geniş yelpaze içerisinde üretilen hedef protein özelliklerine uygun seçim yapmak gereklidir.

Ekspresyon plazmit vektörü, temelde bir replikasyon orijini, promotor bölgesi, affinite bileşenleri ve bu bileşenlerin giderimi için enzim kesim bölgeleri ile çoklu klonlama bölgesi ve antibiyotik direnci gibi seçici markörlerin kodlandığı dizilerden oluşan halkasal formda çift iplikli bir DNA molekülüdür (Şekil 2.3). Üretilmesi hedeflenen proteinin dizisi çoklu klonlama bölgesine “doğru oryantasyonda” klonlandığında uygun besi ortamı ve indükleyici ajanların varlığında protein ekspresyonu gerçekleşmektedir (Rosano ve Ceccarelli, 2014).



Şekil 2.3 Standart bir ekspresyon vektörünün kısımları (Rosano ve Ceccarelli, 2014'den uyarlanmıştır)

E. coli organizmasında rekombinant üretimini vektör ve konakçı ekspresyon sistemleri, üretim koşulları, protein izolasyon metotları, yeniden katlanma, dimerizasyon ve saflaştırma basamakları gibi etkileyen pek çok değişken vardır (Vallejo ve ark., 2002; Von einem ve ark., 2010). *E. coli*'de yapılacak rekombinant protein üretimi için oluşturulan kültür ortamının sıcaklığı, azot-karbon kaynakları, konsantrasyonları, oksijen tüketimi ve pH değeri önemli parametrelerdir (Schmidt, 2004). Bunlara ilave olarak nadir kodonların ekspresyonu kısıtlaması da karşılaşılan durumlardan biridir. Üretilen heterolog proteinin kodon yanlılığı iyi analiz edilmelidir. Yabancı DNA'nın sinonim kodonları göz önüne alındığında bazı kodonların oluşma sıklığı konakçı organizma ile büyük farklılık gösterebilir. Böyle bir durumda ekspresyon sırasında düşük bolluklu üretilen tRNA miktarlarında ciddi düşüşler olacak ve bu eksiklik, amino asitlerin yanlış birleşmesine veya polipeptidin kesilmesine yol açarak heterolog protein ekspresyon

seviyelerini veya aktivitesini etkileyecektir (Gustafsson ve ark., 2004). Nadir kodonlar organizma tarafından %1'in altındaki sıklıklarda kullanılan kodonlar için kullanılır ve her organizmada farklı olabilir. Bu sebeplerden dolayı heterolog proteinin kodon yanlılığı uygun veritabanları kullanılarak optimize edilmeli ve nadir kodonlar değiştirilmelidir (Kane, 1995).

E. coli organizmasında gerçekleşen rekombinant ekspresyon neticesinde protein varlığını belirlemek için yapılan kalitatif ve kantitatif analizlerde hedef proteinin hiç gözlemlenemediği durumlar oluşabilir. Protein varlığı hassas yöntemlerle (western blot vd.) bile saptanamadığı ya da çok az saptandığı durumlarda indüksiyon öncesi ya da sonrası oluşan protein toksisitesi ihtimali değerlendirilmelidir (Miroux ve Walker, 1996). Bu sorunu aşmak için *lac* tabanlı promotorlar için glikoz seviyesi artırılabilir veya pLysS ve PLysE gibi T7 promotor tabanlı sisteme sahip *E. coli* suşları tercih edilebilir (Rosano ve Ceccarelli, 2014). Özellikle indükleme sonrası toksisiteden şüphelenilirse plazmitin replikasyon sayısı düşürülebilir ve indükleme düşük seviyede tutularak sorun aşılabılır, ya da toksik proteinlerin üretimi için uygun olan C41 ve C43 gibi suşlar tercih edilebilir (Miroux ve Walker, 1996). Nadir kodon sorunu olduğu düşünülürse, plazmit kopya sayısı düşürülebilir, proteinin periplazmadan saflaştırma yoluna gidilebilir ya da tekrardan kodon optimizasyonu yapılabilir (de Marco, 2009).

Organizmaya yabancı heterolog bir protein *E. coli*'de ekspresyon edildiğinde protein kendi orijinal üç boyutlu yapısına ulaşamayabilir. Çünkü rekombinant proteinin *E. coli*'de sentezlendiği mikroçevre pH, ozmolarite, katlama mekanizması, kofaktörler ve redoks potansiyeli yönlerinden orijinal kaynak ile oldukça farklılık gösterebilir (Rosano ve Ceccarelli, 2014). Yüksek düzeyde gerçekleşen ekspresyonlarda hidrofobik yüzeylerdeki gerilmeler benzer bölgelerin etkileşmesine sebep olabilir (Carrio ve Villaverde, 2002). Stabilizasyonu bozulan proteinler agregasyona uğrayarak inklüzyon cisimcikleri (İB) olarak bilinen yapıları oluşturabilirler (Hartley ve Kane, 1988). Inklüzyon cisimciklerinin oluşması genelde proteinin çözünürlük – agregasyon dengesinin bozulmasından kaynaklı gerçekleşir. Bu cisimciklerin ortadan kalkmasını sağlayacak stratejiler çözünür formda protein geri kazanımını sağlayabilir. Üretilmek istenen protein çözünürlüğü artırıcı bir füzyon protein ile birlikte ekpres edildiğinde füzyon edilen ikinci protein güçlü katlanma eğilimi gösteriyorsa agregasyonu ve IB oluşumunu engelleyebilir. Ekspresyon

vektörlerinde Maltoz Bağlayan Protein (MBP) (Kapust ve Waugh, 1999), NusA (Davis ve ark. 1999) ve glutation S-transferaz (GST) (Smith ve Johnson, 1988) gibi proteinler gibi afinite etiketi görevinde proteinler bu amaçla kullanılmaktadır. Bu affinite etiket proteinlerinin protein çözünürlüğünü nasıl arttırdığı tam olarak bilinmemekle beraber bir takım hipotezler ortaya atılmıştır. MBP'nin içsel şaperon aktivitesine sahip olduğu (Raran-Kurussi ve Waugh, 2012), GST'nin düşük seviye çözünürlük artırma aktivitesi gösterdiği ileri sürülmüştür (Bird, 2011). İnklüzyon cisimciklerinin oluşması (IB) her zaman kötü olmayabilir. Eğer IB'ler hücrelerin parçalanması sonrası in vitro uygulamalarla kolayca katlanabiliyorsa bazen IB'lerin oluşması avantaj bile sağlayabilir. Bu durumda klonlama ve kültür şartları proteinin IB oluşturmaya için bile ayarlanabilir (Burgess, 2009; Basu ve ark., 2011). Proteinlerin *E. coli* ekspresyonunda çözünür formda eldesi ve IB oluşumunun engellenmesi için moleküler şaperonlar da sıklıkla kullanılmaktadır (Bkz. Bölüm 2.3.2 Moleküler Şaperonlar).

2.2.2. BMP'lerin rekombinant üretimi

Diğer büyüme faktörleri gibi BMP'ler de normal fizyolojik koşullar altında dokularda çok düşük konsantrasyon seviyelerinde aktivite göstermektedir. BMP'ler demineralize dokulardan doğrudan izole edilmeye çalışıldığında 1 g kısmi saflaştırılmış BMP üretimi için 30 kg kadar kemik matriksi gerekebilmektedir. Bu durum üretimi hem yüksek maliyetli hem de düşük verimli bir işlem haline getirmekte ve uzun saflaştırma süreci zaman kaybına sebep olmaktadır (Urist ve ark., 1987). Genellikle dokularda 5-20 ng/mL gibi çok küçük dozlarda aktivite gösteren bu proteinlerin ticari ürünlerde uygulanan dozu 40 mg/mL seviyelerine kadar çıkmaktadır. Bu sebeplerden dolayı üretimde yüksek miktar ve konsantrasyonlarda protein eldesi için ekspresyon sistemlerinin kullanımına yönelinmiştir. Bugün ekspresyon sistemleri ile üretilen çok sayıda rekombinant protein terapötik amaçlarla kullanılmaktadır (Devine ve ark., 2012).

1980'lerden günümüze kadar BMP familyasından pek çok farklı BMP proteininin moleküler klonlanması yapılmıştır. 1988 yılında insan BMP2 proteini kodlayan gen ilk kez klonlanmış ve insan orijinli BMP2'nin rekombinant olarak üretimi için ilk basamak aşılmıştır (Wozney ve ark., 1988). Sonraki yıllarda insan BMP2 proteini rekombinant olarak üretilmiş ve ortopedik tedavilerde kullanım için piyasaya sunulmuştur. Önceleri

daha çok ortopedik tedavilerde kullanılan BMP2'ye sonraları diş hekimliği uygulamalarında da başvurulmuştur (Schlegel ve ark., 2006).

İnsan rekombinant BMP2'nin (rhBMP2) insan kemik matriksinden direk saflaştırılarak elde edilen BMP2'ye oranla daha düşük düzeyde osteo indüktif özellik gösterdiği saptanmıştır, bununla birlikte chinese hamster ovaryum hücreleri kullanılarak elde edilen rhBMP2 ile *E.coli*'de üretilen rhBMP2 karşılaştırıldığında indüktif özelliklerinin benzer olduğu görülmüştür (Bessho ve ark., 2000). rhBMP2'nin terapötik amaçlarla kullanımı en çok kısıtlayan sebep üretimi ile orantılı olarak pahalı bir ürün olmasıdır. *E. coli* sisteminde yüksek ölçekli, saf ve biyolojik olarak aktif rhBMP2 üretimi için çabalar devam etmektedir (Pramesti ve ark., 2012).

E. coli sisteminde insan orijinli disülfid (S-S) bağına sahip bir protein üretildiğinde çoğu kere çözünmez formda, denatüre ya da inaktif formda proteinler elde edilir ve IB'lerin sebep olduğu aggregasyonlar gözlenir (Graumann ve Premstaller, 2006). BMP2 proteini de sahip olduğu disülfid bağları ile *E. coli* mikroçevresinde benzer akıbete uğradığı rapor edilmektedir. Yabancıl tip BMP2 homodimer olarak aktivite göstermesine rağmen monomerik formda aktif değildir (Scheufler, 1999). Bu bilgiler ışığında *E. coli*'de rhBMP2 üretme çabaları genelde inklüzyon cisimciklerinden çözünür formda rhBMP2 elde etme ve rhBMP2'yi monomerik formdan dimerik forma döndürme çabaları ile hücre hatlarında biyolojik aktivitenin test edilme çalışmalarını kapsadığı sonucuna varılmaktadır.

2.3. Rekombinant Protein Üretiminde Yardımcı Yöntemler

Rekombinant protein üretiminde bazı yardımcı yöntemler kullanılmaktadır. Ticari olarak uygulanabilir bir proses oluşturmak için nihai ürünün yüksek üretim verimliliği ve düşük maliyeti gerekli olabilmektedir. Hedeflenen spesifik proteinin üretimi için ilgili genin etkili ifadesinin gerçekleşmesi gerekir. Protein ekspresyonunda *E. coli* ekspresyon sistemi kullanımında karşılaşılan zorluklar bu yardımcı yöntemler kullanılarak aşılabilmektedir. Hedef proteinlerin üretim verimini artırma ve doğru katlanmasını sağlama için bazı proteinler ile füzyon halde üretim yoluna başvurulur: rekombinant füzyon protein. Buna benzer şekilde şaperon proteinleri ile ko-ekspresyon şeklinde üretim yöntemi de tercih edilmektedir (Yu ve ark., 2014).

2.3.1. Rekombinant füzyon protein

Bir rekombinant füzyon proteini, bir füzyon gen kullanılarak genetik mühendisliği yoluyla oluşturulan bir proteindir. Bu tipik olarak birinci proteini kodlayan bir cDNA dizisinden durdurma kodonunun çıkarılmasını, ardından ikinci proteinin cDNA dizisinin ligasyon veya örtüşen uzatma PCR yoluyla çerçeveye eklenmesini içerir. Bu DNA dizisi daha sonra bir hücre tarafından tek bir protein olarak ifade edilecektir. Protein, her iki orijinal proteinin tam dizisini veya herhangi birinin yalnızca bir kısmını içerecek şekilde tasarlanabilir. Füzyon hale getirme genelde katalitik aktivite, çözünürlük, termostabilite, enzim aktivitesini artırma, ekspresyon seviyesini iyileştirme ve proteinin doğru katlanmasını sağlayarak kristal yapı kalitesinin artırılması gibi avantajları elde etme için kullanılır (Yang ve ark., 2016). Çalışmamızda üstün özellikleri nedeniyle sfGFP proteini hedef proteinimiz ile füzyon halde üretilmiştir.

Yeşil floresan proteinlerin (GFP) yapısı ve füzyon olarak kullanımı

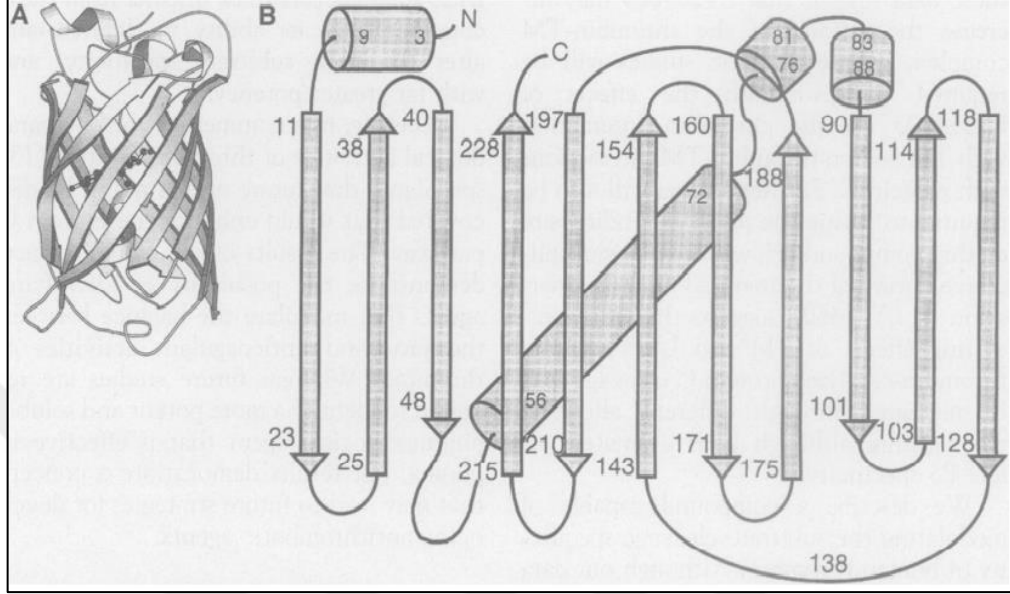
Biyoteknolojide Floresan proteinlerin tarihi GFP'nin biyoluminesan özellik gösteren *Aequorea victoria* türü denizanasından keşfi ile başlamıştır. Sonrasında GFP'lerin canlı hücrelerde farklı uygulamalarla gösterilmesi ile GFP'ler moleküler hücresel etiketlemede önemli bir araç haline gelmiştir. GFP ve farklı renklerdeki varyantların üretilmesi ile floresan proteinler canlı hücrelerin ve organizmaların görselleştirilmesinde önemli bir araç haline geldiler (Remington, 2011). Floresan proteinler; proteinlerin, nükleik asitlerin, organellerin ve organizmaların etiketlenmesinde yapısal çalışmalar için çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Diğer açılardan protein-protein etkileşimleri, biyosensörlerin geliştirilmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi gibi fonksiyonel çalışmalar, ve ilaç taramaları floresan proteinler yardımıyla yapılabilir (Dixit ve Cry, 2003). Floresan proteinlerin farklı versiyonlarının geliştirilmesi için yapılan çalışmalar ve floresan proteinlerin yeni versiyonlarının üretimi üzerine yapılan mutajenez çalışmaları ile bu proteinlerin parlaklık, fotostabilite, olgunlaşma hızı, oligomerizasyon ve füzyon etiketlemedeki performans gibi özellikleri iyileştirilmiştir (Baird ve ark, 2000). sfGFP proteini de bu şekilde geliştirilen floresan proteinlerinden biridir. sfGFP zayıf katlanan peptitlere füzyon ortağı yapıldığında bile hızla katlanmasına ve matür forma geçmesine olanak sağlayan bir dizi mutasyon taşımaktadır (Pédélec ve ark., 2006).

```
1   MSKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVR GEGEGDATNG KLTLCFCTT GKLPVPWPTL VTTLTYGVQC
71   FSRYPDHMKR HDEFFKSAMPE GYVQERTISF KDDGTYKTRA EVKFEGDTLV NRIELKGIDF KEDGNILGHK
141  LEYNFNShNV YITADKQKNG IKANFKIRHN VEDGSVQLAD HYQQNTPIGD GPVLLPDNHY LSTQSVLSKD
211  PNEKRDHMLV LEFVTAAGIT HGMDLYK
```

Şekil 2.4 sfGFP proteinin amino asit dizisi (Sistein aminoasitleri mavi renk ile işaretlenmiştir)

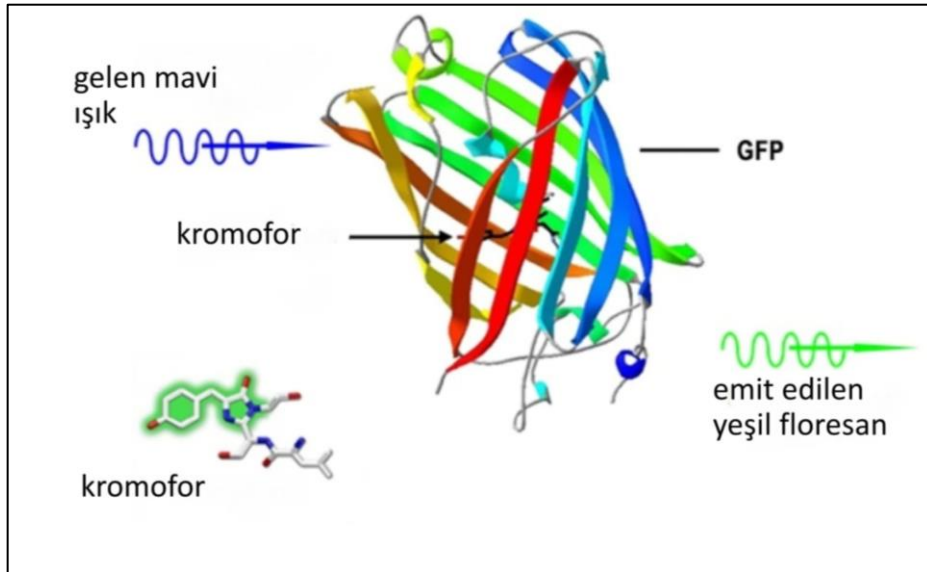
FP'ler polipeptid dizileri içinde üç amino asit dizisinden oluşan kromofor yapısına sahiptir. Kromofor yapısına bağlı olarak her floresan protein, bir uyarma ve emisyon dalga boyuna sahiptir. Farklı dalga boylarında floresan ışık yayan bu proteinler doğal olarak farklı renklerde gözükmektedirler. Yeşil Floresan Protein mavi ve ultraviyole (395 – 475 nm) arasındaki ışıpta parlak yeşil floresan sergileyen bir proteindir. İlk olarak Kuzeydoğu Pasifik denizanası *Aequorea victoria*'dan izole edilen bu protein 238 amino asitten oluşmaktadır (Ormö ve ark., 1996). GFP proteini üç boyutlu protein yapısının oluşmasında disülfid bağlarını oluşturarak önemli etkileri bulunan 2 adet sistein amino asiti içermektedir (Şekil, 2.4). Yabanıl tipi stabil ve proteaz - dirençli formdadır ve sıkıca örülmüş beta formundadır. GFP, onbir tane β -levha ve bir β -yaprak yapısına sahip beta fiçı yapısındadır, buna merkezden geçen kovalent bağlı kromoforu 4-(p-hydroxybenzylidene)imidazolidin-5-one (HBI) içeren alfa helix yapısı eşlik eder (Yang ve ark., 1996). Beta yapısı silindirik formdadır ve 42Å uzunlukta boya ve 24Å genişlikte ene sahiptir (Brejc ve ark., 1997) (Şekil 2.5). HBI, Ser65–Tyr66–Gly67 tripeptit yapısının kendiliğinden modifiye olmuş halidir. GFP iskelesi doğru şekilde katlanmadığında floresan değildir ve yabanıl GFP'de iyonize olmamış fenol yapısında bulunur (Bokman ve Ward, 1982). İç kısma bakan yan zincirler Ser65–Tyr66–Gly67'de HBI'nın fenolat formuna iyonizasyonunu ve kromofor oluşumunu indükleyen spesifik siklizasyon reaksiyonlarını indükler. Bu post-translasyonel modifikasyonlar proteinin olgun forma geçmesini sağlar (Pouwels ve ark., 2008). Oto-siklizasyon ile kromofor oluşumu herhangi bir kofaktör veya enzime ihtiyaç duyulmadan gerçekleşir, bu hücrel olayda sadece moleküler oksijen gereksinimi duyulmaktadır (Brejc ve ark., 1997). Dışarıdan mavi dalga

boylarında gelen ışık, kromofor bölgesinden yeşil floresan ışık olarak emit edilmektedir (Şekil 2.6)



Şekil 2.5 GFP proteininin üç boyutlu yapısı (Ormö ve ark., 1996)

A) MOLSCRIPT programı kullanılarak üretilen GFP proteininin üç boyutlu yapısının şematik gösterimi. Kromofor, top ve çubuk modeli ile gösterilmiştir. B) GFP'nin genel katlanmasının şematik gösterimi. Yaklaşık amino asit sayıları ikincil yapı elemanlarının başlangıç ve bitimini göstermektedir. Silindirik gösterim α -heliks yapılarını, şerit gösterimleri ise β -kırmalı yapıları ifade etmektedir.



