



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**POLİETİLEN TEREFTALAT (PET) TÜRÜ PLASTİĞİ
PARÇALAYAN PETAZ ENZİMİNİN *Escherichia coli*'DE
BİYOTEKNOLOJİK OLARAK ÜRETİMİ**

Begüm Esra AYTAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Şule ARI**

Şubat, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 25.02.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Şule ARI(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Semian Karaer UZUNER
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Dilek KAZAN
Marmara Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33841 numaralı projesi ile desteklenmiştir

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Şule ARI başta olmak üzere, İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sürecinde ve dışında benimle birlikte büyük bir özveriyle çalışan, her daim desteklerini hissettiğim GeneOn Biyoteknoloji'nin çalışkan ekibine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca olduğu gibi bu süreçte de yanımda olan, destek ve sevgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında ve bu süreçte yanımda olan, her zaman desteğini hissettiğim yol arkadaşım sevgili Kaan GÖLÇEK'e teşekkür ederim.

Şubat 2021

Begüm Esra AYTAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. BİYOTEKNOLOJİ	5
2.1.1. Rekombinant DNA Teknolojisi.....	6
2.1.2. Mikrobiyal Enzim Üretimi	7
2.1.3. Atıkların Mikrobiyal Biyoremediasyonu	8
2.2. POLİETİLEN TEREFTALAT (PET) TÜRÜ PLASTİK	9
2.2.1. Plastik Sektöründe PET	10
2.2.2. PET Geri Dönüşüm Yöntemleri	11
2.3. PLASTİK PARÇALAYICI BAKTERİYAL VE FUNGAL ENZİMLER	14
2.3.1. PETaz Enzimi	16
2.3.2. PETaz Enziminin Rekombinant Üretimi Çalışmaları	18
2.4. BİYOİNFORMATİK.....	21
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	23
3.1. BAKTERİ IRKLARI	23
3.2. BESİYERLERİ	24
3.2.1 Luria Bertani Besiyeri	24
3.2.2. Super Optimal Broth – Katabolit Represyon (SOC)	25
3.3. PLAZMİTLER	26
3.3.1. PETaz Genini İçeren Klonlama Plazmiti (pTZ57R/T-PETaz).....	27
3.3.2. Ekspresyon Plazmiti (pET26b).....	28
3.4. BİYOİNFORMATİK TASARIM	30

3.4.1. PETaz Genini İçeren Ekspresyon Plazmitinin (pET26b-PETaz) Biyoinformatik Ortamda Görselleştirilmesi ve Genetik Konformasyonunun Belirlenmesi.....	33
3.5. PLAZMİTLERİN ÇOĞALTILMASI.....	35
3.5.1. Kompetant <i>E. coli</i> Bakterilerinin Hazırlanması	36
3.5.2. PETaz Genini İçeren Klonlama Plazmitinin (pTZ57R/T-PETaz) <i>E.coli</i> DH5 α 'ya Transformasyonu	36
3.5.3. Ekspresyon Plazmitinin <i>E. coli</i> DH5 α 'ya Transformasyonu	37
3.5.4. Transformasyon Etkinliğinin Hesaplanması	37
3.6. PLAZMİT İZOLASYONU	37
3.6.1. İzole Edilen DNA Örneklerinin Miktar ve Saflık Analizi.....	39
3.6.1.1. Spektrofotometrik Ölçüm	39
3.6.1.2. Agaroz Jelde Kontrol	40
3.7. REKOMBİNANT DNA'NIN OLUŞTURULMASI	41
3.7.1. PETaz Geni İçeren Klonlama Plazmitinin (pTZ57R/T-PETaz) Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi.....	42
3.7.2. Ekspresyon Plazmitinin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi	42
3.7.3. Agaroz Jel Elektroforezinde DNA Fragmentlerinin Ayrılması.....	43
3.7.4. DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Saflaştırılması	43
3.7.5. PETaz Geni ile pET26b Ekspresyon Plazmitinin Ligasyonu	45
3.8. REKOMBİNANT DNA'NIN ÇOĞALTILMASI VE SAFLAŞTIRILMASI.....	45
3.9. REKOMBİNANT DNA'NIN ANALİZİ VE KONTROLÜ.....	46
3.9.1. Koloni PCR	46
3.9.2. Rekombinant DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	48
3.10. PETAZ GENİNİN EKSPRESYONU	48
3.11. PETAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU	49
3.12. ENZİM KONSANTRASYONUNUN TAYİNİ	51
3.12.1. Absorbans Analizi	51
3.12.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	52
4. BULGULAR.....	54
4.1. BİYOİNFORMATİK YOLLA TASARLANMIŞ SENTETİK PETAZ GENİNİN ÖZELLİKLERİ	54
4.2. PTZ57R/T-PETAZ KLONLAMA, PET26B EKSPRESYON VE PET26B-PETAZ REKOMBİNANT PLAZMİTLERİ İÇİN TRANSFORMASYONUN DOĞRULANMASI.....	57
4.2.1. Transformantların Seçici Besiyerinde Kontrolü.....	58
4.2.2. Agaroz Jelde Kontrol.....	60

4.3. REKOMBİNANT DNA’NIN OLUŞTURULMASINDA KULLANILAN PLAZMİT DNA’LARININ ANALİZİ	61
4.3.1. Kalitatif Analiz	61
4.3.2. Kantitatif Analiz	61
4.4. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİLEN PLAZMİT VE KLONLANACAK DNA FRAGMENTLERİNİN KONTROLÜ	62
4.4.1. Restriksiyon Enzimleri ile Kesilen PETaz ve pET26b DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi.....	62
4.4.2. Agaroz Jelden Geri Kazanılan DNA Fragmentlerinin Kalitatif ve Kantitatif Analizi.....	63
4.5. REKOMBİNASYONUN DOĞRULANMASI	64
4.5.1. Koloni PCR ile Rekombinant DNA Varlığının Saptanması	64
4.5.2. Rekombinant DNA’nın Agaroz Jelde Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü	65
4.6. ENZİM ÜRETİMİNİN ANALİZİ	66
4.6.1. Spektrofotometrik Analiz Sonuçları.....	66
4.6.2. Bradford Analizi Sonuçları.....	67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Modern biyoteknolojinin tarihsel gelişimi.	6
Şekil 2.2: Rekombinant DNA teknolojisinin aşamaları.....	7
Şekil 2.3: TPA ve MEG moleküllerinin polimerizasyon tepkimesi ve PET oluşumu (Kaynak: Fawzy ve diğ., 2018).	10
Şekil 2.4: Farklı sektörlere göre PET türü plastik tüketiminin dağılımı. Yıl: 2016, toplam tüketim: 23.5 milyon ton (Plastics insight, 2018).....	11
Şekil 2.5: PET geri dönüşümünde kullanılan yöntemler.	12
Şekil 2.6: Plastik geri dönüşüm yöntemleri sonrası oluşan son ürünler (Taşdelen ve Oran, 2017).	13
Şekil 2.7: <i>Ideonella sakaiensis</i> tarafından salgılanan PETaz ve MHETaz enzimlerinin PET depolimerizasyon mekanizması (Kaynak: Taniguchi ve diğ., 2019'dan düzenlenmiştir).....	17
Şekil 2.8: PETaz enziminin 3 boyutlu yapısı üzerinde disülfid bağlarının yeri.	17
Şekil 2.9: PETaz enziminin PET üzerindeki enzimatik aktivitesi. PETaz enziminin potansiyel hidroliz bölgeleri ok ile işaretlenmiştir (Chen ve diğ., 2018), (Kaynak: UniProt A0A0K8P6T7'dan düzenlenmiştir.).....	18
Şekil 3.1: pTZ57R/T plazmiti haritası. AmpR: Ampisilin direnç geni. AmpR promoter: Ampisilin direnç geni promotörü. f1 ori: Faj kökenli Replikasyon orijini. lacZα: Marker gen. lac promoter: Lac operonuna ait promotör. lac operatör: Lac operonu. MCS: Çoklu klonlama bölgesi. ori: Bakteriyal replikasyon orijini.	27
Şekil 3.2: pTZ57R/T-PETase plazmiti haritası. AmpR: Ampisilin direnç geni. AmpR promoter: Ampisilin direnç geni promotörü. f1 ori: Faj kökenli Replikasyon orijini. lacZα: Marker gen. lac promoter: Lac operonuna ait promotör. lac operatör: Lac operonu. MCS: Çoklu klonlama bölgesi. ori: Bakteriyal replikasyon orijini. PETase: PETaz geni.	28
Şekil 3.3: pET26b plazmiti haritası. KanR: Kanamisin direnç geni. f1 ori: Faj kökenli Replikasyon orijini. lacZα: Marker gen. lac I promoter: Lac operonuna ait promotör. lac I: Lac operonu regülatörü. lac operatör: Lac operonu. MCS: Çoklu klonlama bölgesi. ori: Bakteriyal replikasyon orijini. pelB: pelB sinyal dizisi. rop: Primer represörü.	29
Şekil 3.4: PETaz geninin <i>E. coli</i> organizmasına göre kodon optimizasyonu için ExpOptimizer aracının kullanımı.	31
Şekil 3.5: DNA dizilerinin Benchling programına işlenmesi ve farklı bölgelerinin tanımlanması.	33
Şekil 3.6: Benchling programında restriksiyon enzimleri ile kesim işleminin simülasyonu.	34

Şekil 3.7: Benchling programında restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA fragmentlerinin ligasyon simülasyonu.	35
Şekil 3.8: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan “GeneON 1kb DNA Ladder”.....	41
Şekil 4.1: PETaz dizisi kodon optimizasyonu sonuçları.....	55
Şekil 4.2: Biyoinformatik olarak yeniden tasarlanmış optimize PETaz geni (909 bç).....	55
Şekil 4.3: PETaz geni ve pET26b plazmitinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonrasında agaroz jelde oluşması beklenen bantlar. 1) pET26b plazmit omurgası (5245 bç) ve MCS’a ait bölge (115 bç) 2) pTZ57R/T plazmit omurgası (2906 bç) ve PETaz geni (890 bç).....	56
Şekil 4.4: Biyoinformatik olarak tasarlanmış pET26b-PETaz rekombinant plazmiti.	57
Şekil 4.5: pTZ57R/T-PETaz plazmitinin <i>E. coli</i> DH5α bakterisine transformasyonu sonrası 100 µg/mL ampicilinli LBA besiyerinde gözlenen koloniler.	58
Şekil 4.6: pET26b plazmitinin <i>E. coli</i> DH5α bakterisine transformasyonu sonrası 50 µg/mL kanamisinli LBA besiyerinde gözlenen koloniler.	59
Şekil 4.7: pET26b-PETaz ligasyon reaksiyonunun <i>E. coli</i> DH5α’ya transformasyonu sonucu 50 µg/mL kanamisinli LBA besiyerinde gözlenen koloniler.	59
Şekil 4.8: Rekombinant pTZ57R/T plazmitinin transforme edildiği <i>E. coli</i> SHuffle bakterilerinin 50 µg/mL kanamisinli LBA besiyerinde oluşturduğu koloniler.	60
Şekil 4.9: <i>E. coli</i> DH5α bakterisine transforme edilip çoğaltıldıktan sonra izole edilen plazmitlerin agaroz jelde kontrolü. A) DNA Ladder. B) pTZ57R/T-PETaz plazmiti. C) pET26b plazmiti.	61
Şekil 4.10: Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA fragmentlerinin agaroz jelde kontrolü. A) DNA Ladder B) pTZ57R/T-PETaz plazmiti. C) pET26b plazmiti. D) <i>HindIII</i> ve <i>NdeI</i> enzimleri ile kesilmiş pTZ57R/T-PETaz plazmitine ait DNA fragmentleri. E) <i>HindIII</i> ve <i>NdeI</i> enzimleri ile kesilmiş pET26b plazmitine ait DNA fragmentleri.	63
Şekil 4.11: Restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jelden izole edilerek yeni bir agaroz jele yüklenerek kontrol edilen DNA fragmentleri. A) DNA Ladder. B) pET26b plazmit omurgası. C) PETaz geni.....	64
Şekil 4.12: Koloni PCR sonrası jelde gözlenen DNA fragmentleri. A) DNA Ladder. B) Negatif koloni. C) Negatif koloni. D, E, F, G ve H) Doğru ışına veren bantlar.....	65
Şekil 4.13: Rekombinant plazmitin agaroz jelde kontrolü. A) DNA Ladder. B, C ve D) 3 farklı koloniden izole edilerek <i>HindIII</i> ve <i>NdeI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilen pET26b-PETaz rekombinant plazmiti.....	65
Şekil 4.14: BSA standart grafiği.	67