Şekil 2.6 GFP proteini üç boyutlu yapısının ve kromoforun şematik gösterimi (Anonim, 2022)

Floresan proteinler hedef proteinlerin etiketlenmesinde ve lokalizasyonunda kullanılmaktadırlar (Tsien, 1998). GFP genini, çalışılan yerel organizmanın hedef proteinin geniyle birleştirmek, proteinin boyutunu ve moleküler kütlesini önemli ölçüde artırabilir ve proteinin doğal işlevini bozabilir veya hücre içindeki yerini veya taşıma yörüngesini değiştirebilir (Goodman, 2008). *E.coli*'de ise, GFP'ler hedef proteinler ile birlikte ekspres edildiklerinde bazı durumlarda yanlış katlama tespit edilmiştir, ancak sonradan geliştirilen GFP versiyonlarının etiketleme için daha uygun olabileceği saptanmıştır. Bununla birlikte füzyon proteinler, floresan proteinin katlanma verimini ve floresansını düşürebilirler (Nakayama ve Ohara, 2003). Yine sonradan geliştirilen sfGFP düşük düzeyde katlanan peptitlerle bile füzyon halde üretildiğinde güçlü şekilde katlanma sağladığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Pédalacq ve ark., 2006).

2.3.2. Moleküler şaperonlar (Hsp'ler)

Isı şoku proteinleri (heat shock proteins, HSP'ler) stres koşullarına maruz kalındığında hücrel yanıt olarak yoğun olarak sentezlenen proteinlerdir. İlk defa ısı şokuna verilen yanıtla ilişkilendirilerek tespit edildiği için bu ad verilmiştir (Ritossa, 1962), ancak farklı stres koşullarında da sentezlendiği bilinmektedir. HSP'ler bakteriden insana kadar hemen her organizmada üretilmektedir. Isı şoku proteinleri moleküler ağırlıklarına göre adlandırılmıştır. Hsp40, Hsp60, Hsp70 ve Hsp90, sırasıyla 60, 70 ve 90 kD ağırlıklarına göre isimlendirilmiştir. 30 kD altında ağırlığa sahip küçük Hsp'lerin (sHsp) sadece ısı şokunda değil bundan bağımsız olarak memelilerin ve bazı düşük yapıli omurgalılarda embriyonik ve genç dönemde ekspres edildikleri rapor edilmiştir (Marvin ve ark., 2008). Çoğu ısı şoku proteini diğer proteinlerin şaperonu olarak işlev görür. Hsp'ler uygun protein konformasyonunun oluşturulması ve istenmeyen agregasyonun önlenmesine yardımcı olunması gibi görevleri yerine getirirler (Saibil, 2013). Hsp'ler kısmî katlanmış proteinlerin stabilizasyonuna yardımcı olurlar. Bazı Hsp'ler, yukarıda sayılan bu önemli vazifeleri nedeniyle hemen her organizmada farklı seviyelerde ekspres edilirler (Borges ve Ramos, 2005).

Tek bir peptit olarak sentezlenen proteinlerin fonksiyonel olmaları için üç boyutlu yapılarına “doğru katlanma” ile ulaşmaları gerekir. Kısa amino asit zincirinden oluşan peptitler kendiliğinden katlanabilmelerine rağmen büyük yapıli ve kompleks proteinler doğru katlanma için bir takım hücrel sistem ve yapılara ihtiyaç duymaktadırlar (Tutar

ve Tutar, 2011). Bu sistemdeki aksaklıklardan dolayı yanlış katlanma gibi olumsuz durumlar ortaya çıkabilmekte ve yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi agregasyona sebep olup organizmada dejereneratif bir takım hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (Ciocca ve Calderwood, 2005). Hücresinin olağan canlılığını devam ettirmesi için üretilen proteinlerin takibi ve kalite kontrolü olmazsa olmazlarındandır. Bu noktada çeşitli ailelerden oluşan multi-domen proteinler olan şaperonların düzenleyici rollerine gereksinim bulunmaktadır. Normal hücresel yaşamda moleküler şaperonlar sentezlenen proteinlerin nihai üç boyutlu yapılarına ulaşmalarına yardımcı olarak protein kalite kontrol mekanizmasının tam ortasında görev alırlar (Balchin ve ark., 2016).

Şaperonlar IB gibi katlanmamış proteinleri yeniden katlayabilirler. Rekombinat proteinlerin yüksek düzeyde üretilmesiyle moleküler kalabalık yaşanan sitozol ortamı şaperonların aktivitesi açısından doygunluğa ulaşmış ve kalite kontrol yeterince yapılamıyor olabilir (Hartl ve Hayer-Hartl, 2002). Bu problemin çözümü için indüklemekten belli müddet sonra santrifüj yardımıyla besiyeri ortamı yenisiyle değiştirilerek şaperonların aktivitesine devam etmesi sağlanarak yeni sentezlenmiş proteinlerin doğru katlanmasına imkan verilmiş olur (De Marco ve de Marco, 2004). İB'lerin oluşmasının engellenmesi için tek ya da set halindeki moleküler şaperonların hedef protein ile birlikte ko-ekspresyonunun yapılması yoluna başvurulabilir (Nishihara ve ark., 2000; De Marco ve ark., 2007).

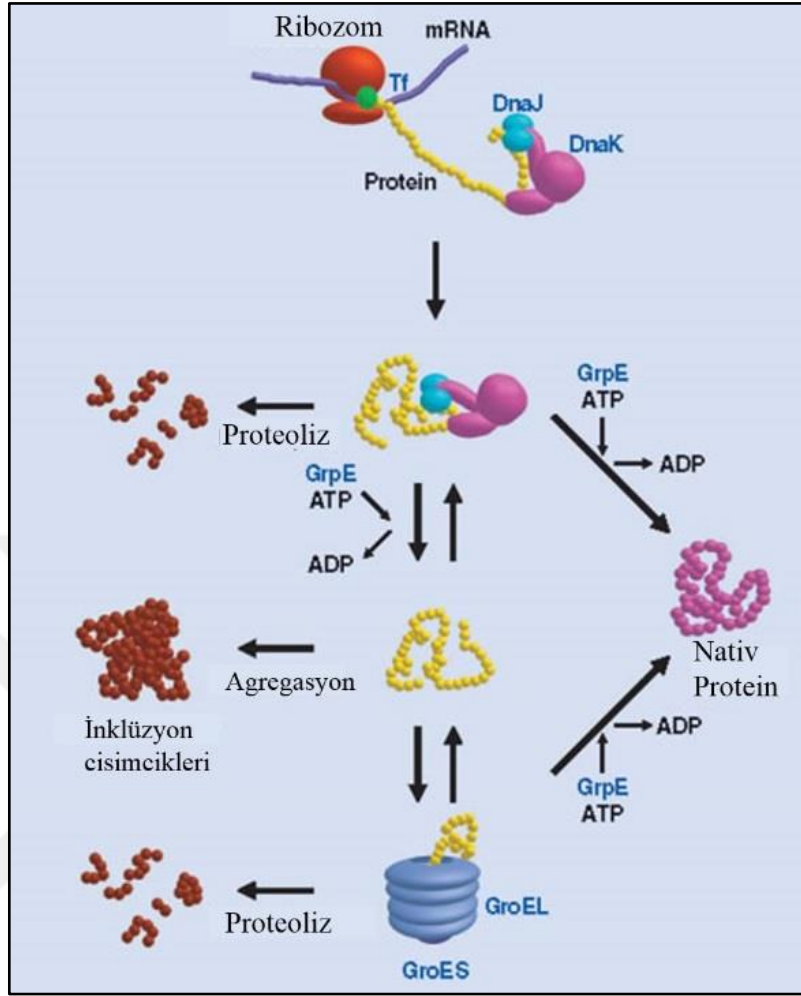
Hsp domeninde bulunan şaperonların farklı özellik ve görevleri vardır. Hsp60, Hsp70, Hsp90 ve Hsp100 şaperon aileleri ATP-bağımlı şaperon proteinlerdir (Goloubinoff ve ark., 1989b, Miller ve Fort, 2018). Bu allosterik hücresel makineler yanlış katlanmış peptitleri yeniden katlama ve agregasyona uğramış proteinleri de-agregasyon yapmak için ATP hidrolizine ihtiyaç duyarlar (Clare ve ark. 2009). Farklı doku ve organlarda diğerlerine nazaran çok daha fazla sentezlenen Hsp70 ailesi aynı zamanda üzerinde en fazla araştırma yapılan gruptur. Hsp70 şaperonunun uzatılmış peptit zincirlerinin açılması, ayrıştırılması ve stabilizasyonu ile organel zarları boyunca translokasyon, katlanma, regülasyonu, ısı şoku tepkisi, degrade edilecek substratların hedeflenmesi gibi görevleri vardır (Saibil, 2013). Şaperonlar olarak da adlandırılan Hsp60 ailesi katlanma ve agregasyonun engellenmesi görevlerini yerine getirir (Young, 2010). Hsp90 ailesi hücre sinyalleşmesinde görev alır; steroid reseptörlerinin ve protein kinazların

bağlanması, stabilizasyonu ve olgunlaşması ve yıkılacak proteinlerin proteazlara götürülmesi gibi görevleri yaparlar (Li ve ark., 2012). Hsp100 ailesi ise proteinlerin yeniden katlanması, proteolizi, termotoleransı ve agregatların çözünür forma dönüştürülmesi ile yeniden modelleme gibi görevlerde bulunurlar (Weber-Ban ve ark., 1999).

Çizelge 2.2 Isı Şoku Proteinleri ve *E. coli*'deki homologları.

Isı Şoku Proteinleri	<i>E. coli</i> 'deki Homologu
Hsp70	DnaK
Hsp40	DnaJ
Hsp110	GrpE
Hsp10	GroES
Hsp60	GroEL

E. coli organizmasında Hsp vazifelerini yapan proteinler organizmanın kendi sisteminde mevcuttur, diğer bir deyişle Hsp ailelerinin *E. coli*'de homologları vardır. *E. coli*'de tanımlanan DnaK, Hsp70'in homologudur. Hsp70 ve Hsp40 birbirinin koşaperonu şeklinde çalışmaktadır (Çizelge 2.2). GrpE ise DnaK'nın kofaktörü olarak işlev görmektedir (Kampinga ve Craig, 2010). Nükleotid değişim faktörü GrpE, DnaK'nın ATPase döngüsünü uyarır. DnaJ, J domeninin N-terminali aracılığıyla ATP'ye bağlı DnaK'ye bağlanarak ATP'nin hidrolizini hızlandırır. DnaJ proteininin C-terminali, substrat proteinine bağlanır ve DnaK böylece substratına bağlanır (Hartl ve Hayer-Hartl, 2002). Koşaperonlar olmadan hücrenin içsel ATP hidroliz hızı çok yavaştır, DnaK'nın ATPase döngüsü hızlandırılmış olur. *E. coli*'de bulunan GroEL ve GroES şaperonları da koşaperon olarak çalışmaktadır (Şekil 2.7). Bu moleküller sırasıyla şaperonin olarak adlandırılan Hsp60 ve Hsp10 şaperon ailelerinin homologlarıdır (Saibil ve ark., 2013). Şaperoninler silindirik şekilli GroEL ile kompleks oluşturan daha küçük yapıları GroES müstakil makinelerdir ve oluşturdıkları kompleks protein katlanması için tam bir izolasyon odası sağlar (Goloubinoff ve ark., 1989a). Ribozoma bağlanan protein olarak bilinen tetikleme faktörü (TF) katlanmayı uyarır, peptitleri stabilize eder, agregasyonu önler ve agra olmuş peptitlerin yeniden katlanmasını uyarır (Hoffmann ve ark., 2010).



Şekil 2.7 *E. coli*'de şaperon yardımıyla protein katlanması modeli (Thomas ve ark., 1997'den uyarlanmıştır)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Çizelge 3.1 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 Kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Markası
Agar	BD Bacto™ Agar
Agaroz	Nzytech
Akrilamid	Amresco
Ampisilin Sodium Salt	Fisher bioreagents
APS	Biorad
Benzamidin	Merck
β-Merkaptoetanol	Merck
BSA	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
MTT	Sigma
Ni-NTA rezin	Thermo Scientific
PİPES	Sigma
PMSF	Serva
Protein marker	Bio-Rad, All Blue

Protein marker	Thermo Scientific
Protein marker	Bio Basic

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

PMSF çözeltisi: 150 µg toz halde PMSF tartılarak 1 mL mutlak etanol içinde çözülür ve -20 °C’de saklanır.

Kloramfenikol Çözeltisi (34 mg/mL): 340 mg kloramfenikol hassas terazide tartılarak 10 mL mutlak etanolde çözülür ve 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek steril hale getirilir.

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 ayarlanır ve hacim 1 L’ye tamamlanır. Çözelti otoklavlanarak steril hale getirilir.

Ampisilin (100 mg/mL): 1.5 g ampisilin tartılarak 15 mL saf suda çözülür. Ardından steril 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek steril hale getirilir ve steril mikrotüplere bölünerek -20 °C’de saklanır.

Kanamisin çözeltisi (50 mg/mL): 0.5 g kanamisin hassas terazi kullanılarak tartılır ve 10 mL otoklavlanarak steril hale getirilmiş ultra saf suda çözülür. Ardından steril 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek steril hale getirilir ve steril mikrotüplere bölünerek -20 °C’de saklanır.

IPTG (1 M): 2.38 g IPTG 10 mL steril suda çözülür ve 0.22 µm’lik filtreden geçirilerek steril hale getirilir. Steril mikrotüplere bölünerek -20 °C’de saklanır.

LB Broth çözeltisi: 10 g tripton, 10 g NaCl ve 5 g maya ekstraktı saf suda çözülür ve nihai hacim 1 L’ye tamamlanır.

LB Agar: Hazırlanan 1 L’lik çözelti LB Broth çözeltisine 15 g agar ilave edilir ve otoklavlanarak steril hale getirilir.

Agaroz Elektroforez Jeli: 1 g agaroz üzerine 100 mL 1X TAE tamponu eklenir ve mikrodalga fırında tamamen eritilerek jel tablasına dökülür. 1 µL etidyum bromür DNA’yı boyamak üzere jel tankına dökülür.

3.1.4. SDS-PAGE’de kullanılan çözeltiler

Yürütme jeli tamponu: 182 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0.4) 1000 mL saf suda çözülerek pH:8.8’e ayarlanır.

Yükleme jeli tamponu: 60.5 g Tris (1.5 M), 4 g SDS (%0.4) 1000 mL saf suda çözülür ve pH:6.6’ya ayarlanır.

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 klipsler ile tutturulmuş SDS-PAGE dikey cam tablasına yüklenerek polimerleşmesi beklenir.

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 polimerize olmuş yürütme jeli üzerine ilave edilir.

Elektroforez tamponu (1X): 3 g Tris, 14.4 g glisin, 1 g SDS tartılır ve son hacim 1000 mL olacak şekilde saf su eklenerek hazırlanır.

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 saf su içerisinde çözülerek nihai hacim 1000 mL’ye ayarlanır.

SDS Jel boyama (Staining) çözeltisi: 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filtre kâğıdından geçirildikten sonra karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 mL saf su ilave edilerek nihai hacim 1000 mL’ye ayarlanır.

Destaining Çözeltisi: 100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanır.

Amonyum Persülfat (APS-%10): 0.5 g APS son hacim 5 mL olacak şekilde saf su içerisinde çözülerek hazırlanır.

3.1.5. Protein saflaştırmada kullanılan çözeltiler

Parçalama tamponu (Lysis buffer): 25 mM Tris-HCl ve 300 mM NaCl olacak şekilde tartım işlemi tamamlanıp saf suda çözülür ve pH:7.8’e ayarlanır.

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

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

3.1.6. TEV proteaz stok tamponları

1X TEV proteaz tamponu (Tampon A): 25 mM Tris-HCl ve 150 mM NaCl olacak şekilde tartılarak saf suda çözülür ve pH:8.0'e ayarlanır.

1X TEV proteaz tamponu (Tampon B): 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl ve 14 mM β -merkaptoetanol olacak şekilde saf suda çözülür ve pH:8.0'e ayarlanır.

3.1.7. Afinite kromatografisi ile protein saflaştırmada kullanılan çözeltiler

Yükleme tamponu: 2.92 g NaCl 500 mL NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (pH:8.0) çözülür.

Yıkama tamponu (25 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH:8.0): 0.85 g imidazol, 2.92 g NaCl 500 mL NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (pH:8.0) çözülür.

Elüsyon tamponu: (300 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH:8.0): 10.2 g imidazol, 2.92 g NaCl 500 mL NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (pH:8.0) çözülür.

Tris Tamponu: 12.12 g Tris tartılarak bir miktar suda çözülür. Çözelti derişik HCl ile pH:7.5'a ayarlanır. 2.92 g NaCl eklenir ve nihai hacim su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

300mM imidazol Tris-HCl Tamponu: 2.04 g imidazol 100 mL Tris/HCl tamponu içinde çözülür. Çözelti derişik HCl ile pH:7.5'a ayarlanır.

3.1.8. sfGFP-BMP2 proteininin inklüzyon cisimciklerinden eldesinde kullanılan çözeltiler

Süspansiyon Tamponu: 50mM Tris-HCl (pH:8.0), 0.1 mM DTT, 2mM PMSF distile suda çözülür ve pH:8.0'e ayarlanır.

Resüspanسیون Tamponu: 50mM Tris-HCl (pH:8.0), %2.5 triton X-100, %20 sükröz olacak şekilde distile suda çözölür ve pH:8.0'e ayarlanır.

Solubilizing (Çözdürme) Tamponu: 50mM Tris-HCl (pH:8.0) 8M üre distile suda çözölür ve pH:8.0'e ayarlanır.

Refolding (Yeniden Katlama) Tamponu: 100mM Tris-HCl, 10mM DTT, %20 gliserol distile suda çözölür ve pH:8.0'e ayarlanır.

3.1.9. sfGFP-BMP2 proteininin inklüzyon cisimciklerinden eldesi ve Ni-NTA agaroz kolon üzerinde yeniden katlanması ve saflaştırılmasında kullanılan çözeltiler

Bağlama Tamponu: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM β-merkaptöetanol bileşenlerinden oluşur ve çözelti pH:8.0'e ayarlanır.

Yıkama tamponu: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 6 M üre, 1 mM β-merkaptöetanol bileşenlerinden oluşur ve çözelti pH:8.0'e ayarlanır.

Yeniden katlama (refolding) tamponu: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM β-merkaptöetanol bileşenlerinden oluşur ve çözelti pH:8.0'e ayarlanır.