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: PET'i hidroliz edebilen enzimler ve üretildikleri mikroorganizmalar.	15
Tablo 2.2: En çok kullanılan biyoinformatik veri tabanları.	22
Tablo 3.1 : Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> DH5 α ve <i>E. coli</i> SHuffle ırklarının özellikleri.....	23
Tablo 3.2 : “Luria Bertani Broth” (LBB) besiyeri bileşimi.....	24
Tablo 3.3 : “Super Optimal Broth” (SOB) besiyeri bileşimi.....	25
Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan plazmit vektörler.	27
Tablo 3.5: “GeneJET Spin Column” plazmit izolasyon kitinde bulunan tamponlar ve çalışmada kullanım amaçları.	39
Tablo 3.6: 50X TAE stok solüsyonunun bileşenleri.	40
Tablo 3.7: pTZ57R/T-PETaz plazmitinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu bileşenleri.	42
Tablo 3.8: pET26b ekspresyon plazmitinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu bileşenleri.	43
Tablo 3.9: “Vivantis GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)” Jelden DNA Saflaştırma kitinin içerisinde bulunan tamponlar ve çalışmada kullanım amaçları.	44
Tablo 3.10: Ligasyon reaksiyonu bileşenleri.....	45
Tablo 3.11: Koloni PCR'da kullanılan T7 primerlerine ait nükleotid dizileri.	46
Tablo 3.12: Kalıp DNA üzerine eklenen koloni PCR bileşenleri.....	47
Tablo 3.13: Koloni PCR reaksiyon koşulları.	47
Tablo 3.14: “MagneHis TM Protein Purification System” protein izolasyon kitinin içerisinde bulunan tamponlar ve çalışmada kullanım amaçları.	50
Tablo 3.15: A ₂₈₀ /A ₂₆₀ oranına bağlı olarak, örnekteki nükleik asit oranı (%) ve düzeltme faktörlerinin yaklaşık değeri (1 cm ışık yolu için).....	52
Tablo 4.1: <i>E. coli</i> DH5 α bakterisinden izole edilen pTZ57R/T-PETaz, pET26b ve pET26b-PETaz plazmitlerine ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları.	62
Tablo 4.2: Restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası agaroz jelden izole edilen pET26b plazmit omurgasının ve PETaz geninin spektrofotometrik ölçümü. dpET26b: Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pET26b plazmiti. dpETaz: Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş PETaz enzimi.....	63

Tablo 4.3: İzolasyon sonrası farklı PETaz enzimi gruplarına ait absorbens ölçümü.	66
Tablo 4.4: Enzim örneklerinin Bradford Analizi ile hesaplanan konsantrasyonları.	68



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
g	: Gram
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
Amp	: Ampisilin
BSA	: Bovine Serum Albumin
CAI	: Codon Adaptation Index
Cys	: Sistein
GC	: Guanin - Cytosine
IPTG	: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kan	: Kanamisin
KCl	: Potasyum klorür
LBA	: Luria Bertani Agar
LBB	: Luria Bertani Broth
LCC	: Leaf-branch Compost Cutinase
MEG	: Mono Etilen Glikol
MHET	: Mono Etilen Tereftalat
NGS	: Yeni Nesil Dizileme
OD	: Optik Dansite

PET	: Polietilen Tereftalat
rpm	: Revolutions per Minute
SOB	: Super Optimal Broth
SOC	: Super Optimal Broth with Catabolite Repression
TPA	: Tereftalik Asit



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

POLİETİLEN TEREFTALAT (PET) TÜRÜ PLASTİĞİ PARÇALAYAN PETAZ ENZİMİNİN *Escherichia coli*'DE BİYOTEKNOLOJİK OLARAK ÜRETİMİ

Begüm Esra AYTAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Şule ARI

Polietilen tereftalat (PET), dünya üzerinde en çok kullanılan ve dolayısıyla en çok çevre kirliliğine sebep olan plastik türlerinden biridir. PET'in, geri dönüştürülmesi için kullanılan ve birçok dezavantaja sahip fiziksel ve kimyasal yöntemler ile karşılaştırıldığında biyolojik geri dönüşüm, plastik materyalin bozunurluğunu artırmayan, toksik etkisi bulunmayan, düşük maliyetli ve etkin bir çözüm olarak öne çıkmaktadır. *Ideonella sakaiensis* bakterisi; salgıladığı Polietilen tereftalat hidrolaz (PETaz) ve Monoetilen tereftalat hidrolaz (MHETaz) enzimleriyle PET'i karbon kaynağı olarak kullanmak üzere monomerlerine parçalar. Günümüzde fiziksel ve kimyasal yöntemlerle geri dönüştürülen PET türü plastiğin biyoteknolojik yöntemler aracılığıyla geri dönüştürülmesi konusu özellikle son 10 yıldır yoğun bir biçimde çalışılmakta olup, diğer PET parçalayıcı enzimlere oranla sahip olduğu yüksek aktivite ve substrat özgüllüğü gibi avantajları nedeniyle PETaz enzimi bu alanda güçlü bir alternatif oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasında *I. sakaiensis* bakterisi tarafından üretilen PETaz enziminin, verimli ve etkin şekilde üretimi amacıyla yönelik olarak PETaz geninin biyoinformatik tasarımı ve *E. coli*'de biyoteknolojik olarak üretimi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; biyoinformatik yolla (1) PETaz geninde kodon optimizasyonun yapılması, (2) ekspresyon vektörü pET26b'ye klonabilmesi için gene, restriksiyon enzim kesim bölgelerinin eklenmesi, (3) üretilecek rekombinant proteini periplazmik alana yönlendiren, plazmite ait pelB sinyal dizisinin restriksiyon enzimlerinin sınırları içinde tutulması, (4) enzim üretimi sonrası saflaştırma yapılabilmesi için gene Histidin etiketinin eklenmesi ve biyoinformatik yolla tasarlanmış

sentetik genin rekombinant DNA teknolojisi ile ekspresyon vektöründe klonlanması, ardından da PETaz enziminin hücre sitoplazmasında yüksek aktivitede üretilmesi amacıyla, ürettiği DsbC proteini sayesinde disülfid bağlarını sitoplazma içerisinde yapma yeteneğindeki *E.coli* SHuffle bakterisine aktarılması hedeflenmiştir.

Belirlenen hedefler doğrultusunda bu tez çalışmasında *I. sakaiensis*'e ait orijinal PETaz geninin, aktif ve verimli olarak üretilebilmesi amacıyla, biyoinformatik olarak yeniden tasarımı gerçekleştirildi. Bu kapsamda; kodon optimizasyonu ile, tasarlanan sentetik PETaz geninde GC içeriği %68,73'ten %56,78'e düşürülürken, Kodon Adaptasyon Endeksi (CAI) 0.64'ten 0.80'e çıkarıldı. Genin 5' ucuna *NdeI*, 3' ucuna *HindIII* restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleri ile gen anlatımı sonrası üretilen enzimin bakteriden saflaştırılabilmesi için genin 3' ucuna 6'lı Histidin etiketine ait nükleotit dizisi eklendi. Tasarlanan PETaz geni pTZ57R/T plazmiti içerisinde sentetik olarak elde edildi ve transformasyon yolu ile transformasyon etkinliği: $4,5 \times 10^2$ CFU/ μ g olacak şekilde *E. coli* DH5 α bakterisinde başarıyla çoğaltıldı. PETaz geni, *E. coli* DH5 α 'dan izole edilen pTZ57R/T-PETaz plazmit DNA'sından *HindIII* ve *NdeI* restriksiyon enzimleri ile çıkarıldı. *E. coli* DH5 α 'ya transformasyonla aktararak (transformasyon etkinliği: $3,08 \times 10^2$ CFU/ μ g) çoğaltılmış ve izole edilmiş disülfid bağlı enzimlerin yüksek verimde üretilmesine olanak veren yüksek kopya sayılı bir ekspresyon vektörü olan pET26b ekspresyon plazmiti de aynı restriksiyon enzimleri ile kesildi. Agaroz jelde ayrılıp jelden saflaştırılmış beklenen boyutlardaki PETaz geni ve pET26b plazmit omurgasının T4 DNA Ligaz ile ligasyonu gerçekleştirilerek pET26b-PETaz rekombinant plazmiti elde edildi. Rekombinant plazmit, *E. coli* DH5 α 'da çoğaltılarak (transformasyon etkinliği: $1,62 \times 10^2$ CFU/ μ g), disülfid bağı taşıyan PETaz enziminin sitoplazmada üretilebilmesi için disülfid bağlarını yapabilme yeteneğindeki *E. coli* SHuffle bakterisine de $1,24 \times 10^3$ CFU/ μ g etkinliğinde transformasyon ile aktarıldı. Koloni PCR ile rekombinant plazmiti içerdiği saptanan 4 koloniden kurulan kültürlerde 100 mM IPTG ile gen anlatımı indüklendi. Bu kültürlerin 3'ünden PETaz enzimi, polihistidin etiketli proteinlerin izolasyonunu sağlayan manyetik saflaştırma sistemi ile saflaştırıldı. Enzim saflığı 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü ve Bradford Yöntemi ile analiz edildi. Rekombinant hücrelerden yüksek verimle izole edilen bu 3 örnekteki saf protein konsantrasyonları sırasıyla 0.935, 0.56 ve 0.59 mg/mL olarak belirlendi. İndüksiyon sonrası toplanarak lizize uğratılan 4. kültüre ait homojenattaki toplam protein konsantrasyonu ise 3.9544 mg/mL olarak belirlendi. Protein izolasyonu sonrası elde edilen en düşük ve en yüksek saf protein konsantrasyonlarının, *Chlamydomonas reinhardtii*'den elde edilen saf protein konsantrasyonlarından 1.44 ile 2.44 kat, total protein miktarının da *E.coli*'ye ait en düşük ve en yüksek total protein miktarlarından 29 ile 60 kat daha fazla olduğu saptandı.

Bu tez çalışmasında, PETaz geninin pET26b ekspresyon plazmitinde klonlanarak verimli bir şekilde çoğaltılabilmesi ve sitoplazma içerisinde disülfid katlanmalarını yapabilen *E.coli* SHuffle bakterisinde yüksek konsantrasyonda enzim üretilip saflaştırılabilmesi; PETaz enziminin biyoinformatik tasarımının ve uygulanan genetik mühendisliği yaklaşımlarının başarıyla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Elde edilen bulgular, PET türü plastiğin biyoteknolojik yolla geri dönüştürülmesinde önemli bir potansiyele sahip olan PETaz enziminin büyük ölçekte üretimi için kullanılabilir.

Şubat 2021, 100 sayfa.

Anahtar kelimeler: Biyoteknoloji, *Ideonella sakaiensis*, *Escherichia coli*, PET, PETaz, biyoinformatik, sentetik biyoloji

SUMMARY

M.Sc. THESIS

BIOTECHNOLOGICALLY PRODUCTION OF POLYETHYLENE TEREPHTHALATE (PET) - TYPE PLASTIC DEGRADING ENZYME PETASE IN *Escherichia coli*

Begüm Esra AYTAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Şule ARI

Polyethylene terephthalate (PET) is one of the most used plastic types in the world, thus causing the most environmental pollution. Compared to physical and chemical methods used for recycling PET, biological recycling stands out as a low-cost and effective solution that does not increase the degradability of the plastic material and does not have toxic effects. *Ideonella sakaiensis* bacterium; degrades PET into its monomers with Polyethylene terephthalate hydrolase (PETase) and Monoethylene terephthalate hydrolase (MHETase) enzymes it secretes and uses these monomers as carbon source. The issue of recycling PET type plastic, which can be recycle by physical and chemical methods at the present time, through biotechnological methods has been studied intensively for the last decade, and PETase enzyme constitutes a strong alternative in this field.

In this thesis, it is aimed to bioinformatically design PETase enzyme, which is produced by *I. sakaiensis* bacterium and hydrolyzes PET to MHET in an efficient and effective manner, and biotechnologically produce it in *E. coli* bacterium. For this goal; by using bioinformatics tools, (1) codon optimization of PETase gene, (2) addition of restriction enzyme cleavage sites to the gene for cloning into pET26b expression vector, (3) keeping the pelB signal sequence of plasmid that directs the recombinant protein to be produced to the periplasmic area within the boundaries of the restriction enzymes, (4) addition of the Histidine tag to the gene that needed for purification after the enzyme production, and cloning of the bioinformatically designed

synthetic gene into expression vector by recombinant DNA technology; then, produce PETase enzyme with high activity in the cytoplasm of the cell with high activity, it was aimed to be transferred to *E.coli* SHuffle bacteria, which is capable of making disulfide bonds in the cytoplasm, thanks to DsbC protein in it produces.

In this thesis, the original PETase gene of *I. sakaiensis* was bioinformatically redesigned in order to be able to produce actively and efficiently. In this context, with codon optimization of the designed synthetic PETase gene, the GC content was reduced from 68.73% to 56.78%, while the Codon Adaptation Index (CAI) was increased from 0.64 to 0.80. The *NdeI* at the 5' and *HindIII* restriction enzymes recognition sites at the 3' end and the nucleotide sequence of 6X Histidine tag were added to the 3' end of the gene so that the enzyme produced after gene expression can be purified from bacteria. The designed PETase gene was synthetically obtained in pTZ57R/T plasmid successfully transferred to *E.coli* by transformation with a transformation efficiency of 4.5×10^2 CFU / μg . The PETase gene was extracted from pTZ57R/T-PETase plasmid DNA that was amplified and isolated in *E.coli* DH5 α with *HindIII* and *NdeI* restriction enzymes. The pET26b expression plasmid, which was previously amplified with transferred into *E. coli* DH5 α by transformation (transformation efficiency: $3,08 \times 10^2$ CFU/ μg) and then isolated from bacteria, was also cut with the same restriction enzymes. PETase gene and pET26b plasmid backbone with expected size isolated from agarose gel and put into the ligation reaction with T4 DNA Ligase enzyme. Thus, the pET26b-PETase recombinant plasmid was obtained. The obtained pET26b-PETase recombinant plasmid was successfully transformed to *E. coli* DH5 α bacteria for amplification, with a transformation efficiency: 1.62×10^2 CFU/ μg . Then, the obtained recombinant plasmid was transferred by transformation to *E. coli* SHuffle bacterium, which is capable of making disulfide bonds in the cytoplasm, in order to produce PETase enzyme in cytoplasm which carries 2 disulfide bonds, transformation efficiency: 1.24×10^3 CFU/ μg . By the colony PCR technique, 4 colonies determined to contain the recombinant plasmid were selected and gene expression was induced with 100 mM IPTG. After the induction, PETase enzyme was purified from 3 out of 4 clone cultures by magnetic purification system that enables isolation of polyhistidine tagged proteins. Enzyme purity was analyzed spectrophotometrically at 280 nm wavelength by absorbance measurement and Bradford Assay. Pure protein concentrations of these 3 samples, isolated from recombinant cells with high yield, were determined as 0.935, 0.56 and 0.59 mg/mL. The homogenate of fourth culture was used as a protein source. The total protein concentration in this sample was determined as 3.9544 mg/mL. It was determined that the lowest and highest pure protein concentrations obtained after protein isolation were 1.44 and 2.44 times higher, respectively, compared to the lowest and highest pure protein concentrations obtained from *Chlamydomonas reinhardtii*. Again, in this study, the total amount of protein obtained from bioinformatically redesigned and produced PETase gene were 29 and 60 times higher than the lowest and highest total protein amounts that are obtained from the medium of *E. coli* in an previous study, which MalE and LamB signal sequences were used for the production of PETase enzyme in the periplasm of *E.coli*.

In this thesis, the ability to reproduce the PETase gene efficiently by cloning in the pET26b expression plasmid, and produce and purification of high concentration enzyme in *E.coli* SHuffle bacterium, which can make disulfide bonds in th cytoplasm reveals that; th codon optimisation based bioinformatics design of the PETase enzyme and the applied genetic engineering approaches have been successfully implemented. The findings obtained can be used for large scale production of PETase enzyme, which has an important potential in biotechnological recycling of PET type plastic.

February 2021, 100 pages.

Keywords: Biotechnololgy, *Ideonella sakaiensis*, *Escherichia coli*, PET, PETase, bioinformatics, synthetic biology



1. GİRİŞ

Polietilen tereftalat (PET), plastik endüstrisinde en sık kullanılan termoplastiklerden biri olup, gıda, tekstil, imalat sanayi gibi işlem hacmi geniş sektörler başta olmak üzere, günlük hayatta birçok alanda kullanılmaktadır. Dayanıklılığı, şeffaf görünümde olması, gaz bariyeri özelliğine ve termal kararlılığa sahip olması gibi fiziksel özelliklerinin yanında; uygun maliyetli olmasının da katkısıyla PET, dünyada en çok kullanılan termoplastik polimerdir. (Thompson ve diğ., 2009, Tuly ve diğ., 2019). Dünya üzerinde çok fazla miktarda kullanılan PET'in yarattığı kirlilik ise küresel bir sorun haline gelmiş olup, PET atıklarının azaltılmasının en etkili yolu geri dönüşümdür. Geniş kullanım alanı ve fiziksel nitelikleri de PET'i geri dönüştürülebilir malzemeler arasında oldukça değerli hale getirmiştir (Sinha ve diğ., 2010; Bartolome, 2012; Malik ve diğ., 2016). Bu nedenle PET'in geri dönüşümü için geçmişten bu yana bazı fiziksel ve kimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler temel olarak birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül geri dönüşüm yöntemleri olarak gruplara ayrılırlar. Birincil geri dönüşüm, PET geri dönüşümünde en eski yöntemlerden biri olup, tek tip ve başka plastiklerle kirlenmemiş PET atıkların yeniden ekstrüzyon (şekillendirme) işlemine sokularak geri dönüştürüldüğü uygulamadır. Kısıtlı ilk ürün kapasitesi ve düşük kaliteli son ürünler vermesi sebebiyle günümüzde tercih edilmemektedir. (Al-Salem 2009; Al-Salem ve diğ., 2009). İkincil geri dönüşüm, plastiklerin yıkanıp ayrıştırıldıktan sonra öğütülerek ısı ile yeniden şekillendirildiği mekanik bir yöntem olup (Aguado ve Serrano, 1999), plastiğin bozunma oranını artırması ve renk bozulmalarına yol açması nedeniyle son ürün kalitesinin düşmesine sebep olur (Bartolome, 2012). Üçüncül geri dönüşüm kimyasal yöntemleri kapsamakta olup, solvoliz veya piroliz reaksiyonları ile PET'in monomerlerine ya da oligomerlerine kadar ayrıştırılmasını sağlar. Bu monomerler daha sonra yüksek kalitede PET üretmek üzere hammadde olarak kullanılabilir (Sinha ve diğ., 2010). Ancak kullanılan pahalı ekipmanlar ve kimyasallar sebebiyle bu yöntem oldukça maliyetlidir. Dördüncül geri dönüşüm ise atık plastik malzemenin yakılması yoluyla enerji elde edilen geri kazanımı yöntemidir. Bu yöntem de yarattığı koku ve toksik madde salınımı sebebiyle ekolojik olarak kabul edilemez sonuçlar doğurmaktadır (Bartolome, 2012).

Artan kirlilik ve geri dönüşüm yöntemlerinin yetersizliği sebebiyle bu yöntemlere göre daha verimli ve çevre dostu olan, PET ve diğer plastik atıkların yerinde biyoremediasyonu veya

toplandıktan sonra biyoteknolojik yöntemlerle geri dönüştürülmesi, son yıllarda önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalar, özellikle ekonomik olarak kısıtlı imkanlar söz konusu olduğunda biyolojik bozunmanın plastik atık kontrolünde en etkili yöntem olduğunu göstermiştir (Nakkabi ve diğ., 2015). Bu nedenle bakteriyal ve fungal mikroorganizmalar başta olmak üzere plastik atıkların biyoteknolojik araçlarla geri dönüşümü için birçok çalışma yapılmıştır. Bu biyoteknolojik araçlar arasından bakteriler, enzimatik reaksiyonları yüksek etkinlikte ve düşük maliyetle gerçekleştirmeleri sebebiyle önemli bir potansiyele sahiptir.

2016 yılında Yoshida ve diğ.'nin yaptığı çalışmada ilk kez bildirilen *Ideonella sakaiensis* bakterisi, salgıladığı PETaz ve MHETaz enzimleriyle PET türü plastiği oligomer ve monomer düzeyinde parçalayarak karbon kaynağı olarak kullanır. Yine aynı çalışmada, PETaz enziminin, şimdiye kadar bildirilmiş ve kendisine en yakın aktiviteye sahip PET parçalayıcı enzim olan leaf-branch compost cutinase (LCC)'ye göre 48 kat daha aktif olduğu bildirilmiştir. Bu durum PETaz enziminin diğer PET parçalayıcı enzimlere göre PET geri dönüşümünde çok daha önemli bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, *Ideonella sakaiensis* bakterisi tarafından salgılanan ve PET parçalayıcı aktiviteye sahip olduğu bilinen PETaz enziminin biyoinformatik olarak yeniden tasarlanarak *E. coli* bakterisinin sitoplazmasında biyoteknolojik olarak üretimi amaçlanmıştır.

E. coli, 1982 yılında ilk rekombinant ürün olan insan insülin hormonunun üretiminden bu yana rekombinant protein üretimi için sıklıkla kullanılmaktadır. *E. coli*, genetik çalışmalar için model bir organizma olup, özelliklerinin iyi bilinmesi, üreme ve üretim kapasitesinin yüksek olması, genetik değişikliklerin yapılabilmesi ve bu değişiklikleri gözlemlemenin kolay olması, ayrıca enzimlerin büyük ölçekte üretimine yönelik süreçlerin optimize edilmiş olması nedeniyle bu çalışma kapsamında da enzim üretimi için konak organizma olarak seçildi.

Bir proteinin rekombinant DNA teknolojisi ile üretiminde başarıyı sağlayan DNA düzeyindeki en önemli iki faktör GC içeriği ve CAI (Kodon Adaptasyon Endeksi)'dir. GC içeriğinin %40'tan az olması DNA'nın stabilitesini olumsuz yönde etkilerken, %60'tan fazla olması da konak mikroorganizmada toksisiteye ve ölüme yol açabilir. CAI, bir DNA dizisindeki her bir kodonun kullanım eğilimine (CUB: Codon Usage Bias) göre hesaplanır ve dizinin konak organizmada proteine dönüşme kapasitesini ifade eder. CAI değerinin artırılması, hedef proteinin anlatım düzeyinin artmasını sağlar. Bu nedenle rekombinant üretimi hedeflenen

proteine ait genin GC içeriğinin %40-60 aralığında olması ve CAI'nin ise genin tasarım öncesi sahip olduğu değere göre artırılması gen anlatımının başarı oranını artırır (Levin ve Van Sickle 1976; Sharp ve Li, 1987; Yakovchuk, 2006). *I. sakaiensis*'in orijinal PETaz genine ait GC içeriği %68,73 ve CAI 0.64 iken; bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen biyoinformatik kodon optimizasyonu işlemi sonrasında GC içeriği %56.78'e düşürülürken, CAI ise 0.80'e çıkarıldı. Biyoinformatik tasarım çalışmaları ile aynı zamanda, vektöre klonlama yapabilmek için optimize gen dizisinin disülfid bağlı enzimlerin yüksek verimde üretilmesine olanak veren yüksek kopya sayılı bir ekspresyon vektörü olan pET26b vektöründe de kesim bölgeleri bulunan restriksiyon enzimlerinden *NdeI* kesim bölgesi genin 5' ucuna, *HindIII* kesim bölgesi ise 3' ucuna eklendikten sonra, daha sonraki çalışmalarda farklı restriksiyon enzimleri ya da farklı vektörler ile çalışma gerekliliği duyulması halinde kullanılması amacıyla her iki uçta bu enzimlerin dışında kalacak şekilde *StuI* enzimi kesim bölgesi eklendi. Yine, enzimin *E.coli*'de üretimi ve izolasyonu sonrası saflaştırılabilmesi için PETaz geninin şifreleme yapan DNA dizisinin bitimini takiben 3' ucuna 6'lı Histidin etiketine ait nükleotit dizisi eklendi. PETaz enziminin ve pET26b plazmitinin *HindIII* ve *NdeI* enzimleriyle kesilmesi biyoinformatik ortamda simüle edilerek enzim kesimi sonrası agaroz jelde elde edilmesi beklenen DNA fragmentleri görselleştirildi. Yine biyoinformatik ortamda PETaz genine ve pET26b plazmit omurgasına ait DNA fragmentleri seçilerek bu fragmentlerin ligasyon işlemi için uygunluğu analiz edildi. Başarılı ligasyon işlemi sonrasında elde edilmesi hedeflenen pET26b-PETaz rekombinant plazmiti biyoinformatik ortamda görselleştirildi. Bu işlemlerin sonucunda pET26b-PETaz rekombinant plazmitinin büyüklüğü, üzerinde yer alacak bölgeler ve PETaz geninin plazmit üzerindeki konumu gibi parametreler belirlendi.