Elüsyon Tamponu: 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazol, 1 mM β-merkaptöetanol bileşenlerinden oluşur ve çözelti pH:8.0'e ayarlanır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yapılan çalışmanın özeti

Yapılan çalışmada insan kaynaklı rhBMP2'nin *E. coli* organizmasında sfGFP ile füzyon halde ifade edilerek saf olarak eldesi sonrası Saos-2 tip hücrelerde bioaktif özelliklerinin tayini amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle GenBankası veritabanlarından BMP2 proteinin kodlayan DNA dizisine ulaşılmış ve *E. coli* organizması ve pET30a plazmitine göre kodon optimizasyonu yapılmıştır. Gen ifadesi için kullanılacak pET30a DNA plazmit vektörü ve sfGFP-BMP2 nükleotit dizisi ticari firmada sentezlettirilmiş ve pET30a plazmitine klonlanmış olarak pET30a/sfGFP-BMP2 plazmit vektörü şeklinde tarafımıza ulaşmıştır. pET30a/sfGFP-BMP2 plazmiti CaCl_2 yöntemi ile *E. coli* BLR(DE3) hücrelerine transfer edilip uygun koşullarda ifadesi sağlanmıştır. Ekspresyon sonrası gerçekleştirilen parçalama ve saflaştırma işlemleri sonucunda sfGFP-BMP2 füzyon proteinin üretiminin düşük seviyede kaldığı ve büyük ölçüde IB oluşturduğu gözlemlenmiştir. Protein ekspresyon verimliliğinin arttırılması ve doğru katlanmanın sağlanması için Takara™ şaperon plazmit seti kullanılmıştır. Set içerisinde bulunan beş plazmit ile pET30a/sfGFP-BMP2 plazmiti koekspresyon yapılmış ve en yüksek verimin elde edildiği pTf16 plazmiti seçilerek sonraki çalışmalar pTf16 ile pET30a/sfGFP-BMP2 plazmitinin koekspresyonundan elde edilen sfGFP-BMP2 füzyon proteini ile devam etmiştir. Koekspresyon sonucu yüksek miktarda ve konstantrasyonda protein elde edilmiştir. Parçalama ve santrifüj işlemlerinden sonra ekspres edilmiş füzyon proteinin büyük ölçüde IB olarak pelette çöktüğü görülmüştür. Süpernatanttan çözünür formda saflaştırılan füzyon proteinin TEV proteaz enzimi ile kesimi gerçekleşmemiştir. Saflaştırma esnasında pelete çöken IB'ler alınarak yeniden katlama (refolding) işlemleri ve saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. IB'den saf olarak elde edilen sfGFP-BMP2 proteini TEV proteaz enzim kesimine tabi tutulduğunda kesim işlemi gerçekleşmiş ancak çökelti oluşması sonucu saf BMP2 protein eldesi sağlanamamıştır. Üretimden saflaştırmaya kadar her basamakta parlak yeşil floresan özelliğini devam ettiren sfGFP-BMP2 füzyon proteininde bulunan BMP2 peptidinin füzyon halde biyolojik aktivitesini gösterebileceği düşünülmüş ve Saos-2 tip memeli hücrelerinde proliferatif özelliklerinin belirlenmesi için MTT testi uygulanmıştır.

3.2.2. Biyoinformatik çalışmalar

Rekombinant olarak üretimi amaçlanan BMP2 proteini GenBank: PDB:1ES7A erişim numarasına sahip amino asit sekansına NCBI (The National Center for Biotechnology Information) veri tabanı üzerinden ulaşılmıştır. İnsan BMP2 proteini fonksiyonel halde protein dizisi 114 amino asit uzunluğunda bulunur ve moleküler büyüklüğü 26 kDa'dur. İzoelektrik noktası pI:8.17'dir. İnsan BMP2 amino asit sekansı "MQAKHKQRKR LKSSCKRHPL YVDFSDVGWN DWIVAPPGYH AFYCHGEC PF PLADHLNSTN HAIVQTLVNS VNSKIPKACC VPTELSAISM LYLDENEKVV LKNYQDMVVE GCGCR" şeklindedir. Ulaşılan amino asit dizisi "reverse translate" yapılarak elde edilen dizi *E. coli* organizmasına göre optimize edilmiştir (Şekil 3.1).

BMP2_reverse_transl	atgcaggcgaacataaacagcgcaaacgcctgaaaagcagctgcaaacgccatccgctg	60
BMP2_optimize	atgcaggcgaacataaacagcgtaaacgtctgaaatcttcttgcaaacgtcaccgcgtg	60

BMP2_reverse_transl	tatgtggatttttagcgatgtgggctggaacgattggattgtggcgccgcgggctatcat	120
BMP2_optimize	tacgttgacttctctgacgttggttgaacgactggatcgctgctccgcgggtaccac	120
	** * * * *	
BMP2_reverse_transl	gcgttttattgcccgaatgcccggttcccgctggcggtatcatctgaacagcaccaac	180
BMP2_optimize	gctttctactgccacggtgaatgcccggttcccgctggctgaccacctgaactctaccaac	180
	** * * * *	
BMP2_reverse_transl	catgcgattgtgcagaccctggtgaacagcgtaaacgcaaaattccgaaagcgtgctgc	240
BMP2_optimize	cacgctatcggtcagaccctggttaactctgttaactctaaaatccgaaagcgtgctgc	240
	** * * * *	
BMP2_reverse_transl	gtgcgacgcaactgagcgcgattagcatgctgtatctggatgaaaacgaaaagtgtg	300
BMP2_optimize	gttcgacgcaactgtctgtatctctatgctgtacctggacgaaaacgaaaagtgtt	300
	** * * * *	
BMP2_reverse_transl	ctgaaaaactatcaggatattggtggtggaaggctgcggctgccgc	345
BMP2_optimize	ctgaaaaactaccaggacatggtgttgaagggtgcgggtgccgc	345

Şekil 3.1 Referans alınan ve optimize edilen BMP2 DNA dizileri karşılaştırması

BMP2 peptitinden ters okuma ile elde edilen DNA dizisi *E. coli* organizmasına göre optimizasyon sonucu elde edilen DNA dizisi karşılaştırılmıştır (Anonim, 2020).

E. coli organizmasına göre kodon optimizasyonu

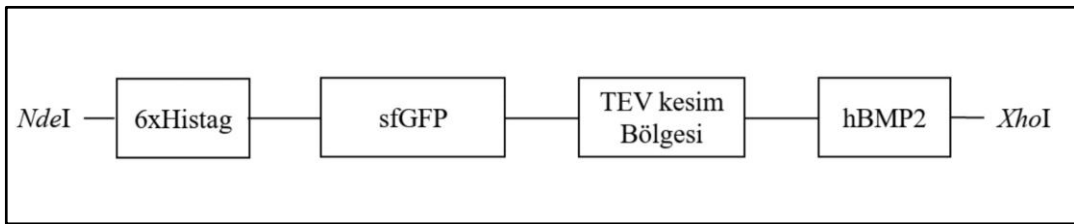
İnsan BMP2 geninin *E. coli* organizmasında yüksek seviyede ekspresyonu için hedef genin öncelikle bu organizmaya göre optimizasyonunun yapılması gerekmektedir. Kodon optimizasyonu için (Jcat - The Codon Adaptation Tool vs.) gibi çevrimiçi platformlar kullanılmıştır. Bu veri tabanları bir peptite ait gen sekansının prokaryotik ya da ökaryotik

konukçu hücrelerde yüksek verimlilikle üretimi için uygun DNA sekans dizisinin elde edilmesinde fayda sağlamaktadır.

pET30a plazmit vektörüne göre kodon optimizasyonu

Kodon optimizasyonu gerçekleştirilen BMP2 proteinini kodlayan gen bölgesinin pET30a plazmitine klonlanması hedeflenmiştir (Şekil 3.4). Bunun için vektör sistemine ait çoklu klonlama bölgesinde bulunan restriksiyon enzimlerinden kasette yer alacak DNA dizisini iç bölgesinden kesmeyen uygun olan iki tanesi seçilmiştir. Böylece dizinin amino ucuna *NdeI* restriksiyon enzim kesim bölgesi ve karboksi ucuna *XhoI* kesim bölgesi eklenmiştir (Şekil 3.3).

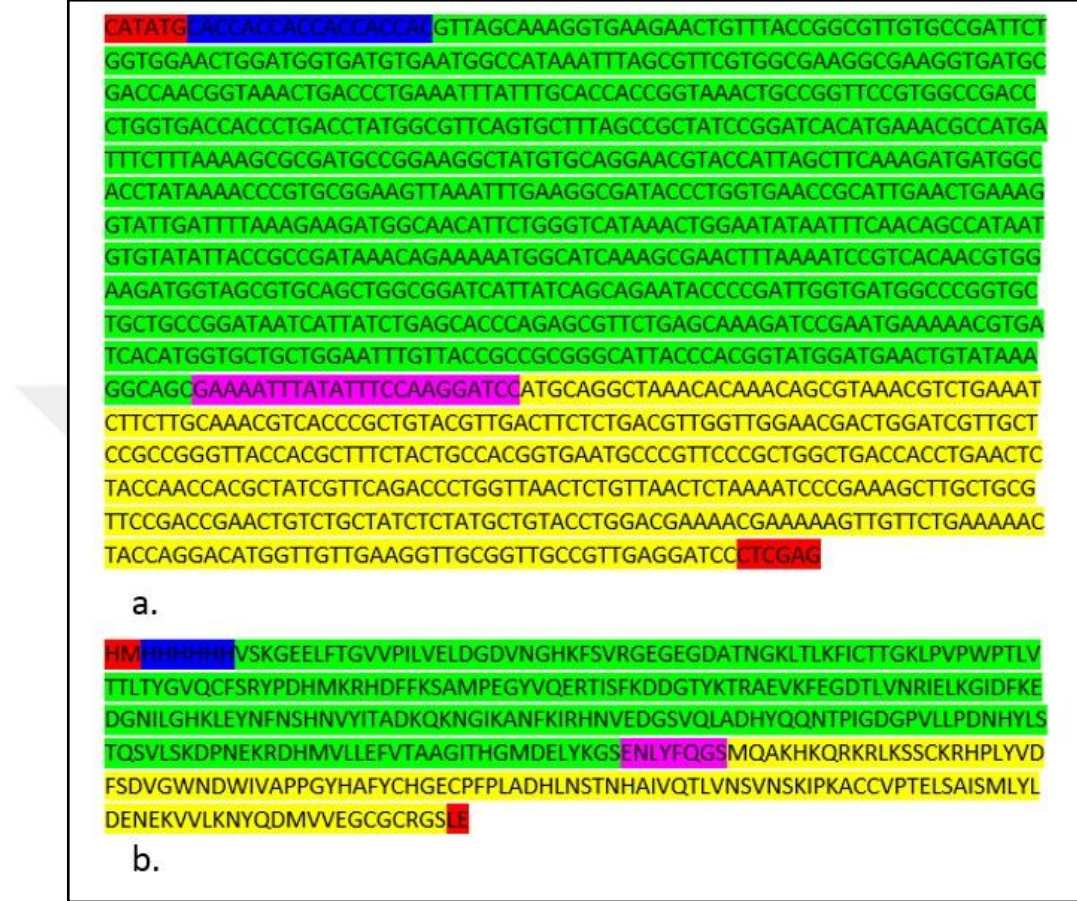
Sonuç olarak pET30a DNA plazmitine klonlanacak DNA dizisi sırasıyla: Ni-NTA agaroz saflaştırma afinite kromatografisi ile saflaştırmada kullanılmak üzere baş kısımda 6xHisTag kodlayan DNA dizisi, BMP2 proteinini kodlayan DNA dizisi, TEV enzimi amino asit kesim bölgesini kodlayan DNA dizisi ve son kısımda sfGFP proteinini kodlayan DNA dizisi olacak şekilde dizayn edilmiştir. Yine ilgili gen kasetinin ifade yönünde baş kısmında *NdeI* ve son kısmında *XhoI* restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini kodlayan diziler bulunmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 pET30a DNA plazmitine klonlanması planlanan gen kaseti

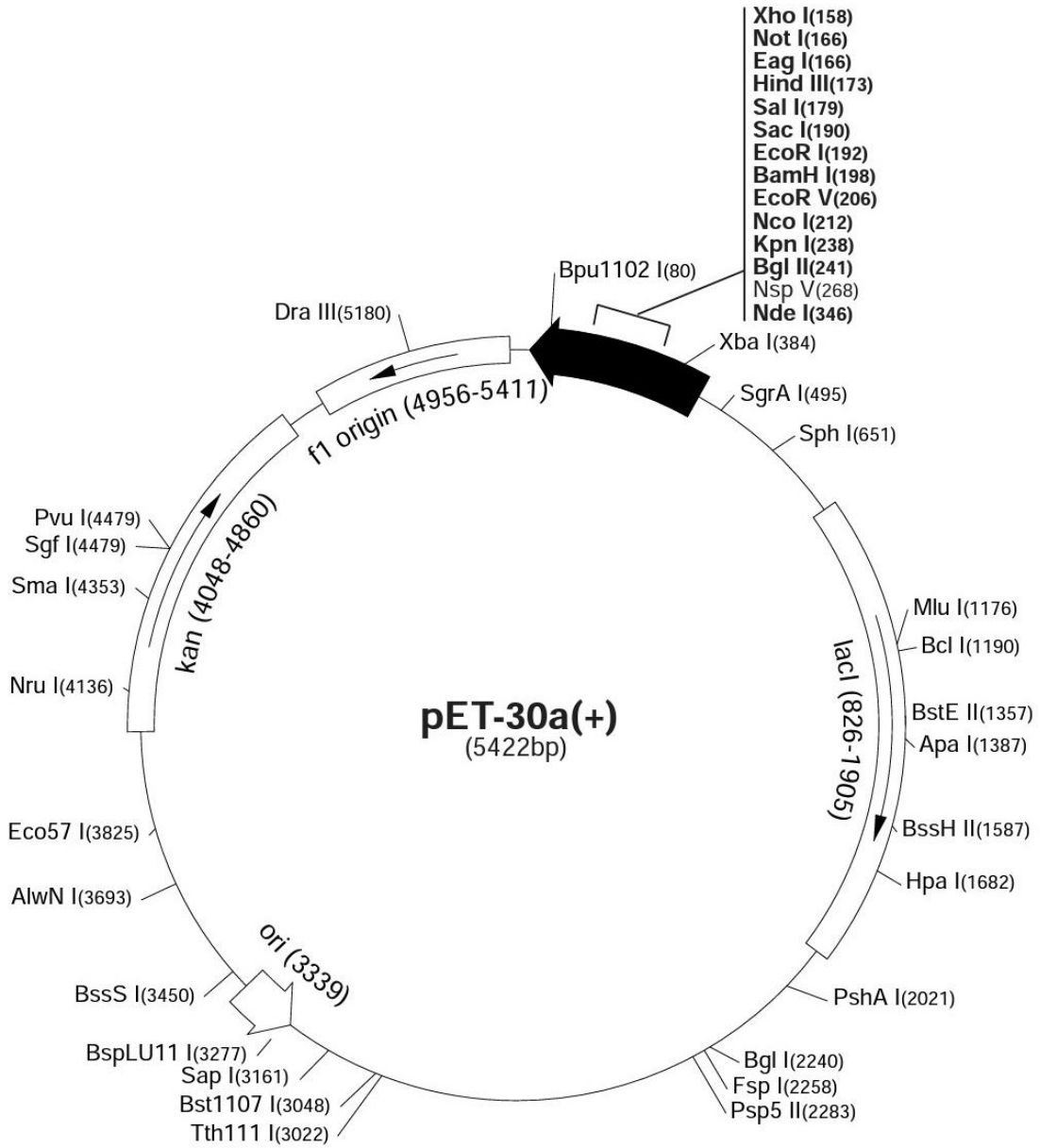
Gen kaseti ekspresyon yönünde metiyonin amino asitini kodlayan “-ATG-” dizisi ile başlamaktadır. sfGFP proteinini kodlayan DNA gen dizisinde orijinal dizinin sonundaki stop kodon silinmiş, ENLYFQGS amino asit dizisine sahip TEV proteaz enzimi kesim bölgesini kodlayan DNA dizisini takiben BMP2 gen dizisi sonunda “stop kodon” olacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu tasarım sayesinde protein ifadesinden sonra yapılacak Ni-NTA afinite kromatografisinde gen kasetinde kodlanan amino asit dizisinin tek bir peptit halinde eldesi amaçlanmıştır. TEV proteaz kesiminden sonra yapılacak ikinci Ni-NTA

afinite kromotografisinde ise 6xHis-Tag bağlı sfGFP'nin kolona bağlanması ve serbest kalan BMP2 proteininin kolona bağlanmaksızın kolon altında toplanması hedeflenmiştir.



Şekil 3.3 pET30a'ya klonlanan gen kasetinin (a.) nükleotit ve (b.) amino asit dizileri.

Kırmızı: restriksiyon enzim kesim bölgeleri; Mor: TEV proteaz kesim bölgeleri; Yeşil: sfGFP için DNA ve amino asit dizileri; Sarı: BMP2 için DNA ve amino asit dizileri; Mavi: 6xHisTag bölgesi.



Şekil 3.4 pET30a DNA plazmitine ait gen haritası (Novagene)

3.2.3. Kompetent hücre hazırlanması

-80°C’de stoklanmış olan BL21(DE3) pLysE hücreleri LB petrilerine ekilip 37°C’de 16 saat inkübasyona tabi tutuldu. 16 saatlik inkübasyon sonunda petriden tek koloni alınarak; içinde 25 mL SOB bulunan 250 mL’lik erlene inoküle edildi ve 250 rpm ve 37°C’de 6 saat inkübe edildi. 6 saatin sonunda kültür için, içinde 250 mL SOB bulunan 3 tane erlen hazırlandı ve 25 mL’lik BL21(DE3) kültüründen erlenlere sırasıyla 10 mL, 4 mL ve 2 mL inoküle edildi. Hazırlanan erlenler 18 - 22 °C aralığında 14 saat boyunca çalkalayıcılı

inkübatörde 150 rpm’de inkübasyona bırakıldı. Kültürlerin 45 dakikada bir OD₆₀₀ değerleri ölçülerek bu değer 0.55’e ulaştığında erlenler inkübatörden alındı ve 10 dakika buzlu su banyosunda bekletildi. Sonrasında hücreler +4°C’de 2500 g (3900 rpm)’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve kalan besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. Hücrelere 0 °C deki 80 mL PİPES’li tampon ilave edildi ve hücreler, +4 °C 2500 g (3900 rpm)’de 10 dakika santrifüjlendi. Tüp içerisinden tampon çözelti tamamen uzaklaştırıldı ve hücrelere 0°C’de 20 mL PİPES’li tampon ilave edildi. Tüp hafifçe sallanılarak hücreler yeniden süspansiyon hale getirildi. Süspansiyon üzerine 1.5 mL DMSO eklenir ve hafifçe karıştırıldı. Buz banyosunda 10 dakika bekletilen hücreler steril mikro tüplere bölündü ve -80°C’de saklandı (Inoue ve ark. 1990).

3.2.4. pET30a/sfGFP-BMP2 plazmit vektörünün *E. coli* BL21(DE3) pLysE’ye transformasyonu

Buz banyosunda bulunan *E. coli* BL21(DE3) pLysE kompetent hücrelerden 200 µL’lik kısımlar alındı. Gerekli sayıda mikrotüpe pipetleme yapıldı. Üzerine 5 µL DNA plazmit eklendi ve karıştırılarak 60 dk buz banyosunda gömülerek beklendi. Bekleme sonrasında 2 dakika 42 °C’de ısı şokuna maruz bırakıldı ve tekrar buza gömülerek 5 dakika bekletildi. Üzerine 200 µL LB besi yeri eklenerek 37°C ve 240 rpm’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. 30 dakika sonunda her bir mikrotüp bir 50 µg/mL kanamisin içeren LB petrilere drigalski spatülü ile yayıldı ve 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı (Hanahan, 1985).

3.2.5. sfGFP-BMP2’nin *E. coli* BL21(DE3) pLysE’de ifadesi

Kanamisin antibiyotikli ortamda büyüyen koloniler pozitif olarak kabul edilerek seçildi. Transforme *E.coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri uygun antibiyotik içeren sıvı besiyerinde 37°C’de inkübe edildi, hücrelerin yoğunluğu spektrofotometrik analiz ile takip edildi. Optik yoğunluk OD₆₀₀ ~0,7 değerine ulaşıncaya besiyeri ortamı içerisinde son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilerek sfGFP-BMP2 ekspresyonu için indüklemeye işlemi gerçekleştirildi. 3 ila 4 saat arası inkübasyonun ardından erlenlerdeki hücreler santrifüj kaplarında toplanarak saflaştırılmak üzere toplandı ve -20 °C’de saklandı.