Biyoinformatik yollarla tasarlanan PETaz geni pTZ57R/T plazmiti içerisinde sentetik olarak elde edildi. pET26b ve pTZ57R/T-PETaz plazmitleri *E.coli* DH5 α bakterisine transformasyon ile aktararak çoğaltıldı ve izole edildi. Rekombinant plazmiti elde etmek amacıyla PETaz geni, pTZ57R/T-PETaz plazmitinden *HindIII* ve *NdeI* restriksiyon enzimleri ile kesilip agaroz jelden izole edildikten sonra; aynı restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jelden izole edilen pET26b plazmit omurgası ile ligasyon işlemine sokuldu. Ligasyon işlemi sonrasında elde edilmesi hedeflenen pET26b-PETaz plazmitlerinin çoğaltımı amacıyla ligasyon reaksiyonu ürünleri *E.coli* DH5 α 'ya transformasyonla aktarıldı. Transformasyon sonrası kanamisin antibiyotiği içeren seçici besiyerinde transformant bakteri kolonileri elde edildi. Bu koloniler arasından rekombinant pET26b-PETaz plazmitini taşıyanların seçimi için, koloni PCR

uygulandı. Koloni PCR işlemi sırasında plazmite ait T7 promotör ve terminatör dizileri arasında bulunan PETaz genini çoğaltmak ve rekombinant kolonileri belirlemek amacıyla T7 primerleri kullanıldı. Koloni PCR sonrası rekombinant plazmiti taşıdığı belirlenen 4 adet koloni ile çalışmalara devam edildi. *E.coli* DH5 α 'dan izole edilen rekombinant plazmitler, *E. coli* SHuffle bakterisine transformasyon ile aktarıldı ve IPTG ile gen anlatımı indüklendi. Enzim üretimi için, ürettiği DsbC proteini sayesinde sitoplazmada disülfid bağlı proteinleri üretme yeteneğindeki *E.coli* SHuffle bakterisinin kullanılmasıyla, 2 adet disülfid bağı taşıyan PETaz enziminin *E.coli*'de uygun üç boyutlu yapıda ve aktif bir şekilde üretimi gerçekleştirildi. Enzim üretimi sonrasında Histidin etiketi taşıyan PETaz enzimi; Histidin etiketine bağlanma özelliği taşıyan Nikel parçacıklarının kullanıldığı manyetik saflaştırma sistemi ile saflaştırıldı. Saflaştırılan enzim örnekleri absorbans ölçümü ve Bradford Yöntemi ile spektrofotometrik olarak analiz edildi.

Elde edilen bulgular, *E. coli*'nin, PETaz enzimi üretimi için uygun bir konak organizma olduğunu; bakterinin sitoplazması içerisinde PETaz enziminin uygun üç boyutlu yapıda ve verimli şekilde üretilebileceğini göstermiştir. Enzimin aktif ve verimli şekilde üretilmesinde uygun ekspresyon vektörü ve konak organizma seçiminin, kültür koşulları optimizasyonunun, genetik optimizasyon ve manipülasyonların önemli ölçüde etkisi bulunmaktadır. *Ideonella sakaiensis* organizmasındaki doğal formunda ekstraselüler olarak üretilen PETaz enzimi, bu çalışmada hücre dışına ya da periplazmaya yönlendirilmek yerine; sitoplazmada disülfid bağlarını yapabilme yeteneğindeki *E.coli* SHuffle bakterisinde hücre içi üretimi gerçekleştirildikten sonra izole edilmiştir. Böylece enzimin üretim verimi ve disülfid bağlarının oluşma etkinliği artırılmıştır. Bu tez çalışmasında uygulanan biyoinformatik tasarım ve genetik mühendisliği yaklaşımlarının enzimin aktivitesini, stabilitesini, üretim verimini artırdığı ve enzim saflaştırılmasında başarılı bir biçimde kullanılabileceği gösterilmiştir. Elde edilen bu sonuçların endüstriyel PET geri dönüşümünde kullanılmak üzere PETaz enziminin *E. coli* bakterisinde büyük ölçekli üretimine temel oluşturacağı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

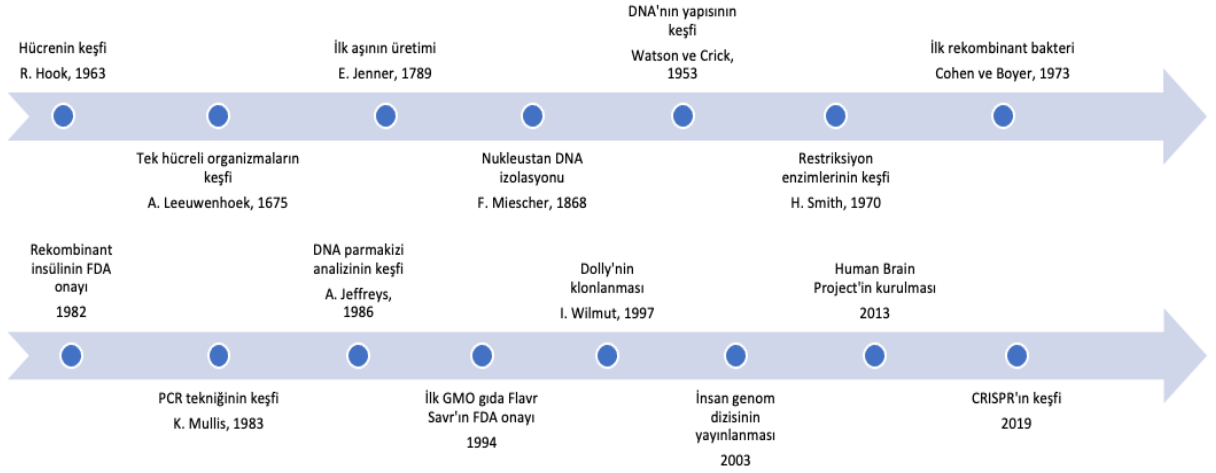
2.1. BİYOTEKNOLOJİ

Biyoteknoloji, yeni bir ürün elde etmek ya da var olan ürünlerin özelliklerini, bitki ve hayvanları geliştirmek, insan yaşamını iyileştirmek için canlı organizmaları veya organizmalara ait farklı sistem, süreç ve kısımları kullanan biyolojik teknolojiler olarak tanımlanır (Mosier ve Ladisch 2008; Adamu ve diğ., 2016).

İnsan hayatında biyoteknolojinin yeri oldukça eski tarihlere dayanmaktadır. Biyoteknolojinin tarihi Sümer, Neolitik ve Babil toplumlarının şarap ve bira üretmek için üzüm ve tahılların fermentasyonunu kullanması ile başlar ve günümüzden yaklaşık 9000 yıl öncesine dayanır. Bu gelişmeyi maya fermentasyonunu kullanarak ekmek üretimini gerçekleştiren Mısırlılar takip etmiştir. Biyoteknolojinin tıp alanında kullanıldığı ilk örnekler ise orta kulak hastalığının tedavisi için sirke üretip kullanan Asurlular (M.Ö. 3500) ile Hipokrat'a (M.Ö. 400) dayanır (Mustafa ve diğ., 2018). Fermentasyon endüstrisi ise asıl olarak, Pasteur'ün 1857'de alkol fermentasyonuna mayaların neden olduğunu bilimsel olarak kanıtlamasından sonraki 100 yıl içerisinde oldukça hızlı bir şekilde gelişmiştir (Bucholz & Collins, 2013).

Özellikle DNA'nın keşfinden sonra, 20. yy'ın ortalarından itibaren yenilenebilir biyoyakıt eldesi ve tarım ürünlerinin geliştirilmesi için kullanılan biyoteknolojik uygulamalarda önemli gelişmeler olmuştur (Houghton ve diğ., 2006). Bugün gelinen noktada modern biyoteknoloji, multidisipliner çalışmanın bir ürünü olarak insan hayatında birçok alana dokunan dev bir sektör haline gelmiştir. Günümüzde biyoteknoloji endüstrisi gıda ürünleri, içecekler, çözücüler gibi önemli ürünleri elde etmek için mikrobiyal fermentasyon süreçlerinin manipülasyonundan; antibiyotik ve terapötik değeri olan maddelerin üretimine kadar çok çeşitli uygulamalar içermektedir (Demain ve diğ., 2016).

Hücrenin keşfinden bu yana modern biyoteknolojinin gelişiminde meydana gelen önemli olaylar Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

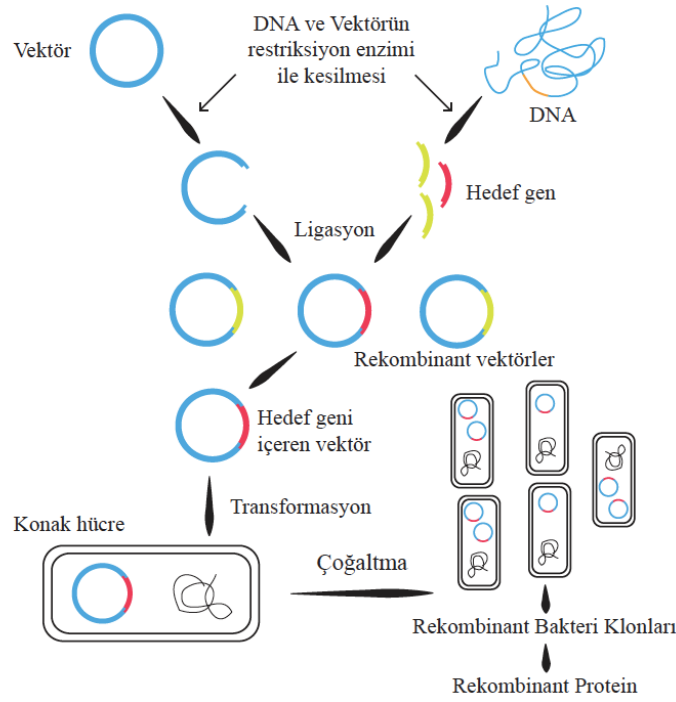


Şekil 2.1: Modern biyoteknolojinin tarihsel gelişimi.

2.1.1. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA Teknolojisi, genellikle farklı türdeki organizmalara ait olan DNA moleküllerinin genetik mühendisliği tekniklerinden yararlanarak bir araya getirilmesini ve oluşan rekombinant DNA molekülünün gen ürünlerinin üretilebileceği uygun bir konak organizmaya klonlanmasını kapsayan bir teknolojidir. Rekombinant DNA teknolojisi ile meydana getirilen değişikliklerin doğada kendiliğinden gerçekleşmesi mümkün değildir. Bu teknolojinin uygulanmasındaki amaç; hedef DNA'yı istenen yönde manipüle ederek yeni bir genetik kombinasyon meydana getirmek ve böylece farklı amaçlara hizmet eden ürünlerin bol miktarda üretimini mümkün kılmaktır. Rekombinant DNA teknolojisi, bu teknolojinin ürünlerinin, araştırma, sağlık, çevre, gıda, tarım ve biyomühendislik alanlarında sıklıkla kullanıldığı temel moleküler biyolojik bir tekniktir.

Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimindeki en önemli keşif, bakterilerin yabancı viral DNA moleküllerini parçalaması sırasında kullandığı restriksiyon endonükleazları olmuştur (Mertz ve Davis, 1972). Bu keşif sayesinde genetik bilimi ile uğraşan bilim insanları DNA'yı "kesme" ve "yapıştırma" yoluyla manipüle edebileceklerini düşünmüşlerdir. 1972 yılında ise Stanley Cohen ve Herbert Boyer rekombinant DNA teknolojisini geliştirmişlerdir (Cohen ve diğ., 1973). Rekombinant DNA teknolojisinin aşamaları Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2: Rekombinant DNA teknolojisinin aşamaları.

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen ilk biyoteknoloji ürünü insan insülin hormonudur. İnsan insülin geni bakteriyal plazmite restriksiyon enzimleri aracılığıyla klonlanmış ve oluşan rekombinant DNA molekülü *E. coli* organizmasına transforme edilmiştir (Cohen ve diğ.,1973). Böylece insan insülin hormonunun *E. coli*'de rekombinant üretimi sağlanmıştır. Rekombinant DNA teknolojisini kullanarak üretilen ve 1982 yılında FDA tarafından onaylanan ilk lisanslı ilaç da Boyer ve Cohen'in kurucuları olduğu Genentech firması tarafından üretilen ve Eli Lilly firması tarafından lisanslanan insan insülini (humulin) olmuştur (Johnson, 1983).

2.1.2. Mikrobiyal Enzim Üretimi

Enzimler, canlı organizmalarda tüm metabolik aşamalarda ve biyokimyasal reaksiyonlarda önemli işlevlere sahip biyolojik katalizörlerdir. Birçok enzim, etki ettiği substrat veya etki mekanizması sebebiyle endüstriyel uygulamalar için ticari öneme sahiptir. Bu nedenle de enzimlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve üretimi gibi konular 20. yy başlarından itibaren önem kazanmıştır ve günümüzde halen biyoteknolojinin en yaygın çalışma alanları arasında yer alırlar (Nigam, 2013; Thakur ve diğ., 2020). Bakteriler ve fungusların doğal ve geliştirilmiş formları; enzimlerin endüstriyel üretimine en uygun mikroorganizmalar olup, günümüzde

birçok farklı endüstride yaygın olarak kullanılan çok sayıda enzimin üretiminde kullanılmaktadır (Patel ve diğ., 2017). Mikroorganizmalara fermentasyon süreçlerinin uygulanmasıyla, istenen son ürün olan enzimleri elde etmek için belirli parametrelerden yararlanarak mikroorganizmalar çoğaltılır (Vittaladevaram, 2017). Daha sonra üretilen enzimler ilgili alanlarda kullanılmak üzere, üretilen enzim ve üretim sırasında kullanılan organizmaya uygun yöntemlerle saflaştırılır.

Günümüzde en çok kullanılan ve bu nedenle de endüstriyel önem taşıyan enzimlerin birçoğu mikrobiyal kökenlidir. Bu da endüstriyel enzimlerin üretiminde mikroorganizmaların kullanımını artıran önemli etkenlerden biridir. Endüstriyel açıdan önemli mikrobiyal enzimlerin birçoğu, bu çalışmada üretimi hedeflenen PETaz enzimi gibi hidrolazlar sınıfına girmektedir. Hidrolazların büyük bir çoğunluğu ekstraselülerdir ve molekül ağırlığı bakımından yüksek olan substratlarla tepkimeye girerler (Akkaya ve Pazarlıoğlu, 2012).

Bir enzimin ticari başarıyı vaat eden ölçüde üretimi için temel olarak; konak mikroorganizmanın ucuz besiyortamında hızlı üremesi ve ürün vermesi, hedef enzimi yüksek konsantrasyonda üretmesi, fermentasyon ortamındaki kontaminant düzeyinin en aza indirgenmesi, enzimin fermentasyon ortamından izolasyonunun ucuz ve kolay olması, fermentasyon sürecinin biyolojik bir tehlike oluşturmaması gerekmektedir. Tüm bu şartların sağlanması için ise mikrobiyal türün optimizasyonu ekonomik bir çözümdür (Volesky ve diğ., 1984). Mikrobiyal enzim üretimi için en çok kullanılan mikroorganizmalardan biri bu çalışmada da enzim üretimi için kullanılan gram-negatif *E. coli* bakterisidir. *E. coli*'nin mikrobiyal enzim üretiminde çok tercih edilmesinin en önemli sebeplerinden biri ise birçok laboratuvar da bulunması ve özelliklerinin çok iyi bilinmesidir. Aynı zamanda bu mikroorganizmanın büyük ölçekte üretim için kullanımı ile ilgili sistemler de optimize edilmiş ve iyi tanımlanmıştır (Terpe, 2006).

2.1.3. Atıkların Mikrobiyal Biyoremediasyonu

Bitkiler ve toprak solucanları gibi organizmaların ya da fungus, alg ve bakteri gibi mikroorganizmaların, çevre kirliliğine sebep olan toksik maddeleri daha az toksik ya da toksik olmayan yeni maddelere dönüştürmesi için kullanıldığı proseslere biyoremediasyon (biyolojik temizleme) denir (Das ve Dash, 2014; Vural ve diğ., 2018). Biyoremediasyon; zararsız, uygun maliyetli, etkin ve bazı durumlarda lojistik olarak da uygun bir temizleme teknolojisi olup;

besin maddeleri, pH, ortamdaki oksijen miktarı, ortamdaki kirleticilerin yapısal karakteristiği, ve çalışılan bölgenin kirlilik geçmişi gibi sınırlayıcı faktörlerin de optimizasyonu ile toprak ve suda biriken kirletici maddelerin biyolojik olarak yıkılmalarını hızlandırmaya hizmet etmektedir (Allard ve Neilson 1997; Alexander, 1999; Margesin ve Schinner, 2001).

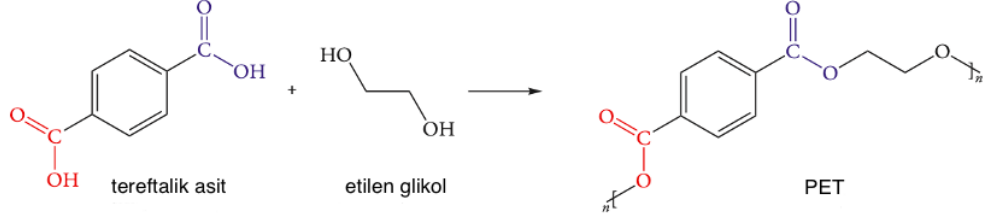
Biyoremediasyon uygulamalarında yaygın olarak kullanılan mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri biyosferdeki her türlü koşulda canlı kalmalarına olanak tanımaktadır. Beslenme parametrelerinin çeşitliliği de mikroorganizmaları biyoremediasyonda elverişli hale getirmektedir (Abatenh ve diğ., 2017). Mikroorganizmaların biyoremediasyonda kullanımı ile ilgili temel yaklaşımlar; *in situ* (yerinde) biyoremediasyon, *ex situ* (uzaktan) biyoremediasyon, biyoreaktör kullanımı, genetik manipülasyonla tür geliştirme ve mikrobiyal konsorsiyum kurulumu üzerine yoğunlaşmıştır.

Mikroorganizmalar arasından bakteriler, diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldığında hem ekonomik hem de çevresel açıdan önemli bir biyoremediasyon potansiyeline sahiptir. Bu uygulamalarda biyoremediasyonun hedefi, mikroorganizmaların çalışılan alandaki kirleticileri zararsız hale getirmeleri amacıyla metabolizmaları için esansiyel olan besin ve kimyasal maddeler ile uyarılmasıdır (Das ve Dash, 2014). Bakterilerin biyoremediasyonda temel olarak kullanıldığı alanlar; ağır metallerin, poliaromatik hidrokarbon ve diğer inatçı kirleticilerin ortadan kaldırılması, petrol ve biyodizelin biyodegradasyonu ile plastiğin degradasyonu olarak sıralanabilir.

2.2. POLİETİLEN TEREFTALAT (PET) TÜRÜ PLASTİK

PET poliester ailesine ait bir polimer olup, kimyasal yapısı $C_{10}H_8O_4$ olan etilen tereftalat monomerinin tekrarlanmasıyla oluşur. Termoplastik bir reçine olan PET'in şeffaf yapıda, yüksek dirence sahip, tamamen geri dönüştürülebilir olması, gaz ve nem bariyeri görevi taşıması gibi özellikleri; başta gazlı içecek şişesi olmak üzere gıda ve diğer birçok sektörde oldukça fazla kullanılmaktadır (Ji, 2013; Crippa ve Morico, 2019). Oldukça geniş bir kullanım ve uygulama yelpazesine sahip olduğundan PET, geri dönüştürülebilir malzemeler arasında en değerli olanlardan biridir (Sinha ve diğ., 2010; Bartolome, 2012; Malik ve diğ., 2016).

PET'in monomerik ham maddeleri mono etilen glikol (MEG) ile tereftalik asit (TPA) olup, bu bileşenler petrol rafinerilerinin yan ürünlerinden türetilmektedir. TPA ve MEG monomerleri arasında meydana gelen polimerizasyon tepkimesi sonucunda PET monomeri elde edilir (Şekil 2.3). Tekrarlayan PET monomerleri bir araya gelerek PET polimerini oluşturur.



Şekil 2.3: TPA ve MEG moleküllerinin polimerizasyon tepkimesi ve PET oluşumu (Kaynak: Fawzy ve diğ., 2018).

2.2.1. Plastik Sektöründe PET

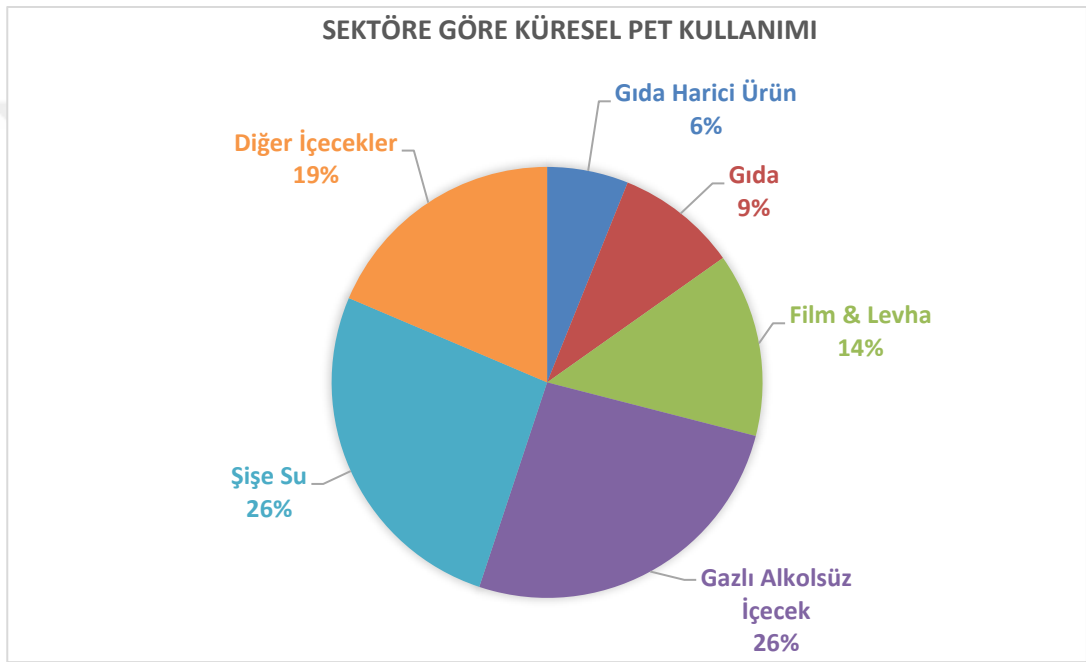
Plastikler kullanım alanları itibariyle bugün dünyada çok önemli bir yere sahiptir, öyle ki plastiklerin veya sentetik organik polimerlerin var olmadığı bir dünya düşünülemez hale gelmiştir. Oysa bu ürünlerin büyük ölçekte üretimi ve kullanımı 1950'li yıllar gibi çok yakın tarihlere dayanmaktadır. 20. yy başlarında bakalit gibi sentetik plastikler ortaya çıkmış olsa da, bu ve benzeri plastik maddelerin askeriye dışında yaygın kullanımı ancak II. Dünya Savaşı sonrasında başlamıştır (Geyer ve diğ., 2017).