3.2.6. *E. coli* hücrelerinin parçalanması ve sfGFP-BMP2'nin afinite kromatografisi ile saflaştırılması

-20°C'de saklanan hücreler fosfat parçalama tamponu ile süspanse edildikten sonra içerisine parçalama işlemi için lizozim ve proteaz aktivitesinin önlenmesi için 50 µl PMSF çözeltisi 50 µl µM/mL benzamidin-HCl ilave edildi. Buzlu su banyosuna alınan hücreler 9cycle, % 100 güç ile 60 dk sonikatör kullanılarak parçalandı. Parçalama sonucu alınan çözelti santrifüj ile kaba hücre kalıntılarından arındırıldı. Buradan alınan süpernatant 30.000 rpm +4°C'de 30 dk santrifüj edildi. Hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürüldü. Santrifüj sonrasında alınan süpernetant nikel bazlı (Ni-NTA agaroz) afinite kolonundan geçirildi. Sonrasında kolon 10 mL parçalama tamponu ile yıkanarak kolona tutunamayan proteinler uzaklaştırıldı. Sonrasında nikel bazlı kolona kısmi tutunan histidin yönünden zengin proteinleri elimine ederek istenmeyen bant oluşumunu engellemek için, kolon düşük konstantrasyonda imidazol içeren 5 mL yıkama tamponu ile yıkandı. Bu işlem için yüksek miktarda yıkama tamponu kullanmak 6xHis- ile etiketlenmiş füzyon proteinimizin kaybına sebep olacaktır. Bu işlemler sırasında hedef protein kolona tutunmuş halde bulunmaktaydı. Son olarak yüksek konsantrasyonda imidazol içeren elüsyon tamponu ile hedef protein kolondan indirildi. Kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplandı.

3.2.7. sfGFP-BMP2'nin şaperon plazmit sistemi ile koekspresyonu

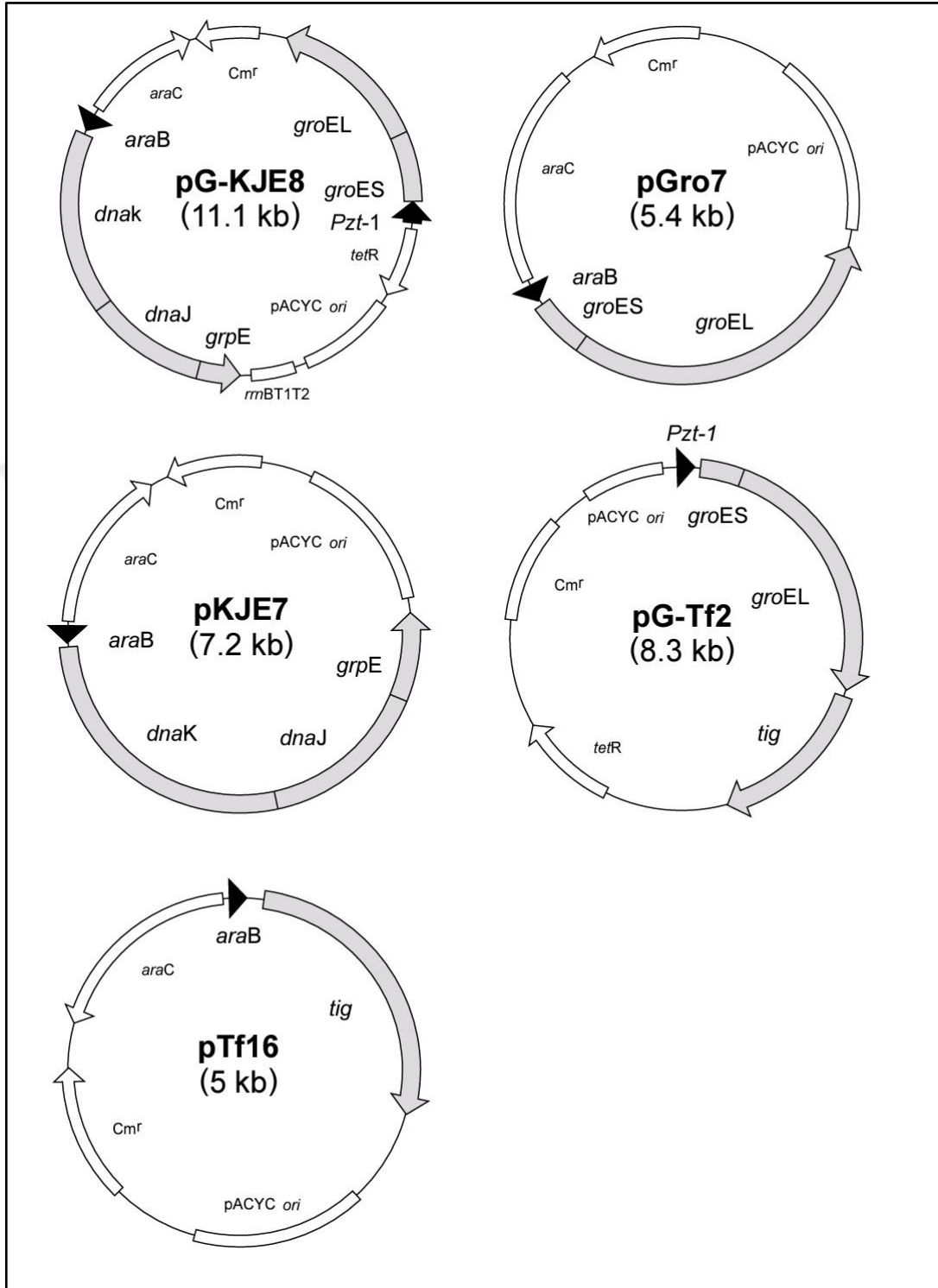
Takara Bio's Şaperon Plazmit Kiti içerisinde beş adet plazmit bulunmaktadır (Şekil 3.5). Bu plazmitler setler halinde *dnaK*, *-dnaJ*, *grpE*, *groES*-*groEL* ve tetikleme faktörü (tig) şaperonlarını kodlayan gen bölgeleri içermektedir. Farklı plazmitlerde farklı şaperon setlerini kodlayan gen bölgeleri bulunmaktadır. pG-KJE8 plazmitinde hem *dnaK*, *-dnaJ*, *grpE* ve hem *groES*-*groEL* komplekslerini kodlayan gen bölgeleri bulunmakta ve her iki gen bölgesi farklı promotora sahip olduğu için farklı indükleyici ajanlar ile uyarılmaktadır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Plazmit seti içerisinde bulunan şaperon plazmitler

No	Plazmit	Şaperon	Promotor	İndükleyici	Direnç markörü
1	pG-KJE8	<i>dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL</i>	araB Pzt1	Tetracycline L-Arabinose	Cm
2	pGro7	<i>groES-groEL</i>	araB	L-Arabinose	Cm
3	pKJE7	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i>	araB	L-Arabinose	Cm
4	pG-Tf2	<i>groES-groEL-tig</i>	Pzt1	Tetracycline	Cm
5	pTf16	<i>tig</i>	araB	L-Arabinose	Cm

Plazmitler ve kodladığı şaperon proteinler, promotorları ve indükleyici ajanları. Plazmitler kloramfenikol antibiyotik direnç geni taşımaktadırlar (Cm: Kloramfenikol).

Sette kullanılan plazmitler etkili bir ekspresyon sağlanması için koekspresyon yapılırken koordineli şekilde çalışan şaperonlar farklı kombinasyonlarda birlikte ekspresyon edilecek şekilde tasarlanmıştır. Bu sayede çalışılan hedef proteinlerin şaperonlar yardımıyla çözünür formda kalması amaçlanmıştır. Plazmitler birer pACYC replikasyon orijinine ve kloramfenikol (Cm^r) direnç genine sahiptir (Çizelge: 3.3), bu özellik hedef protein için ampisilin direnç geni taşıyan ColE-1 tip plazmitlerinin kullanılabilmesini sağlamaktadır. Plazmitler araB ve Pzt-1 (tet) tip promotor taşımaktadır. Bu da *lac* tipi promotorların kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Sistem plazmitleri aynı promotor ve direnç özellikli ekspresyon plazmitleri ile çalışılmamalı ve kloramfenikol-dirençli *E. coli* organizmaları konakçı olarak kullanılmamalıdır.



Şekil 3.5 Takara™ Şaperon Plazmit Kitine ait plazmitler

Şaperonlar, proteinlerin ribozomlarca sentezlenmesinden sonra erken katlanmalarını engelleme, doğru katlanmayı sağlama ve yanlış katlanmış proteinleri düzeltilmesi gibi işlemlerde rol alırlar. Çalışmamızda kullandığımız Takara™ plazmit kitinde farklı

şaperon proteinlerini kodlayan pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 ve pTf16 (Çizelge: 3.3) bulunmaktadır. İlk basamak olarak plazmitler 1 µl olacak şekilde öncesinde kompetent hale getirilmiş *E. coli* BL21-AI hücrelerine ayrı ayrı CaCl₂ yöntemi ile transforme edildi ve sonrasında 20 µg/mL kanamisin içeren LB petrilere yayılımı yapıldı. 37°C’de gece boyu inkübasyon sonrası transformasyon sonucu pozitif koloniler kendi antibiyotik dirençlerine göre (kloramfenikol) seçildi ve alınan tek kolonilerden ayrı ayrı büyütülen kültürler tekrar kompetant hale getirildi. İşlem sonunda pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 ve pTf16 plazmitlerini taşıyan *E. coli* BL21-AI hücreleri kompetant hale getirilmiş oldu. Sonrasında bu kompetent hücrelere pET30a/sfGFP-BMP2 plazmiti CaCl₂ transformasyon yöntemi ile transforme edilerek 20 µg/mL kloramfenikol ve 50 µg/mL kanamisin içeren LB petrilere yayılımı yapıldı. 37°C’de gece boyu büyüme sonrası pozitif koloniler seçildi.

20 µg/mL kloramfenikol ve 50 µg/mL kanamisin içeren 5 mL LB sıvı besiyerinde çalkalayıcı inkübatör yardımıyla 37°C’de gece boyu büyütülen başlatıcı kültürlerden 1/100 (v/v) oranında alındı. 20 µg/mL kloramfenikol ve 50 µg/mL kanamisin içeren 50 mL sıvı LB bulunan erlenlere inokülasyon işlemi yapıldı. Hedef protein ekspresyonu başladığında *E. coli* hücrelerinde şaperonların hazır olması için şaperon plazmitlerinin indükleyici ajanları, son konsantrasyonlar L-arabinoz için 0.5 mg/mL ve tetrasiklin için 5 ng/mL olacak şekilde IPTG ile hedef proteinin indüklenmesinden 30 dakika önce besi ortamına ilave edildi. pGro7, pKJE7 ve pTf16 plazmitleri için sadece L-arabinoz; pG-KJE8 için hem L-arabinoz hem tetrasiklin; pG-Tf2 için sadece tetrasiklin kullanıldı. Koekspresyon başlaması için şaperon üretiminin OD₆₀₀ ~0,6 değerine ulaşıncaya besiyer ortamı içerisinde son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde IPTG ilave edilerek sfGFP-BMP2 ekspresyonu için indükleme işlemi gerçekleştirildi. 3-4 saat inkübasyonun ardından erlenlerdeki hücreler santrifüj kaplarında toplanarak saflaştırılmak üzere santrifüj yardımıyla pellet hale getirilip toplandı.

3.2.8. sfGFP-BMP2 füzyon proteininden BMP2 peptidinin TEV proteaz kesimi ile çıkarılması

TEV protease (Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase) Tobacco Etch Virus (TEV)’den üretilen yüksek oranda sekans-spesifik sistein proteazdır. Füzyon proteinlerin kesilmesinde sıklıkla tercih edilir. Bu enzim ENLYFQ\S amino asit

dizisinden optimal verimle kesmektedir. TEV proteaz enzimi 14 mM merkaptotanol, 25 mM Tris ve 150 mM NaCl (pH:8) konsantrasyonuna sahip tampon çözeltisi içerisinde optimum verimle çalışmaktadır.

TEV proteaz enzim kesimine geçilmeden evvel saflaştırılmış TEV Proteaz proteini ve sfGFP-BMP2 füzyon proteini içerisinde bulundukları elüsyon tamponundan arındırılmak için, TEV tamponu ile gece boyu diyalize bırakılarak değişimi sağlandı. Sonrasında kesim işlemine geçildi. Enzim kesim koşulları Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 TEV proteaz kesimi için oluşturulan reaksiyon koşulları

Bileşenler	Kullanılan hacim
TEV Enzim (0.5 µg/mL)	25 µL
Protein (sfGFP-BMP2) (2µg/mL)	50 µL
Tampon	125 µL
Toplam hacim	200 µL

Enzimin konsantrasyonu düşük olduğu için kullanılan miktar yüksek tutulmuştur.

3.2.9. Protein yeniden katlanması (refolding)

sfGFP-BMP2 proteininin IB’lerden yeniden kazanımı ve saf olarak eldesi için iki farklı yeniden katlama yöntemi kullanılmıştır.

1. Yöntem: Bu yöntemle sfGFP-BMP2 proteini IB’lerden yeniden katlanma ve sonrasında Ni-NTA agaroz kolon yardımıyla saflaştırılarak yeniden kazanılmıştır (Melissis ve ark. 2010).

2. Yöntem: Bu yöntemle sfGFP-BMP2 proteini IB’lerden matriks destekli olarak Ni-NTA agaroz kolon üzerinde yeniden katlanma işlemi ve saflaştırma ile yeniden kazanılmıştır (Anonim, 2007).

1. sfGFP-BMP2 proteininin IB’lerden yeniden kazanımı: yeniden katlanması ve Ni-NTA agaroz kolon yardımıyla saflaştırılması

E. coli BL21-AI hücrelerinde 37°C’de ve LB besiyerinde büyütülen hücreler optik yoğunluk OD₆₀₀=0.6 değerine ulaştığında 1 mM IPTG ile indüklenmiş ve indüklemekten

4 saat sonra toplanmıştır. Toplanan hücreler -20°C’de saklanmıştır. -20°C'den alınan hücreler +4 °C’de Tris-HCl tamponu (50mM Tris, 0.1 mM DTT, 2mM PMSF pH:8.0) ile süspanse hale getirilmiştir. Süspanse edilen hücrelere lizozim enzimi ilave edilerek 90 dk sonikatörle parçalama işlemi uygulandı (9 Cycle). Parçalamanın ardından 12.000 rpm de 15 dk santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüjle elde edilen pelet resüspansiyon tamponu (50mM tris-HCl (pH:8.0), %2.5 triton X-100, %20 süktroz) ile süspanse edilerek yıkandı ve (1 g pelet için 5mL çözelti) pelet 12.000 rpm de 15 dk santrifüjle toplandı. (Bu işlem iki kez tekrarlandı).

Yıkanan pelet 8 M üre içeren çözündürme tamponu (50mM Tris-HCl (pH:8.0)) ile (1 g pelet için 10mL çözelti) 5 saat hafifçe karıştırılarak çözüldü. Sonrasında 12000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılır. Elde edilen süpernatant üzerine azar azar soğuk refolding (yeniden katlama) tamponu (100mM Tris-HCl, 10mM DTT, %20 gliserol (pH:8.0)) protein konsantrasyonu 0.2 mg/mL'den az olacak şekilde eklendi ve 16 saat 4°C'de hafifçe karıştırıldı. Sonrasında 12.000 rpm de 15 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant alınarak 100mM NaCl içeren 20mM Tris-HCl (pH:8.0) tamponuna karşı diyaliz edildi.

Diyaliz ürünü yükleme tamponuyla (100 mM Tris-HCl (pH: 7.5)) yıkandı. Sonrasında Ni-NTA agaroz içeren kolana tatbik edildi. Kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplandı. Protein yüklenmiş kolon 10 mM imidazol içeren 100 mM Tris/HCl (pH:8) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş halde bulunan istenmeyen proteinlerin ayrılması sağlandı. Sonrasında 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCl (pH:8.0) tamponuyla kolona tutunmuş olan proteine elüsyon işlemi yapıldı. Toplanan fraksiyonlardan alınan numuneler jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100°C'de 2 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına yüklendi (Melissis ve ark. 2010).

2. sfGFP-BMP2 proteininin IB’lerden yeniden kazanımı: Ni-NTA agaroz matriks destekli olarak yeniden katlanması ve saflaştırılması.

Bu işlem parçalama, yıkama, ekstraksiyon, saflaştırma, yeniden katlama ve elüsyon aşamalarından oluşmaktadır.

Parçalama (Lysis): 1 gram pelet için 5 mL olacak şekilde 2 g hücre peleti üzerine 10 mL parçalama tamponu (20 mM Tris-HCl, 0,5M NaCl (pH:8.0)) ilave edildi. Süspanse edilen hücreler üzerine 100 µL PMSF ve 100 µL Benzamidin-HCl ve 10 mg lizozim eklendi.

Buzlu su banyosuna alınan hücreler 9cycle, %90 power ile 45dk sonikatör ile parçalama işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında 12.000 rpm +4°C’de 20 dk santrifüj işlemi gerçekleştirildi.

Yıkama: 1 g pelet için 5 mL çözelti şekilde soğuk 2 M üre, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl,% 2 Triton X-100 pH:8.0 çözeltisi eklenerek buz üzerinde 4 döngü, %62 güç ile 5 dk sonikatörde tutularak süspansiyon hale getirildi. Sonrasında 12.000 rpm’de +4°C’de 20 dk santrifüj edildi. Bu işlem toplamda iki kez tekrarlandı. Son kez Triton X-100 ve üreyi uzaklaştırmak için 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl pH:8.0 tamponu ile aynı işlem tekrarlandı.

Ekstraksiyon: 1 g pelet için 5 mL çözelti olacak şekilde, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM β -merkaptotanol pH:8.0 içinde pelet yeniden süspansiyon edildi ve oda sıcaklığında 30 - 60 dakika karıştırılıp 12.000 rpm’de +4°C’de 20 dk santrifüj edildi.

Saflaştırma: 1 mL Ni-NTA rezin kolona alındı ve kolon 5 mL distile su ile yıkandı. Kolon 10 mL ekstraksiyon tamponu (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM β -merkaptotanol pH:8.0) ile dengelendi. Sonrasında santrifüjlenen numunenin süpernatantı kolona yüklendi ve kolon 10 mL 1. yıkama tamponu (Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 6 M guanidin hidroklorür, 1 mM 2-merkaptotanol pH:8.0) ile yıkandı. Sonrasında kolon tekrar 10 mL 2. Yıkama tamponu (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM β -merkaptotanol, 6 M üre pH:8.0) ile yıkandı.

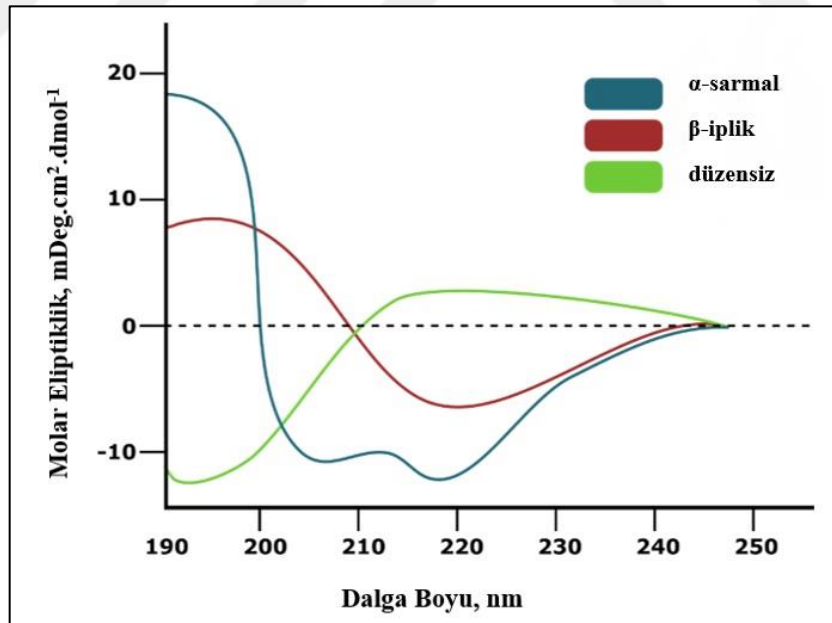
Refolding (Yeniden Katlanma): Refolding işlemi için 2. yıkama tamponundan başlayarak 6M-0 M üre gradienti oluşturuldu. 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM β -merkaptotanol temelinde sırasıyla 6M, 5M, 4M, 3M, 2M, 1M ve 0M üre içeren tampon çözeltilerinde 5’er mL olacak şekilde 0.1 - 1 mL/dk hızla kolondan geçirildi.