Plastiklerin günlük hayatın her yerinde kullanılır hale gelmesinin sonucunda plastik endüstrisi 355 milyar Euro ciro ve 1,5 milyondan fazla personel istihdamı ile Avrupa'nın en önemli 7. sektörü haline gelmiştir (Plastics Europe, 2018). Plastiklerin pazardaki en büyük payı ambalaj sektörüne aittir. Ambalaj sektörü tek kullanımlık kaplara küresel bir geçiş sonucu oldukça hızlı bir büyüme göstermiştir. 1960 yılında katı atıklar içerisinde plastiklerin kütlece oranı %1 iken; orta ve yüksek gelirli ülkelerde bu oran 2005 yılında %10'un üzerine çıkmıştır (Jambeck ve diğ., 2015). 2015 yılına gelindiğinde dünyadaki en önemli sektörlerden birini oluşturan ambalaj ürünleri 261 milyar dolarlık ihracat hacmine ulaşırken, 2019 yılına gelindiğinde ise bu rakam 300 milyar dolara ulaşmıştır (İhracat Genel Müdürlüğü: Maden, Metal ve Orman Ürünleri Daire Başkanlığı, 2020).

PET en çok şişe üretiminde kullanılmaktadır. Global PET şişe pazarı 2019 yılında 12,7 milyon ton kapasiteli üretim hacmine ulaşmıştır. Polipropilen (PP), yüksek yoğunluklu polietilen

(HDPE) ve polivinil klorür (PVC) gibi plastik türlerinden üretilen şişelere kıyasla PET'ten üretilmiş şişeler çok daha dayanıklı, hafif ve uygun maliyetli olup; şeffaf olması, reaktif olmaması ve termal kararlılığa sahip olması gibi özellikleri sebebiyle tercih edilmektedirler. Geri dönüştürülebilir olması ve tekrar tekrar kullanılabilmesi sebebiyle PET ürünlerin üretim maliyetleri daha da düşmektedir (IMARC, 2019).

Dünya genelinde oldukça sık kullanılan PET türü plastiğin sektörlere göre kullanım oranları Şekil 2.4'teki grafikte verilmiştir.

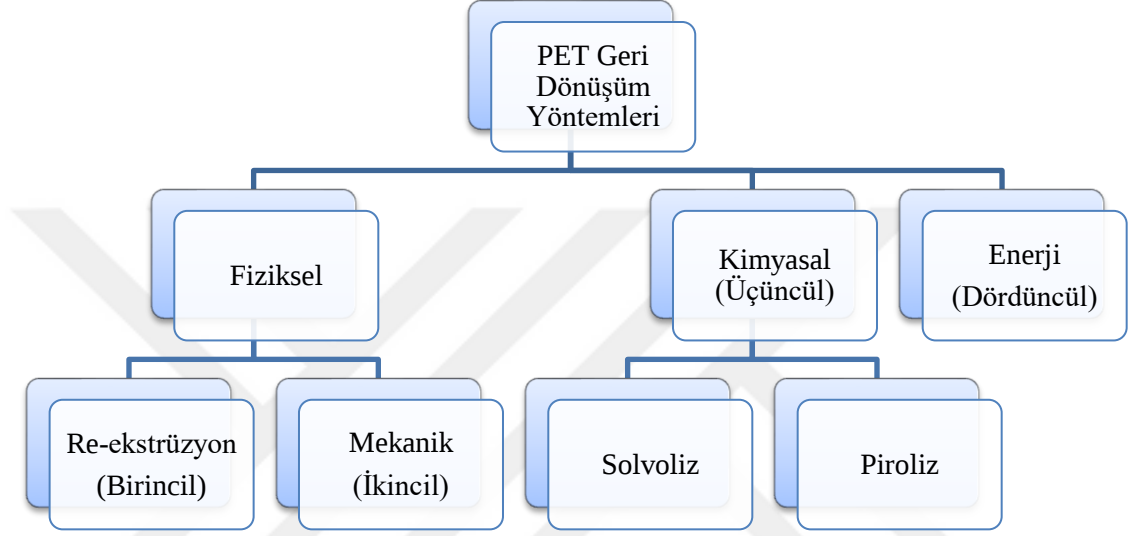


Şekil 2.4: Farklı sektörlere göre PET türü plastik tüketiminin dağılımı. Yıl: 2016, toplam tüketim: 23.5 milyon ton (Plastics insight, 2018).

2.2.2. PET Geri Dönüşüm Yöntemleri

PET'in kullanım miktarı 1990'lı yılların sonlarında 14 milyon ton iken, geçen 20 yıl içerisinde büyük bir artış göstererek 2011 yılında 60 milyon tona (Pazsun ve Spychaj, 1997; Lepoittevin ve Roger, 2011), 2016 yılına gelindiğinde ise 422 milyon tona ulaşmıştır (PAGEV, 2017). Bu nedenle bu kadar çok kullanılan bir maddenin oluşturduğu atık oranı da son derece yüksek düzeylere ulaşmıştır. Bu atıkların çevre için oluşturduğu tehdit ve mali kayıplar göz önüne alındığında, PET'in uygun yöntemlerle geri dönüşümünün sağlanması kaçınılmaz hale gelmiştir. PET'in geri dönüştürülerek yeniden kullanılmasının CO₂ emisyonunu azalttığı ve

enerji dengesi üzerinde olumlu etkilerinin olduğunun bilinmesi de PET'ten üretilen materyallerin geri dönüştürülmesi konusunu oldukça önemli hale getirmiştir (Chilton ve diğ., 2010; Farmer, 2013; Intini ve Kühtz, 2011; Amienyo ve diğ., 2012; Almeida ve diğ., 2010). Bu nedenle, PET'in etkin ve ekonomik şekilde geri dönüşümünü sağlamak amacıyla bazı fiziksel ve kimyasal yöntemler geliştirilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: PET geri dönüşümünde kullanılan yöntemler.

Birincil Geri Dönüşüm (Re-ekstrüzyon): Temiz ve başka atıklarla kontamine olmamış, tek tip plastik atıkların yeniden şekillendirme (re-ekstrüzyon) döngüsüne sokularak geri dönüştürüldüğü prosestir (Al-Salem ve diğ., 2009). Bu işlem için, orjinal ham maddeler ile çok benzer özellikler taşıyan hurda plastikler kullanılır (Al-Salem, 2009). Yeniden şekillendirme işlemi sonrasında ortaya çıkan maddenin ham plastikle karıştırılarak veya ikinci sınıf ham madde olarak kullanıldığı bu yöntem, temiz başlangıç materyali gereksinimi sebebiyle çok sık tercih edilmemektedir (Barlow, 2007).

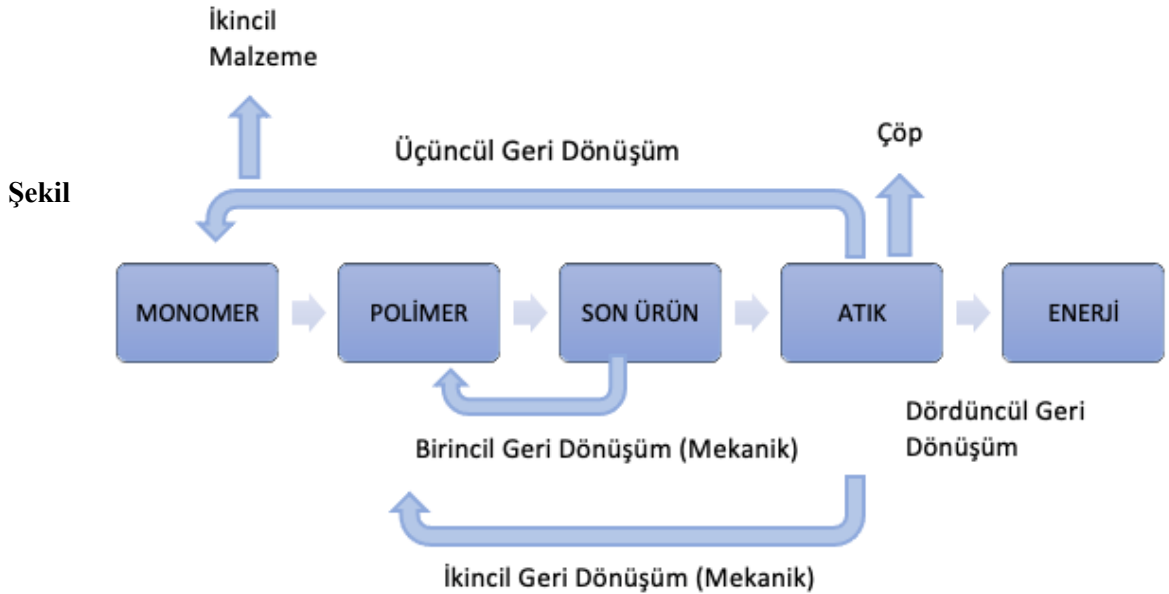
İkincil (Mekanik) Geri Dönüşüm: Plastik maddenin kirleticilerden ayrılarak granüller haline getirildiği prosestir. Bu işlem sırasında plastik madde diğer atıklardan ayrıştırıldıktan sonra küçük parçalara ayrılır ve eritildikten sonra yeniden şekillendirilir (Sinha ve diğ., 2010). Bu uygulamalar esnasında plastiğin polimer yapısında herhangi bir değişiklik meydana gelmez. Ancak ikincil geri dönüşüm prosesi sırasında uygulanan her işlem sonrasında plastik üründe bozulmalar meydana gelir. Bu nedenle ikincil geri dönüşüm sonrası ortaya çıkan plastik

maddeler gıda ile temas eden ürünlerin üretiminde kullanılamamaktadır (Food and Drug Administration, 2006).

Üçüncül (Kimyasal) Geri Dönüşüm: Üçüncül (kimyasal) geri dönüşüm, PET'in polimer formunun bozularak monomerik ya da oligomerik ham maddelerine ayrıldığı depolimerizasyon süreçlerinden oluşur. Bu depolimerizasyon süreçleri solvoliz (çözücüler yardımıyla bozunma) veya piroliz (oksijen, hava veya vakumsuz ortamda ısı ile bozunma) ile gerçekleştirilir (Sinha ve diğ., 2010). Kimyasal geri dönüşümde plastik malzeme monomerlerine (tam parçalama) veya oligomerlerine (kısmi parçalama) kadar parçalanabilir (Malik ve diğ., 2016).

Dördüncül (Enerji) Geri Dönüşüm: Plastik atıkların yakılması yoluyla enerji içeriğinin geri kazanıldığı yöntemdir. Dördüncül geri dönüşüm; toplanması ve ayrıştırılması zor, yüksek maliyetli ya da tehlikeli olan plastik atıklarda depolanan kimyasal enerjinin termal enerjiye dönüştürülmesi işlemidir. Bu işlem sonucunda plastik atıklardan ısı enerjisi elde edilmektedir (Tayyar ve Üstün, 2010). Ancak bu yöntemin temeli olan yakma işlemi sırasında açığa çıkan kötü koku rahatsız edicidir ve genellikle toksiktir. Bu nedenle insan ve çevre sağlığı için zararlı olabilecek sonuçlar doğurur.

Birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül geri dönüşümün başlangıç materyalleri ve son ürünleri Şekil 2.6'da verilmiştir.



2.6: Plastik geri dönüşüm yöntemleri sonrası oluşan son ürünler (Taşdelen ve Oran, 2017).

2.3. PLASTİK PARÇALAYICI BAKTERİYAL VE FUNGAL ENZİMLER

Polimer yapılar insan eliyle optimum malzeme özelliklerine ulaşmak üzere tasarlandığı için oldukça dayanıklıdır ve bunun bir sonucu olarak birçok plastik türü mikroorganizmalar yoluyla parçalanamaz. Evrimsel süreçte, insan eliyle üretilmiş bu malzemeleri depolimerize edecek uygunlukta biyolojik araçlar gelişmemiştir. Bunun bir sonucu olarak da genellikle birçok plastik biyolojik yöntemlerle geri dönüştürülemez ve doğada etkin şekilde bozunmaya uğraması oldukça zordur (Müller ve diğ., 2005).