Elüsyon: 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM β -merkaptotanol (pH:8.0) ve 10 mL 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM β -merkaptotanol (pH:8.0) tamponu kolondan geçirildi ve son olarak 20 mL 20 mM Tris-

HCl, 0.5 M NaCl, 300 mM imidazol, 1 mM β -merkaptoetanol (pH:8.0) tamponu ile elüsyon işlemi yapıldı (Anonim, 2007).

3.2.10. Dairesel dikroizm (circular dichroism) (CD)

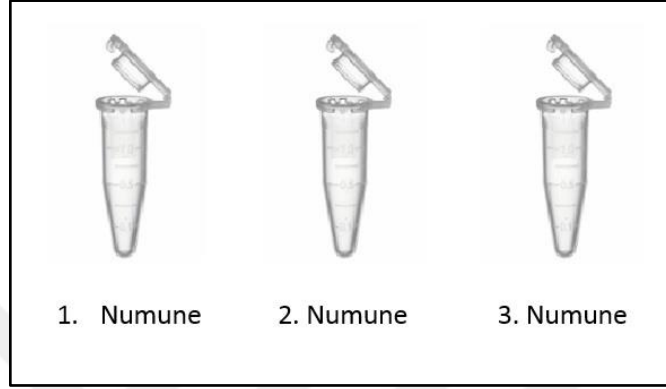
Dairesel Dikroizm asimetrik bileşiklerin mutlak konfigürasyonlarının bulunmasında kullanılan optik bir özelliği temel alan spektroskopik bir yöntemdir. Daha çok “CD” kısaltması kullanılır. Uzak ultraviyole ışık kullanıldığında “far-UV-CD” şeklinde adlandırılmaktadır. Sistem temelde asimetrik molekülün gelen ışığı hangi yönde kırdığı ve soğurması ile ilgilidir. Asimetrik bileşikler, sağ ya da sol düzlem polarize ışıkları farklı miktarlarda soğururlar (absorplarlar) ve bunun sonucu olarak da ışık elipsel polarize hale gelir ve bu özellik kullanılarak, optikçe aktif moleküllerin mutlak konfigürasyonları tesbit edilebilir. CD analizi ile proteinlerin α -sarmal, β -yaprak, β -kırıklı ya da düzensiz kıvrımları tespit edilerek üç boyutlu katlanmaları analiz edilmektedir. Yapılan analiz neticesinde elde edilen verilerle referans değerler karşılaştırılarak çalışılan numunelerin katlanma doğrulukları test edilebilmektedir.



Şekil 3.6 CD analizi sonucu oluşturulan α -sarmal, β -iplik ve düzensiz kıvrılmaların grafik gösterimleri (Wei ve ark., 2014’ten uyarlanmıştır)

Yaptığımız çalışmalarda önceki bölümlerde anlatıldığı şekilde üç farklı metotla sfGFP-BMP2 protein eldesi sağlanmıştı: 1. Numune, 2. Numune ve 3. Numune (Şekil 3.7). Elde edilen bu üç numunenin üç boyutlu katlanmalarının tespiti ve oluşan yapıların analizi için

daireysel dikroizm (CD) analizine tabi tutulmuşlardır. 0.1 Molar $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (pH:8) tamponu içerisinde gönderilen numunelerin ölçümleri 190 – 300 nm dalga boyunda Jasco CD analiz cihazı ile yaptırılmıştır. CD sonuçları CAPITO CD Analyses and Plotting programında analiz edilerek grafikler oluşturulmuştur.

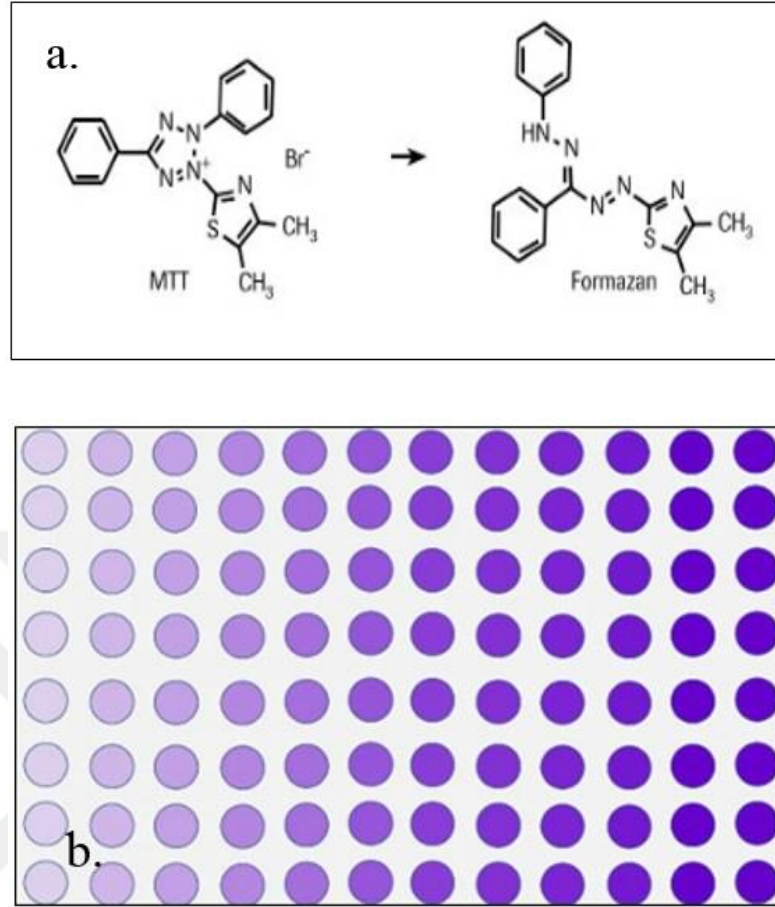


Şekil 3.7 Dairesel Dikroizm (CD) ölçümleri için oluşturulan numuneler (Anonim, 2022)

1. numune: Süpernatanttan saflaştırma yoluyla elde edilen protein örneği, 2. numune: 1. yöntem ile inklüzyon cisimciklerinden yeniden kazanılan protein örneği, 3. numune: 2. yöntem ile inklüzyon cisimciklerinden yeniden kazanılan protein örneği.

3.2.11. rhBMP2'nin biyolojik aktivite tayini

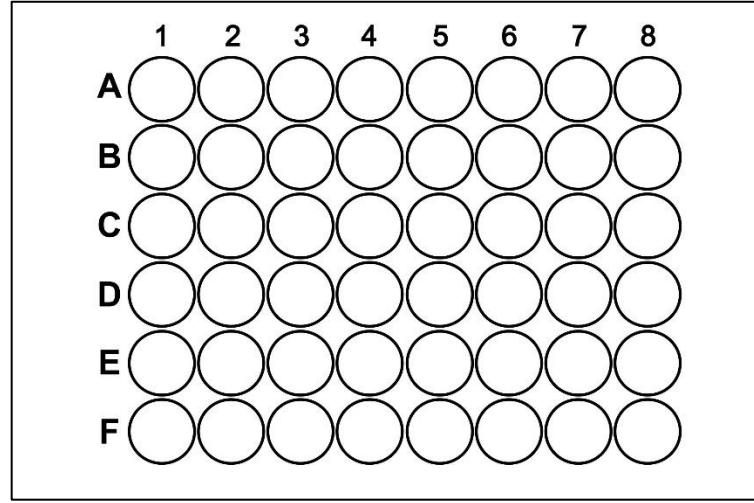
MTT testi hücrelerin hücre canlılığının, proliferasyonunun ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücresel metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir testtir. Canlı hücrelerde osteoredüktaz enzimleri belirli şartlar içerisinde mevcut canlı hücrelerin sayısını yansıtabilir. Bu enzimler, kimyasal olarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür olan tetrazolyum boyası MTT'yi, mor renkli çözünmeyen formazana indirgeme yeteneğine sahiptir (Mosmann, 1983). Sarı bir tetrazol olan MTT, canlı hücrelerde mor formazana indirgenir. MTT uygulamasında, MTT, mitokondriyal redüktaz tarafından formazana dönüştürülür (Vistica ve ark., 1991). Çözünmeyen formazan kristalleri, bir çözündürme solüsyonu kullanılarak çözülür ve elde edilen renkli solüsyon, spektrofotometre kullanılarak 500-600 nanometre dalga boyunda absorbans ölçülerek belirlenir. Çözelti renginin koyuluğu canlı hücrelerin varlığının çokluğunu gösterir.



Şekil 3.8 Çok gözlü hücre plakası MTT ve formazonun molekül yapısı

a) MTT ve formazonun molekül yapısı. b) 96 gözlü hücre plakasında yapılan MTT testi sonrası oluşan görüntünün şematik gösterimi. Canlı hücre varlığı soldan sağa ve yukarıdan aşağı artmaktadır (Anonim, 2010).

MTT yöntemi için ilk olarak 24 gözlü kültür plakasında yukarıdan aşağıya A,B,C ve D nolu sıralarda Saos-2 hücreleri büyütüldü (Şekil 3.9). Uygun büyüklüğe ulaşan hücreler üzerine PBS tamponunda hazırlanan BMP2 dilüsyonlarının uygulanmasının ardından 24. ve 48. saatlerde ölçümler gerçekleştirildi. Saos-2 tip hücrelerin büyüme eğrisi dikkate alınarak uygulama için yeterli hücre sayısı için 24 saat sonunda hücrelerin logaritmik evreye girmiş olacağı varsayılmıştır.



Şekil 3.9 MTT uygulaması yapılan 48 gözlü kültür plakası (Anonim, 2022)

A: 1. numune; B: 2. numune; C: 3. numune; D: Kontrol. BPS tamponuna karşı diyaliz edilmiş sfGFP/BMP2 füzyon protein konsantrasyonları: 1: 0 ng/mL, 2: 15.625 ng/mL, 3: 31.25 ng/mL, 4: 62.5 ng/mL, 5: 125 ng/mL, 6: 250 ng/mL, 7: 500 ng/mL, 8: 1000 ng/mL.

MTT Uygulaması

MTT uygulamasında başlamadan evvel kuyucuklardaki kullanılmış besi ortamı çekildi ve hücrelerin üzerine %10 MTT (0.5 mg/mL, PBS'de çözündürülmüş) içeren besi ortamı eklenmiştir. Hücreler 37 °C'deki %5 CO₂'li inkübatörde ışısız ortamda 3 saat boyunca inkübe edildi. 3 saat inkübasyon sonrası kuyucuklardaki MTT içeren besi ortamı çekildi. Ortama DMSO eklendi ve formazan kristalleri bu sayede çözündürüldü. 2-3 dk çalkalayıcıda düşük rpm'de (100 rpm) çalkalanarak kristallerin iyice çözünmesi sağlandı. Hücre kültür plakaları UV spektrofotometrede OD₅₇₀'de okundu.

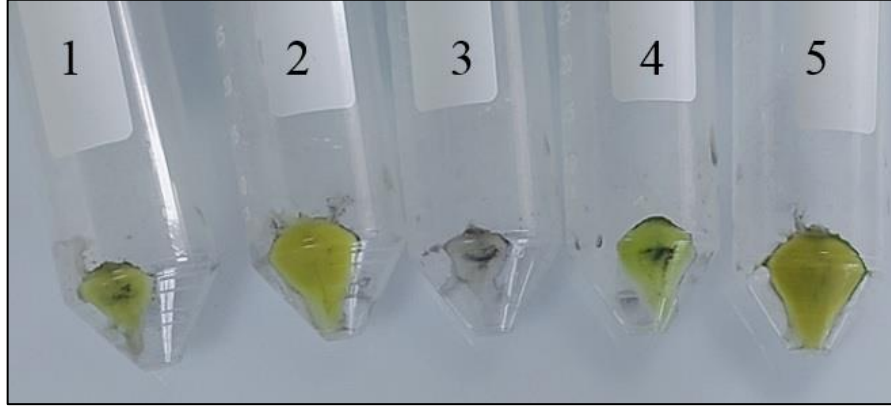
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. sfGFP-BMP2'nin *E. coli* BL21(DE3) pLysE'de ekspresyonu

E. coli pLysE hücrelerinde sfGFP-BMP2 proteinin ekspresyonu sonrası saflaştırma işlemi için nikel bazlı affinite kromotagrofisi yapıp sonrasında sonuçlar SDS-PAGE yöntemi ile analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde total hücre proteini ve pellet yüklemelerinde beklenen muhtemel kDa büyüklüğünde yoğun konsantrasyona sahip bantlar gözlenirken, süpernatant ve elüsyon yüklemelerinde çözünür formda protein eldesi çok düşük miktarda gözlemlenmiştir. Ekspresyon sonrasında hücrelerde yeşil floresan renk belirlemeye başlamıştır. Parçalama ve saflaştırma işleminde çalışılan çözeltinin daha bariz şekilde yeşil floresan renge bürünmesi füzyon proteinimizin *E. coli* BL21(DE3) pLysE hücreleri tarafından ekspresyonunun yapıldığını göstermektedir. Ancak 30.000 rpm'de yapılan ultrasantrifüj neticesinde süpernatantta düşük düzeyde ve pelette yüksek miktarlarda gözlenen hedef protein varlığı, bize hedef proteinimiz sfGFP-BMP2'in hücresel ekspresyon sırasında çözünür formda olan kısmın yüzdesinin düşük olduğunu ve büyük kısmının agregasyona uğrayarak IB'ye dönüştüğünü göstermektedir. Ekspresyon yoluyla üretilen proteinin büyük miktarda IB cisimciklerine dönüşmesi, süpernatantta çözünür formda elde edilen proteinlerin fonksiyonel katlanıp katlanmadığı noktasında ciddi soru işaretleri doğurmuştur. Bu durum bizi füzyon proteinin doğru katlanmayı arttırarak IB oluşumunu ortadan kaldırabilecek şaperon proteinleri ile koekspresyon yapılması yoluna itmiştir.

4.2. sfGFP-BMP2'nin şaperon plazmit sistemi ile ekspresyonu ve saflaştırılması

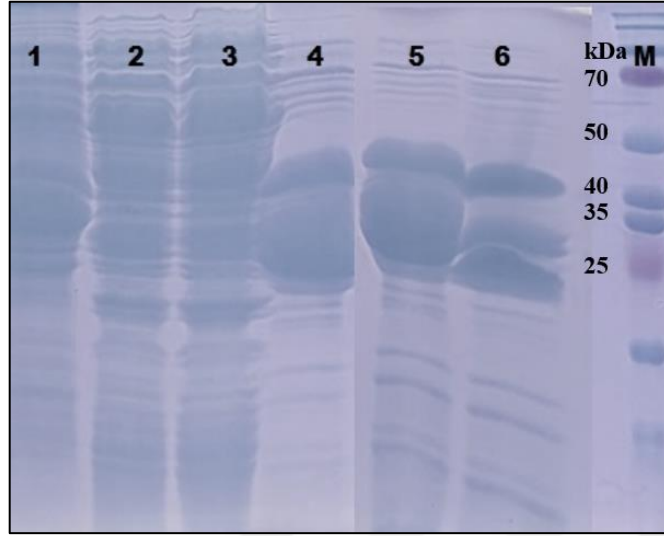
Yapılan çalışmada sfGFP-BMP2 proteinini taşıyan pET30a/sfGFP-BMP2 plazmit vektörü ile sırasıyla Takara™ firmasına ait beş farklı pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 ve pTf16 plazmitlerini taşıyan *E. coli* BL21-AI hücreleri her biri ayrı erlenlerde olmak üzere koekspresyon yapılmıştır. İşlem sonunda hücreler toplanmıştır. Toplanan hücreler incelendiğinde her bir şaperon plazmidi ile farklı neticeler elde edildiği görülmüştür. Eşit şartlar uygulanan her bir koekspresyon erleninde yeşil parlak floresan renk gözükmesine rağmen hücre miktarlarında ciddi farklılıklar gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). En fazla hücre yoğunluğu pTf16 plazmiti ile yapılan koekspresyonda tespit edilmiştir. Bu numuneyi yoğunluk sırası çoktan aza olmak üzere pG-KJE8, pGro7, pG-Tf2 ve pKJE7 plazmitleri ile yapılan koekspresyonların izlediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 pET30a/sfGFP-BMP2 plazmit vektörü ile şaperon plazmitlerini taşıyan *E. coli* BL21-AI hücrelerinin koekspresyon sonuçları

Koekspresyon yapılan plazmitler sırasıyla; 1: pG-KJE8, 2: pGro7, 3: pKJE7, 4: pG-Tf2, 5: pTf16.

Hücre parçalanması sonrası gerçekleştirilen santrifüj işleminde 5 numaralı plazmit haricinde süpernatantta sfGFP proteininin karakteristik floresan yeşil rengi 1 ve 3 numaralı tüplerde gözlemlenmemiş 2 ve 4 numaralı tüplerde oldukça zayıf şekilde gözlemlenmemiştir. Agregasyondan kaynaklı olarak 2 ve 4 numaralı örneklerin peletinde yoğun yeşil renk gözlemlenirken, 5 numaralı örnekte ise hem süpernatantında ve hem peletinde yoğun yeşil floresan renk gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen bu ekspresyon işleminden sonra en fazla verimin elde edildiği pTf16 plazmitini taşıyan hücreler seçilmiş, ilerleyen çalışmalara bu plazmit kullanılarak yapılan koekspresyonlar ile devam edilmiştir. pTf16 plazmiti ile yapılan koekspresyon sonrası toplanan hücreler parçalanmış ve nikel bazlı agaroz afinite kromatografisi ile saflaştırılıp toplanan numuneler ile SDS-PAGE analizi gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 sfGFP-BMP2'nin pTf16 plazmitin ürettiği tig şaperon proteinini ile koekspresyonu ve saflaştırma sonrası yapılan %12'lik SDS-PAGE analizi

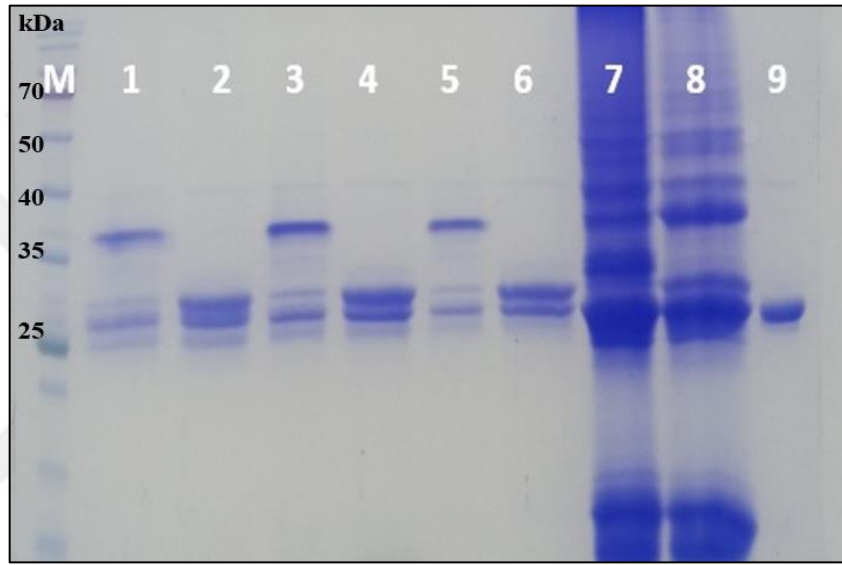
1: pellet, 2: süpernatant; 3: loading; 4: 1 nolu elüsyon; 5: 2 nolu elüsyon; 6: nativ protein; M: markör.