Ancak bununla birlikte, genellikle yağlardaki esterleri parçaladığı bilinen ekstraselüler enzimler olan bazı lipazların, alifatik poliestерlerin bazılarında yer alan ester bağlarına etki ederek bu tür malzemeleri depolimerize edebildiği bildirilmiştir (Tokiwa ve Suzuki, 1977).

PET'in geri dönüşümü için ise 2.2.2'de anlatıldığı üzere fiziksel ve kimyasal uygulamaların yer aldığı birkaç farklı yöntem geliştirilmiş olmakla birlikte, bu yöntemler arasında özellikle üçüncül (kimyasal) geri dönüşüm monomer düzeyinde geri dönüşümün mümkün olduğu bir uygulama olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte kimyasal geri dönüşüm, çok büyük ölçekli ve çok aşamalı parçalama süreçleri gerektiren; yüksek sıcaklık uygulamaları ile fazla miktarda enerji tüketen yüksek maliyetli bir yöntem olarak göze çarpmaktadır (Müller ve diğ., 2001; Grause, 2003).

Ancak kimyasal işlemlerin aksine, PET'in enzimatik yolla monomer ya da oligomer düzeyinde hidrolizi daha düşük sıcaklık ve daha optimal pH koşullarında gerçekleşebilir. Bu nedenle de biyolojik kaynaklardan elde edilen enzimlerle yapılan parçalamada, kimyasal PET hidrolizine göre çok daha az enerji ve ek kimyasal tüketimi söz konusudur (Müller ve diğ., 2005). PET'in enzimatik yolla hidrolizi, diğer yöntemlerdeki eritme temelli yaklaşımın aksine PET malzeme yüzeyinde meydana gelen erozyon olarak süreci olarak tanımlanır (Figuerola ve diğ., 2006; Herzog ve diğ., 2006). Erozyon süreci ise, enzimin PET üzerindeki bağlara etki ederek malzemenin yüzeyinden monomer ve oligomerleri koparması olarak tanımlanabilir.

Bugüne kadar birkaç organizmada PET parçalayıcı aktiviteye sahip enzimlerin salgılandığı bildirilmiştir. Müller ve diğ., 2005 yılında *Thermobifida fusca*'da bulunan Tfh (*Thermobifida fusca* hidrolaz) enzimi ile ilk kez PET'in bir enzim ile parçalanabileceğini göstermiştir. Tfh enziminin 55°C'de bir hafta boyunca PET ile muamelesi sonucunda %50'lik bir parçalama verimi gözlenmiştir. Bu gelişmeden sonra PET parçalanmasında yüksek aktiviteye sahip enzim

arayışı diğer *Thermobifida* türleri üzerinde de yoğunlaşmış ve birkaç PET parçalayıcı enzimin daha varlığı saptanmıştır (Herrero Acero ve diğ., 2011; Ribitsch ve diğ. 2012); ancak yapılan çalışmalar sonucunda bu enzimlerin Tfh kadar etkin olmadığı gözlenmiştir. 2014 yılına gelindiğinde ise Sulaiman ve diğ.’nin yaptığı çalışmada yaprak dalı kompostu metagenomundan elde edilen ve Tfh’a %57.4 dizi benzerliği gösteren LCC (LC-kütinaz) enziminin varlığı gösterilmiştir. LCC, 70°C’de 24 saat boyunca PET ile inkübasyon sonrasında %25’lik bir parçalama verimi göstermiştir. Kawai ve diğ.’nin 2014 yılında yaptığı çalışmada ise *Saccharomonospora viridis* organizmasından elde edilen bir kütinaz olan Cut190 (kütinaz-benzeri enzim) ile PET’in 63°C’de inkübasyonu sonucunda %27’ye varan parçalama verimi olduğu bildirilmiştir. PETaz enziminin katalitik aktivitesinin Tablo 2.1’de yer alan ve PET üzerindeki yüksek hidroliz aktivitesi ile bilinen enzimlerden Tfh’a göre 380, LC-kütinaz (LCC)’a göre ise 48 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (Yoshida ve diğ., 2016). Şimdiye kadar tanımlanmış olan PET hidrolize edici bakteriyal ve fungal enzimlerden bazıları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1: PET’i hidroliz edebilen enzimler ve üretildikleri mikroorganizmalar.

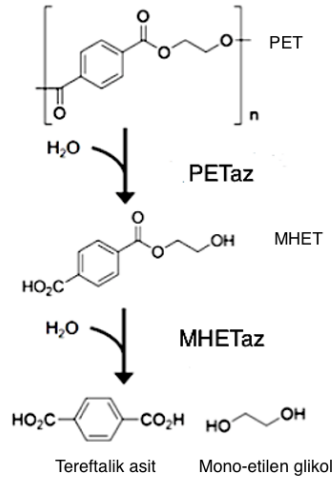
Enzim	Mikroorganizma Kaynağı	GenBank No	Referans
Tfh	<i>Thermobifida fusca</i>	AJ810119.1	Müller ve diğ., 2005; Kleeberg ve diğ., 2005
Thc_Cut1	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	ADV92526.1	Herrero Acero ve diğ., 2011
Thh_Est	<i>Thermobifida halotolerans</i>	AFA45122.1	Ribitsch ve diğ., 2012
Tcur1278	<i>Thermomonospora curvata</i>	ACY96861.1	Chertkov ve diğ., 2011; Wei ve diğ., 2014
Tcur0390	<i>Thermomonospora curvata</i>	CDN67545.1	Wei ve diğ., 2012
Cut190	<i>Saccharomonospora viridis</i>	AB728484	Kawai ve diğ., 2014
LC-kütinaz	Yaprak dalı kompostu metagenomu	AEV21261.1	Sulaiman ve diğ., 2014
PETaz	<i>Ideonella sakaiensis</i>	GAP38373.1	Yoshida ve diğ., 2016

2.3.1. PETaz Enzimi

Yoshida ve diğ., 2016 yılında PET atıklar üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda PET'i hidroliz edebilme yeteneğindeki *Ideonella sakaiensis* organizmasını tanımlanmışlardır. *Ideonella sakaiensis*; sadece PET'i tek karbon kaynağı olarak kullanan gram-negatif bir bakteri türüdür. (Yoshida ve diğ., 2016). Yapılan bu çalışmada *Ideonella sakaiensis* bakterisi tarafından salgılanan ve daha önce literatürde bildirilmemiş iki adet yeni enzim varlığı keşfedilmiştir: PET hidrolaz (PETaz 3.1.1.101) ve MHET hidrolaz (MHETaz 3.1.1.102) *I. sakaiensis* tarafından salgılanan her iki enzimin de PET türü plastiğin parçalanmasında aşamalı ve sinerjistik olarak aktivite gösteren enzimler olduğu gösterilmiştir. Bu iki enzim birlikte çalışarak PET'i TPA (Tereftalik asit) ve MEG (monoetilen glikol) gibi toksik olmayan petrol türevli monomerik ham maddelerine kadar indirgemektedir (Yoshida ve diğ. 2016; Austin ve diğ., 2018).

Özellikle son on yılda, PET'i depolimerize eden enzimlerin varlığından ve çalışma mekanizmasından bahseden çok sayıda temel çalışma yapılmıştır (Zheng, ve diğ., 2005; Müller ve diğ., 2005; Sharon C. ve Sharon M, 2017). Ancak yapılan bu çalışmalardan da hareketle, bilindiği kadarıyla *Ideonella sakaiensis* bakterisinin keşfine kadar, PET'in hücre dışında enzimatik olarak ham maddelerine ayrıştırılmasının tek bir organizma tarafından gerçekleştirildiği daha önce saptanmamıştır (Austin ve diğ. 2018).

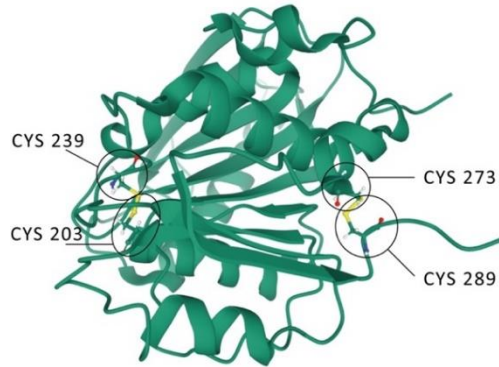
PETaz enziminin PET üzerindeki hidroliz aktivitesi sonucunda MHET (mono-etilen tereftalat) ve eser miktarda da TPA açığa çıkmaktadır. MHETaz enzimi ise bu reaksiyon sonrasında açığa çıkan MHET'i TPA ve MEG'e dönüştürmektedir. *Ideonella sakaiensis* organizması tarafından salgılanan ve sinerjistik olarak çalışan (Austin ve diğ., 2018) PETaz ve MHETaz enzimlerinin PET türü plastik üzerindeki hidroliz etkisi Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7: *Ideonella sakaiensis* tarafından salgılanan PETaz ve MHETaz enzimlerinin PET depolimerizasyon mekanizması (Kaynak: Taniguchi ve diğ., 2019'dan düzenlenmiştir).

Ideonella sakaiensis tarafından üretilen doğal PETaz enzimi, 290 aminoasit uzunluğunda, 30,247 kDa moleküler ağırlığa sahip esterazlar sınıfına giren üretildikten sonra hücre dışına salgılanan (ekstraselüler) hidrolitik bir enzimdir. Yapılan çalışmalarda PETaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı 40°C, optimum çalışma pH'ı ise 9.0 olarak bildirilmiştir (Liu ve diğ., 2019).

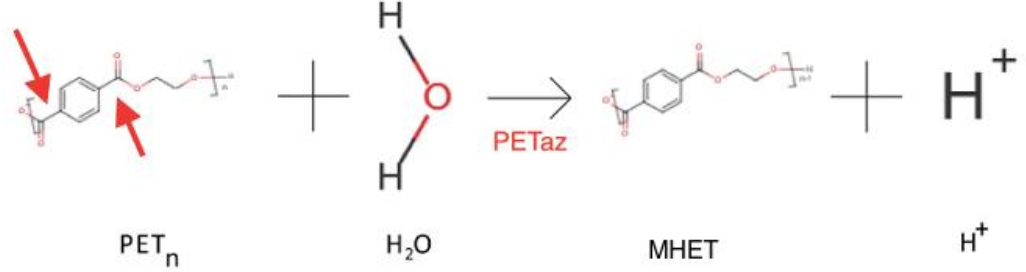
PETaz enziminin diğer PET parçalayıcı enzimlerden farklı olarak 2 adet disülfid bağı içerdiği bilinmektedir. Bu iki disülfid bağı sayesinde PETaz enziminin daha kararlı yapıda olduğu ve buna bağlı olarak diğer PET parçalayıcı enzimlerden daha yüksek etkinliğe sahip olduğu bilinmektedir (Joo ve diğ., 2018). PETaz enziminin taşıdığı disülfid bağları: Cys273 - Cys289 ve Cys203 - Cys239 aminoasitleri arasında yer alır. Enzimde bulunan disülfid bağları ve bu bağların enzimin 3 boyutlu yapısındaki yerleri Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8: PETaz enziminin 3 boyutlu yapısı üzerinde disülfid bağlarının yeri.

PETaz enziminin PET ile gerçekleştirdiği hidroliz reaksiyonu:

(etilen tereftalat)_n + H₂O $\rightarrow$ (etilen tereftalat)_{n-1} + MHET şeklindedir (Şekil 2.9)



Şekil 2.9: PETaz enziminin PET üzerindeki enzimatik aktivitesi. PETaz enziminin potansiyel hidroliz bölgeleri ok ile işaretlenmiştir (Chen ve diğ., 2018), (Kaynak: UniProt A0A0K8P6T7'dan düzenlenmiştir.).