SDS-PAGE analizine bakıldığında bir önceki sonuçlara benzer bir tablo çıktığı gözükmemektedir. Santrifüj sonrası yüksek miktarda protein IB olarak pelete çökmesine rağmen bu defa hedef proteinimizin süpernatant içerisinde çözünür formda çökmeden kalan miktarı yeterli gözükmemektedir. SDS-PAGE sonuçlarına baktığımızda 4,5 ve 6 numaralı kuyucuklara yüklenen saf protein örnekleri beklenen 25 – 40 kDa büyüklüklerinde gözükmemektedir (Şekil 4.2). 6 numaralı kuyucukta bulunan protein örneği ise nativ olarak yüksek ısıya maruz bırakılmadan yüklenmiştir ve 25 – 40 kDa arasında gözükken her üç yoğun bantta floresan ışımaya boyama öncesinde gözlemlenmiştir. Bu sonuç bize sfGFP-BMP2 füzyon proteinin beklenen büyüklüklerde üretildiğini göstermektedir.

4.3. sfGFP-BMP2 füzyon proteinin TEV proteaz ile kesimi

Bir önceki bölümde Takara™ firmasına ait Şaperon Plazmit Set yardımıyla yapılan koekspresyonlar neticesinde pTf16 plazmitinin ürettiği tig şaperonu ile olumlu sonuçlar alınıp çalışmaya bu koekspresyon ile devam edildiği anlatılmıştı. Süpernatantın Ni-NTA agaroz kolon yardımıyla saflaştırılması ile elde edilen saf protein sfGFP-BMP2 füzyon proteininden. Asıl hedef proteinimiz olan BMP2'yi sfGFP füzyonundan ayırmak için füzyon proteinin oluşturan iki protein arasına yerleştirilen (Bkz. Şekil 3.2) TEV proteaz kesim bölgesi (ENLYFQ\S) üzerinden TEV proteaz enzimi ile kesim reaksiyonu

gerçekleştirilmiştir. Kesime tabi tutulmadan önce gece boyu TEV proteaz tamponuna karşı diyalize bırakılan sfGFP-BMP2 protein çözeltisinde oluşan çökelmeler santrifüjle toplanmıştır. Kesim reaksiyonu gerçekleştikten sonra enzim reaksiyon çözeltisi tamamen alınıp saflaştırma işlemine geçmek üzere gece boyu parçalama/yükleme tamponuna karşı diyalize bırakılmıştır. Diyaliz sonrası çözelti içerisinde yoğun çökeltme gözlemlenmiş ve parlak yeşil floresan renk büyük ölçüde kaybolmuştur. SDS-PAGE'e yüklemeden önce santrifüj yardımıyla çökelmeler toplanmıştır.



Şekil 4.3 sfGFP-BM2 füzyon proteininin TEV Proteaz enzimi ile kesim sonrası yapılan %12'lik SDS-PAGE analizi

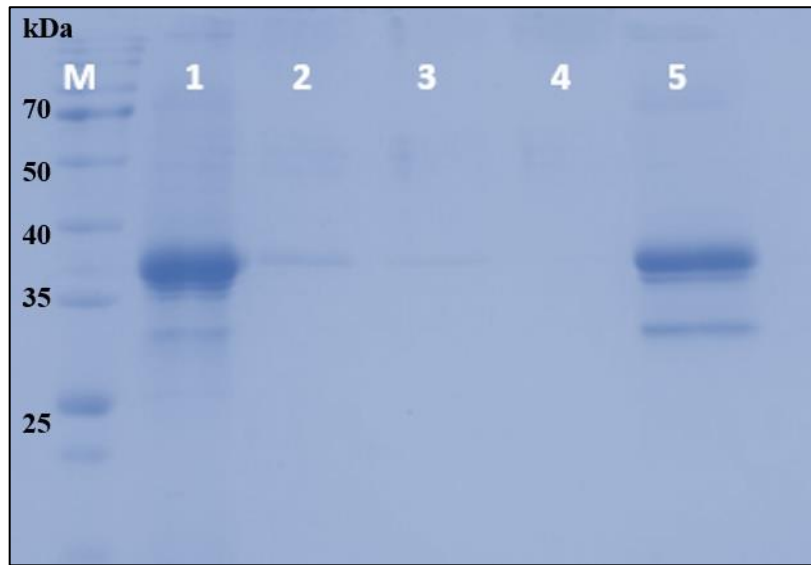
M: Marker; 1-2: 1. reaksiyon nativ ve normal yükleme; 3-4: 2. reaksiyon nativ ve normal yükleme; 5-6: 3. reaksiyon nativ ve normal yükleme; 7-8: 3. reaksiyonda oluşan çökelti nativ ve normal yükleme; 9: TEV proteaz enzimi.

SDS-PAGE analiz sonuçlarına göre BMP2'ye ait beklenen 13 kDa büyüklüğünde bant gözlemlenememiştir. SDS-PAGE analizinde füzyon halde yaklaşık 40 kDa moleküler büyüklükte hareket etmesi beklenen sfGFP-BMP2 proteini kesim sonucu 28 kDa büyüklüğünde bantlar şeklinde gözlemlenmiştir. TEV proteaz enzimi 28.4 kDa, sfGFP proteini 27.7 kDa olduğu ve BMP2 monomer halde 13 kDa ve homodimer halde 26 kDa olduğu düşünülürse kesim sonucu oluşan bantlarda çakışma olduğu düşünülebilir. Ancak diyaliz sonrası oluşan çökeltiilerden santrifüj ile ayrılan süpernatant, affinite kromatografisine tabi tutulmuştur. TEV kesiminin doğru şekilde gerçekleştiği bir durumda 6xHis etiketli sfGFP proteininin ve TEV proteaz enziminin kolona tutunması

ve serbest kalan BMP2 proteinin kolon altında toplanması gerekiyordu. Sonrasında yapılan SDS-PAGE analizinde toplanan fraksiyonlarda BMP2 homodimer (26 kDa) ya da monomer (13 kDa) büyüklüğünde bantlara rastlanılmamıştır (SDS-PAGE verileri gösterilmedi). Kesim sonucunda 40 kDa büyüklüğünde protein bantlarının gözlemlenmemesi TEV kesim işleminin gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak hedef proteinimiz olan BMP2 proteini TEV kesimi sonrasında muhtemelen çözünürlüğünü kaybederek çökelti oluşturmaktadır.

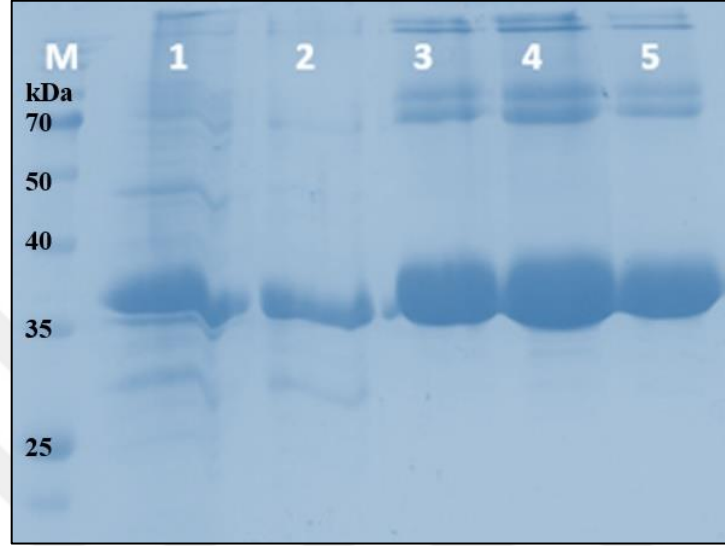
4.4. Yeniden katlama işlemi (Refolding)

Yeniden katlama işlemi için iki farklı prosedür kullanılmıştı. Bu yöntemlerle pelette çökmüş halde bulunan inklüzyon cisimciklerinden hedef proteinin yeniden eldesi amaçlandı. Sonuç olarak uygulanan iki yöntemle birbirine yakın sonuçlar elde edildi. Konsantrasyon ve toplam protein eldesi olarak 2. yöntemle (Anonim, 2007) gerçekleştirilen prosedürün 1. yöntemle (Melissis ve ark. 2010) uygulanan prosedüre nazaran üretim miktarı ve konsantrasyon açısından daha verimli gerçekleştiği görülmüştür. sfGFP-BMP2 proteini OD₂₈₀ nanodrop ölçümlerine göre sırasıyla 1. ve 2. yöntem için sırasıyla 0.80 mg/mL ve 1.70 mg/mL konsantrasyonlarda protein eldesi sağlanmıştır. Elde edilen protein SDS-PAGE analizinde molekül boyutu olarak beklenen büyüklükte konumlanmıştır (~40 kDa).



Şekil 4.4 sfGFP-BMP2 proteininin inklüzyon cisimciklerinden eldesi, yeniden katlanması ve Ni-NTA agaroz kolon yardımıyla saflaştırılması sonrası yapılan %12'lik SDS-PAGE analizi

M: Markör; 1: Pelet; 2: Süpernatant; 3: Yükleme; 4: Yıkama; 5: Elüsyon.



Şekil 4.5 sfGFP-BMP2 proteininin inklüzyon cisimciklerinden eldesi, agaroz matriks destekli yeniden katlanması ve saflaştırılması sonrası yapılan %12'lik SDS - PAGE Analizi

M: Markör; 1. Peletin tekrar çözülmesi; 2: Süpernatant; 3: 1. Elüsyon; 4: 2. Elüsyon; 5: 3. Elüsyon.

SDS-PAGE analizlerini karşılaştırdığımız matris destekli yöntem ile gerçekleştirilen prosedür kullanılarak saflaştırılan numunede, 1. yeniden katlama yönteminde elde edilen ürüne göre yüksek konsantrasyonda protein eldesi gözükmemektedir. Saflaştırma aşamalarında sfGFP proteininin parlak floresan rengi son aşamaya kadar kaybolmamıştır ve saf olarak elde edilen elüsyonlarda da yeşil floresan renk bariz olarak gözlemlenmiştir.

4.5. Dairesel Dikroizm (Circular Dichroism) (CD) Stereskopisi

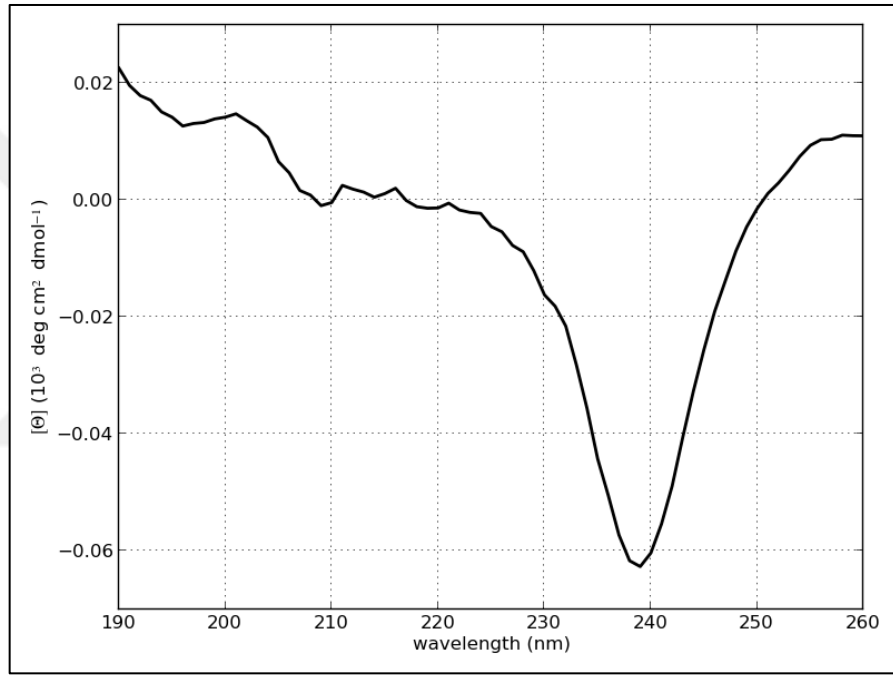
Yaptığımız çalışmalarda önceki bölümlerde anlatıldığı şekilde üç farklı metotla sfGFP-BMP2 protein eldesi sağlanmıştır:

1. numune: Süpernatanttan saflaştırma.

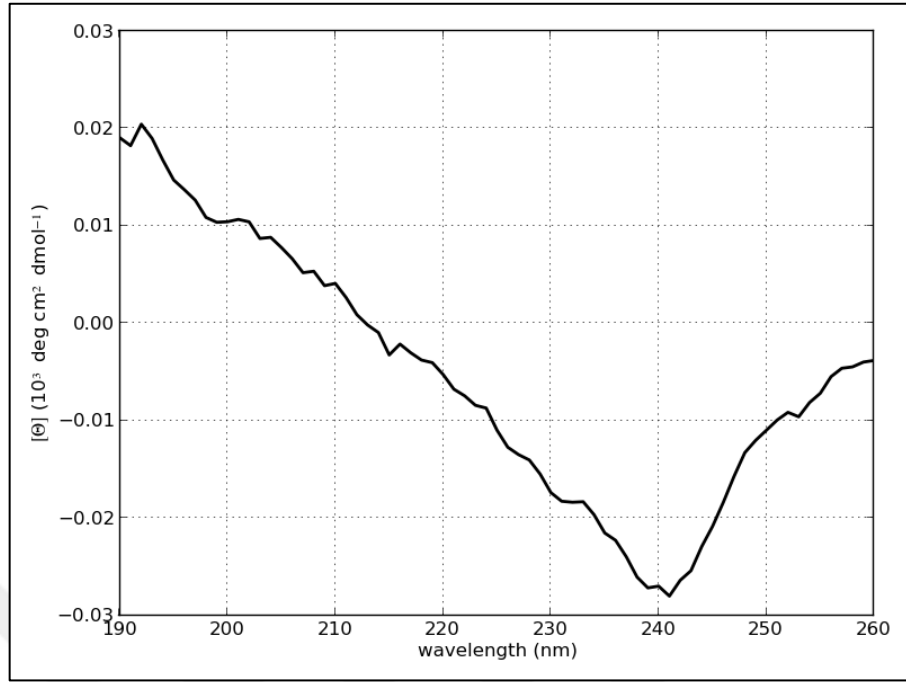
2. numune: IB'den protein geri kazanımı (1. yeniden katlama yöntemi)

3. numune: IB'den protein geri kazanımı (2. yeniden katlama yöntemi)

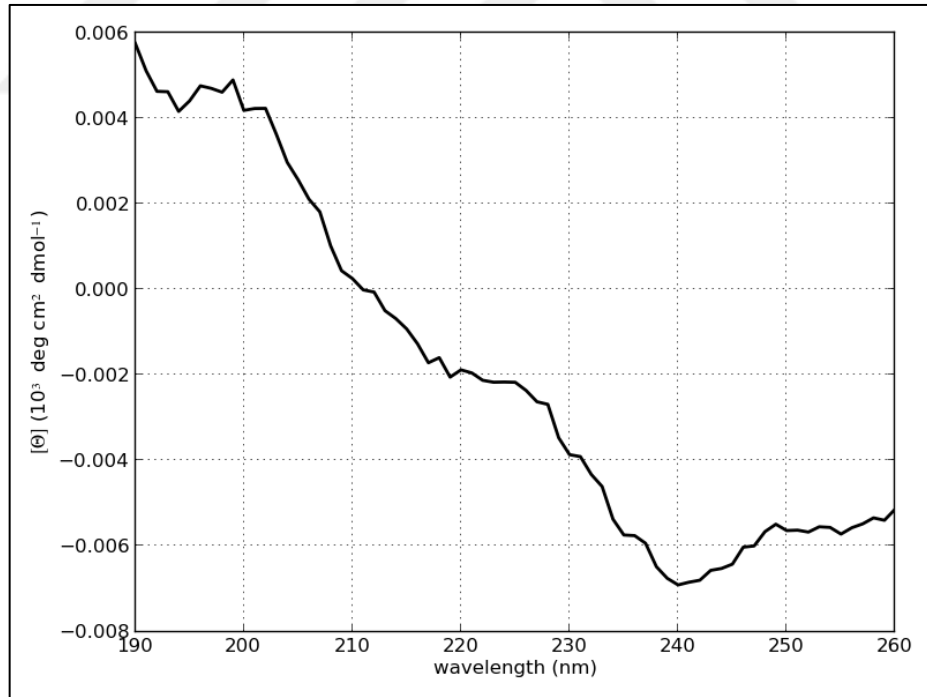
Elde edilen bu üç numunenin üç boyutlu katlanmaların tespiti ve oluşan yapıların analizi için bu üç numune dairesel dikroizm (CD) testine tabi tutulmuştur. 0.1 M NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 (pH:8.0) tamponu içerisinde gönderilen numunelerin ölçümleri 190 – 300 nm dalga boyları arasında Jasco CD analiz cihazı ile yaptırılmıştır. CD sonuçları CAPITO CD Analyses and Plotting programı kullanılarak analiz edilmiş ve grafikler oluşturulmuştur (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



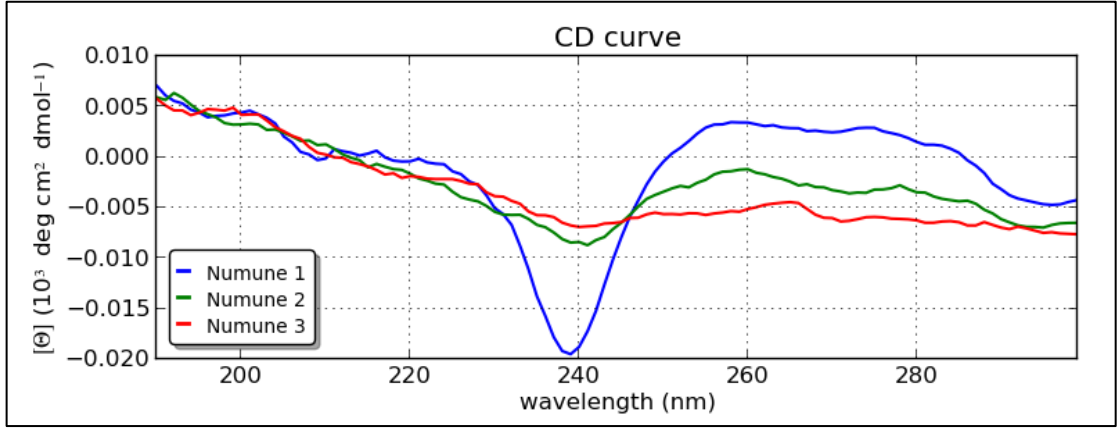
Şekil 4.6 Far-UV-CD analizi - 1. numune.



Şekil 4.7 Far-UV-CD analizi - 2. numune



Şekil 4.8 Far-UV-CD analizi - 3. numune



Şekil 4.9 1., 2. ve 3. numunelerine ait CD eğrilerinin karşılaştırılması

Teorik olarak Chou-Foshman modellemesine göre sfGFP-BMP2 proteini 0.28 α - sarmal, 0.51 β -iplik yapıda ve 0.30 frekansında rastgele kıvrılma gösterdiği hesaplanmıştır. Buna karşılık CD sonuçlarına göre, 1. numunenin 0.00 α - sarmal yapıda, 0.53 β -iplik ve 0.55 frekanslarda düzensiz yapıda kıvrım oluşturduğu tespit edilmiştir. 2. numunenin 0.01 α - sarmal, 0.53 β -iplik ve 0.55 frekanslarda düzensiz yapıda ve 3. numunenin 0.28 α - sarmal, 0.48 β -iplik ve 0.30 frekanslarda düzensiz yapıda kıvrımlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre teorik ile analiz sonucu karşılaştırmasında en doğru eşleşmenin 3. numunede olduğu tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, in vitro yeniden katlama işlemi gerçekleştirilen 2 ve 3 nolu numunelerin, süpernatanttan elde edilen 1 nolu numuneye nazaran daha doğru katlanma gösterdiği söylenebilir. 3 nolu numunenin CD analiz sonucu ise teorik hesaplamalara en yakın değeri vererek, iki farklı yeniden katlama yönteminin sfGFP-BMP2 füzyon proteini üzerinde tesirini karşılaştırmamızı sağlamıştır.

4.6. IB'den yeniden katlama yoluyla sfGFP-BMP2 füzyonundan TEV proteaz enzim kesimi ile BMP2 peptidinin çıkarılması

Önceki bölümlerde anlatılan her iki yöntemle inklüzyon cisimciklerinden yeniden eldesi sağlanan sfGFP-BMP2 füzyon protein numuneleri, BMP2 peptidinin serbest kalması için TEV proteaz enzimi ile kesime tabi tutulmuştur. Reaksiyon esnasında deney tüpü içerisinde yoğun çökeltiler gözlemlenmiştir. Enzim kesim işleminden sonra reaksiyon ürünleri yükleme tamponuna karşı diyaliz edilmiş ve sonrasında affinite kromatografisi işlemi uygulanmıştır.

Kesim işleminden sonra BMP2'nin protein yapılı diğer reaktanlar içerisinde şu yolla ayrıştırılması amaçlanmaktaydı: Peptid dizaynımıza göre sfGFP enzimi amino ucunda 6xHisTag etiketi taşımaktadır ve BMP2 proteini Ni⁺ kolona herhangi bir bağlanma bölgesi içermemektedir. Dolayısıyla normal koşullarda TEV enzimi kesimi sonrası BMP2 proteini füzyon ortağından ayrılarak serbest kalması ve Ni⁺ agaroz kolona bağlanmadan süzülmesi beklenmektedir. Yine TEV enzimi de 6xHisTag etiketi taşımaktadır ve onun da Ni⁺ agaroz kolona bağlanması beklenmektedir. Ancak reaksiyon sonucu yaptığımız SDS-PAGE analizinde içerisinde BMP2 proteini beklenen kolon altında toplanan örnekte, ya da elüsyonlarda 13 kDa ya da 26 kDa boyutlarında konumlanmış bantlar gözlemlenememiştir. Ancak 40 kDa boyutunda gözlemlenmesi beklenen sfGFP-BMP2 füzyon protein varlığını gösteren bant kaybolmaktadır ve dolayısıyla sfGFP-BMP2 füzyon proteinin TEV proteaz tarafından kesildiği ancak BMP2'nin agregasyona uğradığı düşünülmektedir.

sfGFP-BMP2 füzyonunu oluşturan sfGFP proteini 2 adet sistein amino asiti içermektedir. BMP2 ise 7 sistein amino asidi içermekte ve bunların altısı molekül içi disülfid bağlarını oluşturmakta yedincisi ise diğer BMP monomeri ile kovalent disülfid bağı oluşturmaktadır (Nohe ve ark., 2004). Bu iki protein birlikte üretildikleri zaman karşılıklı çapraz disülfid bağları yapması beklenebilir. Ancak füzyon halde üretildiklerinde sfGFP yeşil floresan rengini muhafaza etmektedir ve dolayısıyla konformasyonunu korumaktadır. Zaten sfGFP'de yüksek katlanma (süper folder) karakteristiktir ve dolayısıyla iki protein arasında çapraz disülfid bağı oluşumu gerçekleşmiş olsa sfGFP konformasyonunun bozulması ve yeşil rengini kaybetmesi beklenirdi. TEV proteaz ile kesim işlemi reaksiyon karışımında bulunan β -merkaptotanol disülfid bağlarını yıkıma uğratmaktadır. Nitekim TEV kesimi sonrası β -merkaptotanolle maruz kalan sfGFP proteini de yeşil rengini kaybettiği gözlemlenmiştir.

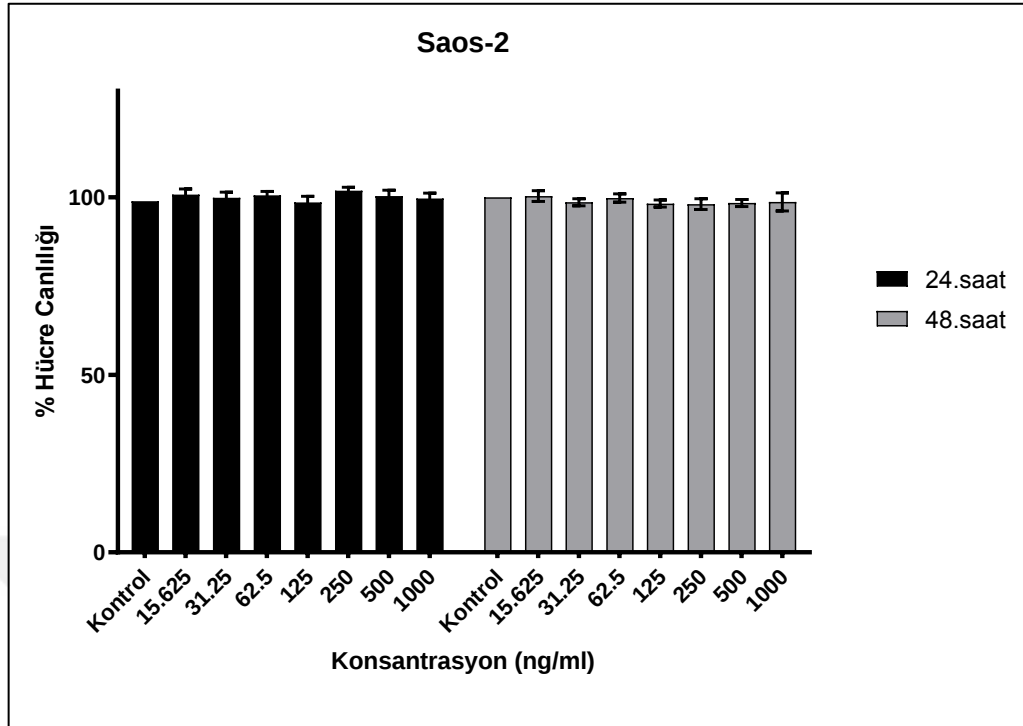
TEV proteaz enzimi ile kesim sonrası tampon çözelti şartlarından kaynaklanan bir çökme olup olmadığı da göz önünde bulundurulmuştur. TEV proteaz enzimi tamponu pH:8.0 olarak çalışılmıştır. BMP2 proteininin izoelektrik noktası pI:8.17'dir ve pH:8.0'de yüksüz olduğu kabul edilmektedir.

Bilindiği gibi füzyon haldeki proteinlerin enzim kesimi sonrası birbirinden ayrılması son derece kompleks bir olaydır. TolAIII-3gp füzyonu enzim kesimi sonrası füzyon protein bileşenlerinin ayrılmadığı bildirilmiştir (Gökçe, İ., yayınlanmamış çalışma). Benzer bir çalışmada rhBMP2 proteini *E. coli* sisteminde small ubiquitin like modifier 3 (SUMO-3) proteini ile füzyon halde üretilmiştir. Ancak enzim kesimi sonrası BMP2'nin agregasyonuna uğradığı bildirilmiştir (Hanif, 2018).

4.7. sfGFP-BMP2 füzyon proteininin Saos-2 tip hücrelerle MTT uygulaması

Saos-2, birincil osteosarkomdan türetilen bir hücre dizisidir. Saos-2 hücreleri osteoblast benzeri hücreler gibi davranırlar ve kemikle ilgili araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Saos-2 hücre hattının avantajları arasında kısa sürede çok sayıda hücre elde edilebilmesi ve osteoblastlara benzer şekilde farklılaşabilmesi sayılabilir. Saos-2 hücreleri, "normal" osteoblast davranışının in vitro modeli olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve yüksek ALP aktivitesine sahip olgun bir osteoblast fenotipini temsil etmektedir (Czekanska ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda bu sebeplerden dolayı Saos-2 hücre hattı BMP2 proteinin etkilerinin araştırılması için uygun bir hücre hattı olarak seçilmiştir.

pTf16 plazmidi ile koekspresyon yapılarak elde edilen hücre lizatından üç farklı yol ile saflaştırılan sfGFP-BMP2 füzyon proteini MTT uygulamasında ayrı ayrı tatbik edilmiştir. Uygulama neticesinde 0 – 1000 ng/mL arasında çeşitli konsantrasyonlarda elde edilen sonuçlar negatif kontrol ile kıyaslandığında sfGFP-BMP2 uygulanan hücrelerde 24. ve 48. saatte yapılan gözlemlerde BMP2 numunelerinin saos-2 hücrelerinde hücre canlılığını azaltıcı bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Yeniden katlama yoluyla elde edilen sfGFP-BMP2'nin Saos-2 tip hücre hattıyla gerçekleştirilen canlılık testi grafiği

Biyoaktif bir BMP2 proteininin Saos-2 hücre hattıyla gerçekleştirilen hücre canlılığı çalışmalarında proliferasyonu durdurucu etki ile beraber hücre canlılığını azaltıcı bir etki beklenmektedir. Bununla birlikte BMP-2, hücre tipine ve moleküler ortama bağımlı bir şekilde mineralizasyonu ve ALP aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Hrubi ve ark. 2018). Çalışmamızda MTT testinden alınacak olumlu sonuçlardan sonra Alkalın Fosfataz aktivitesi yöntemi kullanılarak sfGFP-BMP2 proteini için biyoaktivite tayini yapılması hedeflenmişti. sfGFP-BMP2 proteininin hücre canlılığı üzerine etkisinin gözlemlenmemesi sonrası ALP aktivite tayini de gerçekleştirilmemiştir.

Füzyon proteinleri oluşturan füzyon ortakları bazı örneklerde kendi karakteristiklerini gösterebilirler. Bu durum oluşturulan yeni proteinde füzyon ortaklarının kendi karakteristik üç boyutlu yapılarını ne kadar koruyabildikleri ile ilgilidir. sfGFP proteini kendi karakteristik yeşil floresan rengini füzyon halde de göstermektedir. Ancak BMP2 proteini biyoaktif olabilmesi için homodimer yapıya geçmesi gerekmektedir. BMP2 proteini 7 tane sistein amino asiti içermekte bunların 6'sı peptid içi disülfid bağlarını oluşturmakta 7. ise diğer monomer ile homodimer yapısını oluşturmaktadır. Füzyon haldeki sfGFP-BMP2 proteinin muhtemelen füzyonun kendisine has katlanmasından

dolayı füzyon ortağı olan BMP2 monomerlerinin homodimer oluşumuna engel olması neticesinde işlevsel BMP-2 homodimer oluşumu gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

BMP2 proteinleri kemik ve diş dokularında oluşan tahribatların giderimi gibi terapötik uygulamalarda tıp ve diş hekimliği alanlarında önemli bir proteindir. BMP2'lerin geniş kullanım alanı için en büyük problem yüksek üretim maliyetlerine bağlı olarak oluşan market fiyatlarıdır. Diğer pek çok önemli proteinin kitlesel üretiminde olduğu gibi BMP2 proteini için de; üretim koşulları, protein izolasyon metotları, yeniden katlanma, dimerizasyon ve saflaştırma basamakları gibi üretimi etkileyen basamaklar gözden geçirilerek iyileştirilmeye çalışılmaktadır. İyi bilinen ve çokça çalışılmış *E. coli* ekspresyon sistemleri geniş yelpazede çalışma alanı sunmaktadır. Memeli proteinlerinin rekombinant olarak üretimi için en doğru katlanmayı sağlayan memeli ekspresyon sistemleri olmasına rağmen, oldukça zahmetli, yavaş ve pahalı olan bu yöntem tüketimi oldukça yaygın olan terapötik proteinlerin kitlesel üretiminde tercih edilmemektedir. Maya ve Baculovirüs sistemleri de benzer sebeple tercih edilmemektedir. Yapılan bu tez çalışmasında, Transform Edici Büyüme Faktörleri β (TGF β) süperfamilyasından olan insan Kemik Morfogenetik Proteini 2 (hBMP2)'nin yüksek miktar ve saflıkta ve fonksiyonel olarak eldesi amaçlanmıştır ve kitlesel üretime imkan sağlayan için *E. coli* organizması tercih edilmiştir. Çalışma sonunda BMP2 proteininin, sfGFP proteini ile füzyon halde sfGFP-BMP2 şeklinde yüksek ölçekli, yüksek konsantrasyon ve saf olarak üretimi sağlanmıştır.

BMP2 protein iki polipeptit zincirinden oluşan bir homodimerdir, bu iki polipeptit Cys78 amino asiti üzerinden birbirine S-S bağları ile bağlanırlar (Scheufler ve ark., 1999) ve BMP2'lerin monomerik formda 114 amino asitten oluşmaktadır. BMP2'de bulunan her bir monomer üç tane S-S bağı taşıdığı bilinmektedir (Sharapova ve ark., 2010). BMP2 monomerlerinin kendi üzerine katlanması ve homodimer oluşturmaları için S-S (disülfid) bağları son derece önemlidir. Ancak *E. coli* hücreleri ile gerçekleştirilen ekspresyonlarda S-S bağları oluşturulmasından kaynaklı bazı güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu sebeple memeli organizmalar gibi yüksek yapıllı canlılardan orijin alan proteinler agregasyona uğrayarak IB oluşturmaktadır. *E. coli* hücrelerinde BMP2 proteini füzyon protein olmadan tek başına ekspres edildiğinde ya da güçlü katlanma özelliği olmayan füzyon proteinler ile klonlanarak ekspres edildiğinde yoğun şekilde IB oluşturduğu rapor edilmiştir (Primesti ve ark. 2012). Yaptığımız çalışmada sfGFP-BMP2 füzyon proteini

belli ölçüde IB oluşturmaya rağmen sfGFP protein molekülünün güçlü katlanma etkisinden faydalanılarak çözünür formda eldesi sağlanmıştır. Üretim ve saflaştırma aşamalarında moleküler etiket vazifesini floresan özelliği sayesinde kullandığımız sfGFP proteini, BMP2 proteininin *E. coli* içerisinde çözünürlüğünü ve total üretimini önemli ölçüde arttırarak avantaj sağlamıştır. Çalışmada ayrıca BMP2 proteininin pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2 ve pTf16 şaperon plazmitleri ile üretilebilirliği test edilmiş, özellikle pTf16 ve pG-KJE8 plazmitleri ile *E. coli* hücre miktarı ve toplam ekspres edilen protein miktarında ciddi artışlar tespit edilmiştir. pTf16 plazmidinin kodladığı tetikleyici faktör olarak isimlendirilen “tig” şaperonunun yüksek ekspresyonunun protein miktarını arttırıcı şekilde etki ettiği bilinmektedir. Ancak tig şaperonunun sadece total rekombinant protein üretimini arttırmadığı aynı zamanda sitozölde yüksek katlanmaya yardımcı olarak agregasyonu engellediği de rapor edilmiştir (Nishihara ve ark., 2000).

Saflaştırma aşamasında sfGFP-BMP2 füzyon proteini büyük ölçüde çökelti oluşturmaktadır. IB’lerden proteinin yeniden kazanımı için yeniden katlama ve saflaştırma basamakları uygulanmıştır. Gerçekleştirilen her iki yeniden katlama yöntemiyle elde edilen numuneler TEV proteaz enzimi kesimine tabi tutulmuş ancak kesim sonucunda monomerik ya da dimerik formda BMP2 proteini eldesi sağlanamamıştır. TEV proteaz enzimi kesimi sonrası reaksiyon ürünleri test tüpünde, sonrasında ise yükleme tamponu (liziz tamponu) ile diyaliz yapıldığı esnada büyük ölçüde agregasyona uğrayarak çökelti oluşturmuştur. Çökeltiden numune alınarak yapılan SDS-PAGE analizinde BMP2 proteinine ait olması muhtemel 13 kDa ya da homodimer yapıda 26 kDa büyüklüğünde protein bantları tespit edilememiştir. Kesim sonucunda 40~ kDa büyüklüğünde protein bantlarının gözlemlenmemesi TEV kesim işleminin gerçekleştiğini göstermektedir. Ancak hedef proteinimiz olan BMP2 proteini TEV kesimi sonrasında muhtemelen yeniden agregasyona uğramakta ve kaybedilmektedir. *E. coli* sistemi kullanılarak yapılmış benzer bir çalışmada rhBMP2 proteini ile small ubiquitin like modifier 3 (SUMO-3) proteini çözünür formda rhBMP2 eldesi için füzyon ortağı şeklinde üretilmiştir. Füzyon ortağı olan SUMO-3’ün gideriminin BMP2’nin agregasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Hanif, 2018). Yine TolAIII-3gp füzyonu enzim kesimi sonrası füzyon protein bileşenlerinin ayrılmadığı bildirilmiştir (Gökçe, İ., yayınlanmamış çalışma).

Füzyon proteinlerini oluşturan peptitler bazı durumlarda biyolojik özelliklerini füzyonlarından ayrılmadan füzyon kompleksi içinde de gösterebilirler. sfGFP peptitimizin, BMP2 ile füzyon durumunda olduğu halde kromofor özelliğini son derece etkili şekilde gösterdiği görülmüştür. Bundan yola çıkaraj BMP2 proteinin de benzer şekilde biyolojik özelliklerini gösterebileceği varsayılarak Saos-2 tip hücreler üzerinde MTT uygulaması yapılmıştır. pTf16 plazmidi ile koekspresyon yapılarak elde edilen hücre lizatından üç farklı yol ile saflaştırılan sfGFP-BMP2 füzyon proteini MTT uygulamasında ayrı ayrı tatbik edilmiştir. Uygulama neticesinde 0 – 1000 ng/mL arasında çeşitli konsantrasyonlarda BMP2 uygulanan hücrelerde 24. ve 48. saatte yapılan ölçümlerde BMP2 numunelerinin hücre canlılığını azaltıcı ya da, hücre proliferasyonunu arttırıcı etkisi saptanmamıştır

E. coli organizması yüksek ölçekte protein ekspresyonuna olanak tanımaktadır. Ancak ekspresyon edilecek protein ve host organizma arasındaki uyum üretilen proteinin nitelikli ve aktif olarak üretilmesi noktasında da son derece önemlidir. BMP2 proteinlerinin *E.coli*'de ekspresyonu pek çok çalışmada gösterilmiş ve bu çalışmalarda çoğu memeli proteini gibi agregasyona uğrayan BMP2 proteini inklüzyon cisimciklerinden yeniden katlama yoluyla geri kazanılmıştır. sfGFP- BMP2 proteini *E. coli* BL21-AI hücrelerinde başarılı bir şekilde üretilmiştir. Böylece çalışmamızda özgün kısım olan sfGFP ve BMP2 proteinlerinin füzyon halde biyoaktif olarak üretilmesi kısmî olarak başarılmıştır. Ancak TEV proteaz kesimi sonrası serbest kalan BMP2 agregasyona uğramış ve saf homodimer BMP2 eldesi mümkün olmamıştır. Tez sonrası çalışmalarda BMP2 ekspresyonu için, prokaryotik ve ökaryotik farklı host organizmalar ve protein ekspresyonunda avantajlar sağlayacak farklı füzyon proteini alternatifleri üzerinde düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adrio, J. L. ve Demain, A. L. 2010. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*, 1, 116–131.
- Aihanuwa., U.R.E., Chukwujekwu, K.R.O., Chuckwuemeke, C.F., 2017. Bone morphogenetic proteins an update and review. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 1(1):1-11.
- Anonim, 2007. Rapid and efficient purification and refolding of a (histidine)₆ -tagged recombinant protein produced in *E. coli* as inclusion bodies. Affinity Chromatography. Ge Healthcare Application notes, <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-16306-pdf> (14.2.2020).
- Anonim, 2010. <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/technical-documents/protocol/-cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt> (11.02.2020).
- Anonim, 2020a. Protein Data Bank. BMP2 proteinin üç boyutlu gösterimi. <https://www.rcsb.org/structure/6OMN> (8.2.2021).
- Anonim, 2020b. Clustal Omega Tool. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (05.01.2020).
- Anonim, 2020c. Takara chaperone plasmid manuals. https://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/9120-9125_e.v1810Da.pdf (7 Ocak, 2020).
- Anonim, 2022a. <https://www.divephotoguide.com/underwater-photography-special-features/article/science-technology-fluorescence-photography/> (30.7.2022).
- Anonim, 2022b. <https://www.labor.com.tr/urun/greiner-bio-one-622101-reaksiyon-tupu-5-ml-pp-ekli-kapakli-dereceli-100-adet-paket> (25.12.2022).
- Anonim, 2022c. <http://www.cellsignet.com/media/plates/48.jpg> (10.7.2022).
- Asahina, I., Sampath, T.K. ve Haushka, P.V. 1996. Human osteogenic protein-1 induces chondrogenic, osteoblastic, and/or adipogenic differentiation of clonal murine target cells. *Experimental Cell Research Latest Journal Impact*, 222: 38–47.
- Bächner, D. 1., Ahrens, M., Schröder, D., Hoffmann, A., Lauber, J., Betat, N., Steinert, P., Flohé, L. ve Gross, G. 1998. Bmp-2 downstream targets in mesenchymal development identified by subtractive cloning from recombinant mesenchymal progenitors (C3H10T1/2). *Development Dynamics*, 213(4):398-411.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A. ve Tsien, R. Y. 1999. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11241–11246.
- Balchin, D., Hayer-Hartl, M. ve Hartl, F. U. 2016. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*, 353 (6294): aac4354.
- Basu, A., Li, X., ve Leong, S.S. 2011. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 241–251.
- Bessho, K., Konishi, Y., Kaihara, S., Fujimura, K., Okubo, Y. ve Iizuka T. 2000. Bone induction by *Escherichia coli*-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38: 645-49.
- Bessa, P.C., Pedro, A.J., N. Klosch, B., Nobre, A. van Griensven, M., Reis, R.L. ve Casal, M. 2008. Osteoinduction in human fat-derived stem cells by recombinant human

- bone morphogenetic protein-2 produced in *Escherichia coli*, Biotechnology Letters, 30: 15-21.
- Bird, L.E. 2011. High through put construction and small scale expression screening of multi-tag vectors in *Escherichia coli*. Methods, 55, 29–37.
- Bokman, S. H. ve Ward, W. W. 1982. Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. Biochemistry, 21 (19): 4535–4540.
- Boyne, P.J., Marx, R.E., Nevins, M., Triplett, G., Lazaro, E., Lilly, L.C., Alder, M. ve Nummikoski, P. 1997. A feasibility study evaluating rhbmp-2/absorbable collagen sponge for maxillary references enhancing production of rhbmp-2 using 9dr peptides in cho expression system 109 sinus floor augmentation. International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry., 17: 11-25.
- Boyne, P.J., Nath, R. ve Nakamura, A. 1998. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate defects. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 36: 84-90.
- Boyne, P.J. 2001. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. The Journal of Bone and Joint Surgery, American volume, 83: 146-50.
- Borges, J. C. ve Ramos, C. H. 2005. Protein folding assisted by chaperones. Protein and Peptide Letters, 12 (3): 257–61.
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. ve Nohe, A. 2011. Bone morphogenetic proteins. A Clinical Review. Cellular Signaling, 23:609-620.
- Brejč, K., Sixma, T.K., Kitts, P.A., Kain, S.R., Tsien, R.Y., Ormo, M. ve Remington, S.J. 1997. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the Aequorea Victoria green fluorescent protein. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 94: 2306–2311.
- Brondyk, W.H. 2009. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. Methods in Enzymology, 463:131-47.
- Burgess, R.R. 2009. Refolding solubilized inclusion body proteins. Methods in Enzymology. 463, 259–282.
- Burkus, J.K., Dorchak, J.D. ve Sanders, D.L. 2003. Radiographic assessment of interbody fusion using recombinant human bone morphogenetic protein type 2. Spine, 28: 372-377.
- Carreira, A. C., Alves, G. G., Zambuzzi, W. F. ve Sogayar, M. C. 2014. Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications. Archives of Biochemistry and Biophysics, 561: 64-73.
- Carrio, M.M., ve Villaverde, A. 2002. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. Journal of Biotechnology. 96, 3–12.
- Ciocca, D. R., ve Calderwood, S. K. 2005. Heat shock proteins in cancer: diagnostic prognostic, predictive, and treatment implications. Cell Stress Chaperones, 10(2): 86-103.
- Chen, D., Ji, X., Harris, M. A., Feng, J. Q., Karsenty, G., Celeste, A. J., Rosen, V., Mundy, G. R. ve Harris, S. E. 1998. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. The Journal of Cellular Biology, 142: 295–305.
- Chen, D., Zhao, M., Mundy, G.R., 2004. Bone Morphogenetic Proteins. Growth Factors, 22(4), 233-241.

- Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F. M., Haydon, R. C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H. H., An, N., Breyer, B., ve Vanichakarn, P. 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *Journal of Bone and Joint Surgery Americal Volume*, 85-A: 1544–1552.
- Choi, S.H., Kim, C.K., Cho, K.S., Huh, J.S., Sorensen, R.G., Wozney, J.M., Wikesjö, U.M.E. 2002. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. *Journal of Periodontology*, 73(1):63-72.
- Choi, J. H., Keum, K. C., ve Lee, S. Y. 2006. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chem. Eng. Sci*, 61, 9.
- Clare, D. K., Bakkes, P. J., van Heerikhuizen, H., van der Vies, S. M. ve Saibil, H. R. 2009. Chaperonin complex with a newly folded protein encapsulated in the folding chamber. *Nature*, 457, 107–110.
- Cranjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Bustos-Valenzuela, J. C., Sogayar, M. C. ve Taga, R. 2005. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 1463-1473.
- Czekanska, E.M., Stoddart, M.J., Richards, R.G., ve Hayes J.S. 2012. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cell and Materials*, 24:1-17.
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.J. ve Bailly, S. 2007. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 1;109(5):1953-61.
- Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M., ve Harrison, R.G. 1999. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 65, 382–388.
- Dawson, K., Seeman, P., Sebald, E., King, L., Edwards, M., Williams, J., Mundlos, S. ve Krakow, D. 2006. GDF5 is a second locus for multiple-synostosis syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 78: 708–712.
- de Marco, A., de Marco, V. 2004. Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. *Journal of Biotechnology*, 109, 1-2, 45-52.
- de Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T., ve Bukau, B. 2007. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnology*, 7, 32.
- de Marco, A. 2009. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 8, 26.
- Devine, J.G., Dettori, J.R., France, J.C., Brodt, E. ve McGuire, R.A. 2012. The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk?. *Evidence-Based Spine-Care Journal*. 3, 35.
- Dixit, R. ve Cyr, R. 2003. Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *Plant J*, 36:280–290.
- Ducy, B. ve Karsenty, G. 2000. The Family of Bone Morphogenetic Proteins. *Kidney International*, 6:2207-2214.
- Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. ve Lorimer, G.H. 1989a. GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature*, 337, 44–47.

- Goloubinoff, P., Christeller, J.T. Gatenby, A.A. ve Lorimer, G.H. 1989b. Reconstitution of active dimeric ribulose biphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature*, 342 (6252): 884–9.
- Goodman, S.R., ed. 2008. Chapter 1 - Tools of the cell biologist: Green fluorescent protein. *Medical Cell Biology* (3rd ed.). Amsterdam: Elsevier/Academic Press. pp. 14–25.
- Goumans, M.-J., Zwijsen, A., Ten Dijke, P. ve Bailly, S. 2017. Bone morphogenetic proteins in vascular homeostasis and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(2).
- Govender, S., Csimma, C., Genant, H.K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., et. al. 2002. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 84(12):2123-34.
- Granjeiro, J.M., Oliveira, R.C., Bustos-Valenzuela J.C., Sogayar, M.C., Taga, R. 2005. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38:1463-1473.
- Graumann, K. ve Premstaller, A. 2006. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal*, 1(2):164-86.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., ve Minshull, J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22, 346–353.
- Hanahan, D. 1985. In: *DNA Cloning, A Practical Approach*. Volume I. Glover, D.M. ed. IRL Press, Ltd. London, UK. 109.
- Hanif, M.U. 2018. Expression, purification and characterization of recombinant human Bone Morphogenetic Protein 2. (Doktora Tezi). Institute of Molecular Biology and Biotechnology, The University of Lahore.
- Hartl, U.F. ve Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561):1852-8.
- Hartley, D. L. ve Kane, J. F. 1988. Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 16, 101–102.
- Hillger, F., Herr, G., Rudolph, R. ve Schwarz, E. 2005. Biophysical comparison of BMP-2, proBMP-2, and the free pro-peptide reveals stabilization of the pro-peptide by the mature growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15):14974-80.
- Hoffmann, A. ve Gross, G. 2001. BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. *Critical Review in Eukaryotic Gene Expressions*, 11(1-3):23-45.
- Hoffmann, A., Bukau, B. ve Kramer, G. 2010. Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research*, 1803 (6): 650–61.
- Howell, T.H., Fiorellini, J., Jones, A., Alder, M., Nummikoski, P., Lazaro, M. et al. 1997. A feasibility study evaluating rhbmp-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 17: 125-39.
- Hrubí, E., Imre, L., Robaszkiewicz, A., Virág, L., Kerényi, F., Nagy, K., Varga, G., Jenei, A. ve Hegedüs, C. 2018. Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin. *Human Cell*, 31(2), 139–148.
- Ishikawa, H., Itoh, K., Sugiura, F. ve Ishiguro, N. 2007. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Acta Orthopédica*, 8: 285-292.

- Inoue, H., Nojima, H. ve Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *National Library of Medicine*, 30;96(1):23-8.
- Javier, A.L., Doan, L.T., Luong, M., Reyes de Mochel, N.S, Sun, A., Monuki, E.S., et al. 2012. Bmp indicator mice reveal dynamic regulation of transcriptional response. *PLoS One* 7:e42566.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C. H., Vallenet, D., Yu, D. S., Choi, S. H, ve ark. 2009. Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394 (4): 644–52.
- Jin, W., Takagi, T., Kanesashi, S. N., Kurahashi, T., Nomura, T., Harada, J. ve Ishii, S. 2006. Schnurri-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. *Developmental Cell.*, 10 (4): 461–71.
- Kampinga, H. H. ve Craig, E. A. 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Rev. Mol Cell. Biol.*, 11, 579–592.
- Kane, J. F. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol*, 6, 494–500.
- Kapust, R.B., ve Waugh, D.S. 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*. 8, 1668–1674.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A. Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A. ve Suda, T., 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *The Journal of Cell Biology*, 127(6, 1):1755-66.
- Katagiri, T. ve Watabe, T. 2016. Bone Morphogenetic proteins. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, doi: 10.1101/cshperspect.a021899.
- Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M. ve Greenspan, D. S. 1991. Bone morphogenetic protein 1: The type I procollagen C-proteinase. *Science*, 271: 360–362.
- Khan, S. N. ve Lane, J.M. 2004. The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4 (5): 741–8.
- King, J.A., Marker, P.C, Seung, K.J., Kingsley, D.M.. 1994. BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Developmental Biology*, 166(1), 112-122.
- Kingsley, D.M., Bland, A.E., Grubber, J.M., Marker, P.C., Russell, L.B., Copeland, N.G., Jenkins, N.A.. 1992. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF- β superfamily. *Cell*, 71: 399–410.
- Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., Akioka, J., Okubo, Y., Ogawa, Y., Iizuka, T. 2000. The effect of blood supply in muscle and an elevated muscle flap on endogenous tissue-engineered bone by rhBMP-2 in the rat. *Annals of Plastic Surgery*, 45: 408-14.
- Leboy, P., Grasso-Knight, G., D'Angelo, M., Volk, S. W., Lian, J.V., Drissi, H., Stein, G. S. ve Adams, S. L. 2001. Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. *Journal of Bone and Joint Surgery*, pt1: 15-22.
- Lissenberg-Thunnissen, S. N., de Gorter, D. J., Sier, C. F. ve Schipper, I.B. 2001. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International Orthopaedics*, 9:1271-1280.

- Li, J., Soroka, J. ve Buchner, J. 2012. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 624–635.
- Lounev, V.Y., Ramachandran, R., Wosczyzna, M.N., Yamamoto, M., Maidment, A.D., Shore, E.M., Glaser, D.L., Goldhamer, D.J. ve Kaplan, F.S. 2009. Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 91: 652–663.
- Marie, P. J., Debais, F., ve Haÿ, E. 2002. Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. *Histology and Histopathology*, 17 (3): 877–85.
- Marvin, M., O'Rourke, D., Kurihara, T., Juliano, C. E, Harrison, K. L. ve Hutson, L. D. 2008. Developmental expression patterns of the zebra fish small heat shock proteins. *Developmental Dynamics*, 237 (2): 454–63.
- Medici, D., Shore, E.M., Lounev, V.Y., Kaplan, F.S., Kalluri, R. ve Olsen, B.R. 2010. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nature Medicine*, 16: 1400–1406.
- Melissis, S.C., Papageorgiou, A.C., Labrou, N.E. ve Clonis, Y.D. 2010. Purification of M-Mlvh-Rt on a 9-aminoethyladenine-(1,6-Diamine-Hexane)-triazine selected from a combinatorial library of dntp-mimetic ligands. *Journal of Chromatographic Science*, 48, 496-502.
- Miller, D.J. ve Fort, P.E. 2018. Heat shock proteins regulatory role in neurodevelopment. *Nerugenesis*, 12.
- Miroux, B., ve Walker, J.E. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260, 289–298.
- Miyazono, K., Kamiya, Y., Morikawa, M., 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *The Journal of Biochemistry*, 147(1), 35-51.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65 (1–2): 55–63.
- Murakami, N., Saito, N., Horiuchi, H., Okada, T., Nozaki, K., ve Takaoka K. 2002. Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP2) and a synthetic polymer. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(2):169-74.
- Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K. ve Imamura, T. 2003. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Molecular Biology of The Cell*, 14(7):2809-17.
- Murata, M., Huang, B.Z., Shibata, T., Imai, S., Nagai, N. ve Arisue, M. 1999. Bone augmentation by recombinant human bmp-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 28: 232-37.
- Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., Ono, K. ve Takaoka, K. 1994. Transient and Localized Expression of Bone Morphogenetic Protein4 Messenger RNA During Fracture Healing, *Journal of Bone and Mineral Research*, 9: 651–659.
- Nakayama, M. ve Ohara, O. A. 2003. System using convertible vectors for screening soluble recombinant proteins produced in *Escherichia coli* from randomly fragmented cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312, 825–830.

- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. ve de Crombrughe, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17–29.
- Nelsen, S. M. ve Christian, J. L. 2009. Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6, and PC7. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 27157–27166.
- Nishihara, K., Kanemori M., Yanagi, H. ve Yura, T. 2000. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66: 884–889.
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., Petersen, N.O., 2004. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signalling*, 16(3):291–9.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. ve Remington, S. J. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273 (5280): 1392–5.
- Pédélecq, J.B., Cabantous, S., Tran T., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S. 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 24(1):79–88.
- Pope, B., ve Kent, H. M. 1996. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Researchs*, 24, 536–537.
- Pouwels, L. J., Zhang, L., Chan, N. H., Dorrestein, P. C. ve Wachter, R. M. 2008. Kinetic isotope effect studies on the de novo rate of chromophore formation in fast- and slow-maturing GFP variants. *Biochemistry*, 47 (38): 10111–22.
- Pramesti, H.T., Suciati, T., Indrayati, A. Asjarie, S. ve Retnoningrum, D.S. 2012. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: optimization of overproduction, solubilization, renaturation and its characterization. *Biotechnology*, 11: 133–143.
- Raran-Kurussi, S., and Waugh, D.S. 2012. The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated. *PLoS One*, 7:e49589.
- Rengachary, S.S. 2002. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurgical Focus*, 13,1–6.
- Reddi, A. H. 2000. Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside. *Biochemical Society Transactions*, 28:345–349.
- Remington S.J. 2011. Green fluorescent protein: A perspective, *Protein Science*, 20:1509—1519.
- Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. *Experimental*. 18 (12): 571–573
- Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. 2014. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*, *Advances and Challenges*. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–17.
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T. ve Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H. ve Miyazono, K. 1995 .Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92:7632–7636.
- Sahdev, S., Khattar, S. K., and Saini, K. S. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem*, 307, 249–264.

- Saibil, H. R., Fenton, W. A., Clare, D. K. ve Horwich, A. L. 2013. Structure and allostery of the chaperonin GroEL. *J. Mol. Biol.* 425, 1476–1487.
- Saibil, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature* (14), 630-642 (2013).
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., ve D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746–8749.
- Schlegel, K. A., Thorwarth, M., Plesinac, A., Wiltfang, J. ve Rupprecht, S. 2006. Expression of bone matrix proteins during the osseous healing of topical conditioned implants: an experimental study. *Clinical Oral Implants Research*, 17 (6): 666–72.
- Sharapova, N.E., Kotnova, A.P., Galushkina, Z.M., Lavrova, N.V., Poletaeva, N.N., Tukhvatulin, A.E., Semikhin, A.S., Gromov, A.V., Soboleva, L.A., Ershova, A.S., Zaitsev, V.V., Sergienko, O.V., Lunin, V.G. ve Karyagina, A.S. 2010. Production of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli* and testing of its biological activity in vitro and in vivo. *Molecular Biology*, 44: 923–930.
- Shen, B., Bhargav, D., Wei, A., Williams, L.A., Tao, H., Ma, D.D.F., Diwan, A.D. 2009. BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation. *International Journal of Biological Sciences*, 5(2):192-200.
- Scheufler, C., Sebal, W., Hülsmeier, M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 287(1):103-15.
- Schmidt, F.R., 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiological Biotechnology*, 65: 363-372.
- Smith, D.B., ve Johnson, K.S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67, 31–40.
- Xiao, Y. T., Xiang, L.X ve Shao, J. Z. 2007. Bone morphogenetic protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362: 550–553.
- Tseng, Y.H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., Ahrens, M.J., et al. 2008. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 454: 1000–1004.
- Thomas, J.G., Ayling, A. ve Baneyx, F. 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Appl Biochem Biotech*, 66: 197-238.
- Tölli, H., Kujala, S., Jämsä, T. ve Jalovaara, P. 2011. Reindeer bone extract can heal the critical-size rat femur defect. *International Orthopaedics*, 35, 615-622.
- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem*, 67, 509–544.
- Tutar, L., Tutar, Y., 2011. Heat shock proteins; an overview. *Curr Pharm Biotechnol.* 11(2): 216-222.
- Urist MR, 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 150:893-899.
- Urist, M.R., Chang, J.J., Lietze, A., Huo, Y.K., Brownell A.G. ve Delange, R.J. 1987. Preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide fragments. *Methods in Enzymology*, 146, 294-312.
- Vallejo, L.F., M. Brokelmann, S. Marten, S. Trappe ve J. Cabrera-Crespo et al., 2002. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 94: 185-194.

- Vistica, V.T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. ve Boyd M.R. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*, 51(10):2515-20.
- Von Einem, S., Schwarz, E. ve Rudolph, R. 2010. A novel TWO-STEP renaturation procedure for efficient production of recombinant BMP-2. *Protein Expression and Purification*, 73: 65-69.
- Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M. ve LaPan P. 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 2220– 2224.
- Wang, E. A., Israel, D. I., Kelly, S. ve Luxenberg, D. P. 1993. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 cells and 3T3 cells. *Growth Factors* 9: 57–71.
- Weber-Ban, E. U., Reid, B. G., Miranker, A. D. ve Horwich, A. L. 1999. Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* 401, 90–93.
- Wei, Y., Thyparambil, A.A., ve Latour, R.A. 2014. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230nm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1844(12), 2331–2337.
- Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M.J., Morgan, D., Cslkasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez- Cuenca, S., et al. 2012. BMP8b increases brownadipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*, 49: 871–885.
- Wolfman, N.M., Hattersley, G., Cox, K., Celeste, A.J., Nelson, R., Yamaji, N., Dube, J.L., DiBlasio-Smith, E., Nove, J., Song, J.J., Wozney, J.M. ve Rosen V. Ectopic induction of tendon entiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest*, 1997 Jul 15; 100(2): 321-30.
- Wozney J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., ve Wang, E.A. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242: 1528-1534.
- Wurm, F.M. 2009. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11):1393-8.
- Yang, F., Moss, L. G. ve Phillips, G. N. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14 (10): 1246–51.
- Yang, H., Liu, L. ve Xu, F. 2016. The promises and challenges of fusion constructs in protein biochemistry and enzymology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100 (19): 8273–81.
- Young, J. C. 2010. Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Journal of Biochemistry and Cell Biolology*. 88, 291–300.
- Yu, P. B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E. ve Bloch, K. D. 1995. BMP type II receptor deletion reveals bmp ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells, 1995. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 24443–24450.
- Yu, K., Liu, C., Kim, B.G. ve Lee, D.Y. 2014. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnology Advences*, 33(1), 155-164.