2.3.2. PETaz Enziminin Rekombinant Üretimi Çalışmaları

PETaz enziminin verimli ve etkin bir şekilde rekombinant yolla üretimine yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte bunların sayısı oldukça azdır. *Ideonella sakaiensis* endüstriyel ölçekte PETaz enzimi üretimine uygun olmadığından, farklı stratejiler ile rekombinant üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmalardan, endüstriyel enzim üretimi için sıklıkla tercih edilen konak organizmalardan olan *E.coli*'de PETaz enzimi üretimi için farklı sinyal dizilerinin denendiği, Seo ve diğ.'nin 2018'de yayınladığı çalışmada oldukça önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmada PETaz enziminin *E.coli*'de verimli şekilde üretimi için farklı sinyal peptitleri ile PETaz enzimi üretimi için deneyler gerçekleştirilmiştir. Bunun için *E.coli*'de üretilen proteinin hücre dışına salgılanmasını sağladığı bilinen PelB, MalE, LamB, SurA, DsbA ve TolB sinyal dizilerinin ayrı ayrı PETaz genine eklenmesi ile oluşturulan genetik tasarımlar ile denemeler yapılmıştır. Protein izolasyonlarının 1 L'lik hücre kültürlerinden yapıldığı çalışmada en iyi üretim verimi, PETaz genine MalE (3.0 mg toplam protein) ve LamB (6.2 mg toplam protein) sinyal dizilerinin eklendiği kültürlerden elde edilmiştir. Aynı çalışmada yapılan sitosolik enzim üretiminden elde edilen protein miktarının ise 4.0 mg olduğu belirtilmiştir.

E.coli gibi, rekombinant protein üretiminde önemli bir konak organizma olan ve ürettiği proteinleri besiyerine salgılama mekanizması sebebiyle önemli bir endüstriyel üretim potansiyeli taşıyan *Bacillus* türleri ile de PETaz enzimi üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Huang ve diğ.'nin 2018'de yayınladığı çalışmada, PETaz enzimi *Bacillus subtilis* 168

organizmasında rekombinant olarak üretilmiştir. Enzimin üretildikten sonra hücre dışına salgılanması için SP_{YvbN}, SP_{PhoD}, SP_{AmyE}, SP_{Bpr} ve SP_{SacB} olmak üzere, *Bacillus* ırkına ait 5 farklı sinyal dizisi kullanılarak denemeler yapılmıştır. Aynı zamanda PETaz enziminin orijinal sinyal dizisi kullanılarak da üretim denemesi yapılmış ve bu sinyal dizisi SP_{PETase} olarak adlandırılmıştır. 20 mL’lik hücre kültürlerinden izole edilen enzimlerle yapılan çalışmalar sonucunda en iyi verimin 15 mg/L ile SP_{PETase} sinyal peptidinin kullanıldığı enzime ait olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar; farklı bir bakteri türüne ait olduğu halde PETaz geninin orijinal sinyal dizisinin, *Bacillus* ırkına ait sinyal dizilerine kıyasla daha yüksek izolasyon verimine sahip olduğunu göstermektedir.

Bakterilere ek olarak, çevre dostu mikroorganizmalar geliştirmek ve yerinde biyoremediasyon uygulamalarında kullanmak üzere oldukça sık kullanılan algler de rekombinant PETaz enzimi üretimi için kullanılmıştır. Bu çalışmalara ilk örnek olarak Moog ve diğ.’nin 2019’da yaptığı çalışmada, PETaz enzimi *Phaeodactylum tricornutum*’da rekombinant olarak üretilmiştir. Tek hücreli bir ökaryot olan diatom *P. tricornutum*, tuzlu su bazlı ortamlarda CO₂ tüketerek hızlı şekilde üreyebilmesi ve rekombinant DNA çalışmalarına uygunluğu nedeniyle bu çalışmada araştırmacılar tarafından tercih edilmiştir. *P. tricornutum*’un genomuna genlerin kolaylıkla eklenebilmesi ve uygun koşullar altında indükleme yapılarak yüksek miktarda gen ürünü elde edilebilmesinin (Daboussi F. ve diğ., 2014; Nymark M. ve diğ., 2016; Hempel F. ve Maier UG., 2016) de bu çalışmada kullanılan konak organizmanın sahip olduğu diğer bir avantaj olarak belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 5 g’lık PET substratının, PETaz geninin klonlandığı rekombinant *P. tricornutum* hücrelerinin bulunduğu 50 mL’lik kültür ile inkübasyonunun 10. gününde tamamen parçalandığı bildirilmiştir. Bu çalışma, PETaz enziminin endüstriyel kullanıma yönelik olarak üretimi yerine, çevre dostu ve değişen ortam koşullarına dayanıklı mikroorganizmalar kullanılarak yerinde atık yönetimi için kullanılması adına önemli sonuçlar içermektedir.

P. tricornutum’da yapılan çalışmaların ardından *C. reinhardtii* ile PETaz enziminin rekombinant üretimi gerçekleştirilmiştir. Kim ve diğ.’nin 2020 yılında yayınladığı çalışmada, PETaz enzimi yeşil bir mikroalg olan *Chlamydomonas reinhardtii*’ye aktarılmış ve rekombinant olarak üretilmiştir. Araştırmacılar, tek hücreli fotosentetik bir mikroorganizma olan *C. reinhardtii*’yi (Harris EH., 2009); GRAS (Generally Recognized as Safe – Genel Olarak Güvenilir) olarak kabul edilmesi ve bu nedenle çevre dostu biyoremediasyon çalışmaları için

uygun olması sebebiyle tercih ettiklerini belirtmişlerdir. *C. reindhardtii* ile karşılaştırıldığında Moog ve diğ.'nin 2019'da PETaz üretimi için kullandığı *P. tricornutum*'un büyüme hızının düşük olması, yüksek tuzluluk ve düşük sıcaklık gerektiren ortamlarda üremesi ve besin olarak silika kullanmasının dezavantaj olduğu belirtilmiştir. PETaz geninin aktarıldığı *C. reinhardtii*'ye ait her 10 mL hücre kültüründen izole edilen total protein miktarının 1.6 ila 2.75 mg arasında değişkenlik gösterdiği (kültür koşulları ve kültürlenme süresine göre) belirtilmiştir. Fakat çalışmada PET parçalama deneyleri için saf enzim kullanılmamış olup, toz ve film formundaki farklı PET substratları doğrudan hücre kültürleri ile muamele edilerek enzim etkinliğinin analizi yapılmıştır. Elde edilen reaksiyonlardan PET film substratlarının analizi için SEM (Scannig Electron Microscopy), toz PET substratlarının analizi için ise HPLC (High Performance Liquid Chromatography) yöntemleri kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda PETaz enziminin aktarıldığı *C. reinhardtii*'nin, PET substratlar üzerinde parçalayıcı aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Daha önce *P. tricornutum* ile yapılan çalışmada aynı miktarda PET'in 10 günde tamamen parçalandığı belirtilirken, *C. reinhardtii* ile yapılan bu çalışmada aynı reaksiyonun tamamlanması 4 hafta sürmüştür.

Son olarak, Wang ve diğ.'nin 2020'de yaptığı çalışmada ise PETaz geni *Bacillus subtilis* WB600 bakterisinde rekombinant olarak üretilmiştir. Hücre dışına salgılanan enzim verimini artırmak için bu çalışmada *Bacillus* ırkına ait SP_{AprE}, SP_{apr}, SP_{BprA}, SP_{SacC} ve SP_{amy} olmak üzere 5 farklı sinyal peptidi ile enzim üretimi denemeleri yapılmış, ek olarak PETaz enziminin orijinal sinyal dizisini (SP_{PETase}) taşıyan PETaz geni ile de enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Her kültürün besiyerine salgıladığı enzim miktarı Western Blot deneylerinde elde edilen bantlara göre yorumlanmıştır. Bunun sonucunda en yüksek enzim konsantrasyonunun SP_{amy} sinyal peptidi taşıyan genin aktarıldığı kültürde; en düşük konsantrasyonun ise SP_{PETase} sinyal dizisini taşıyan genin aktarıldığı kültürde olduğu belirtilmiştir. Hücre kültürlerinden elde edilen protein miktarları bu çalışmada belirtilmemiş olup, SP_{amy} sinyal peptidini taşıyan PETaz enziminin *p*-nitrofenil palmitat substratı üzerindeki enzimatik aktivitesinin 3104 U/mL olduğu gösterilmiştir.

Yukarıdaki çalışmalardan da anlaşılacağı gibi, yerinde biyoremediasyon için değişken koşullara adapte olabilen farklı mikroorganizmalar üzerinde rekombinant üretim denemeleri yapılmış olsa da, PETaz enziminin endüstriyel üretiminin hedeflendiği çalışmalarda bakteriyal konak organizmaların daha çok tercih edildiği görülmektedir. Bakteriyal konak organizmalar

arasından *E.coli*, PETaz enzimi gibi ticari öneme sahip çok sayıda enzimin üretimi için kullanılan bir model organizma olup, bu çalışmada da PETaz enziminin üretimi için konak organizma olarak seçilmiştir.

2.4. BİYOİNFORMATİK

Biyoinformatik; terim olarak kez Paulien Hogeweg ve Ben Hesper tarafından 1970 yılında kullanılan (Hesper ve Paulien, 1970), biyolojik verilerin anlaşılması ve işlenmesi amacıyla yöntemler ve yazılım araçları geliştirmek için bilgisayar bilimi, matematik, istatistik ve mühendislik bilimlerinden yararlanan multidisipliner bir bilim dalıdır (Devi B., 2015).

Biyoinformatiğin kullanım amaçları aşağıdaki temel hedefler doğrultusunda gruplanır (Biharee ve diğ., 2018):

- 1- Araştırmacıların mevcut bilgilere ulaşabilmesi için veritabanları sağlamak ve yine araştırmacıların bu veritabanlarına bilgi girişi yapabilmesine olanak vermek.
- 2- Nükleotid ve amino asit dizileri, proteinlerin üç boyutlu yapıları gibi önemli biyoinformatik verilerin analizini ve tanımlanmasını mümkün kılan biyoinformatik araçlar sunmak.
- 3- Biyoinformatik araçlar yardımıyla elde edilen yeni verileri analiz ederek, deneysel uygulama öncesinde biyolojik olarak anlamlı sonuçlar elde edecek şekilde yorumlamak ve deneysel tahminler yapmak.

Rekombinant proteinlerin deneysel yöntemlerle değerlendirilmesi hem zaman hem de maliyet alıcıdır (Childers ve Daggett, 2017; Saadi ve diğ., 2017). Bu nedenle, rekombinant üretimi hedeflenen proteini sentezlenmeden önce proteinin; primer (birincil), sekonder (ikincil) ve tersiyer (üçüncül) yapısı, çözünürlüğü, fiziksel ve kimyasal özellikleri gibi özellikleri biyoinformatik yöntemlerden yararlanılarak analiz edilmelidir. Üretimi hedeflenen protein dizisi üzerinde yapılacak tüm değişiklikleri deneysel ortamda ayrı ayrı analiz etmek hem yüksek maliyetli hem de pratik olarak mümkün olmadığından; biyoinformatik analiz aşamasında proteinin stabilitesi, özgüllüğü, belirli bir maddeye karşı afinitesi ya da deneysel olarak istenmeyen başka bir özelliğinin iyileştirilmesi amacıyla biyoinformatik araçlarla bir veya birden fazla değişiklik yapılır ve ardından yapılan bu değişiklikler deneysel ortamda analiz

edilir (Rezaie ve diğ., 2019). Deneysel çalışmaların başarıya ulaşması için yapılan biyoinformatik analizler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Biharee ve diğ., 2018).

- **Yapı Analizleri:** Nükleik asit ve protein yapı tahmini, proteinlerin yapısal olarak sınıflandırılması ve protein yapı karşılaştırmaları.
- **Dizi Analizleri:** Genom karşılaştırma, dizi veritabanı tarama, hizalama.
- **İşlev Analizleri:** Metabolik yolların modellenmesi, protein etkileşimi tahminleri ve proteinlerin hücre içi konumları.

Biyoinformatik analizlerde sıklıkla başvurulmuş biyoinformatik veritabanlarından bazıları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Luscombe ve diğ., 2001).

Tablo 2.2: En çok kullanılan biyoinformatik veri tabanları.

Veritabanı	URL
Protein Dizisi:	
SWISS-PROT	www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html
PIR-International	www.mips.biochem.mpg.de/proj/protseqdb
Makromoleküler Yapı:	
Protein Data Bank (PDB)	www.rcsb.org/pdb
Nucleic Acids Database (NDB)	ndbserver.rutgers.edu/
Nükleotit Dizileri:	
GenBank	www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank
EMBL	www.ebi.ac.uk/embl

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BAKTERİ İRKLARI

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda 2 farklı *Escherichia coli* bakterisi kullanıldı. Bunlar *E. coli* DH5 α ve *E. coli* SHuffle (NEB, C3029J) ırklarıdır. *E. coli* DH5 α bakterisi İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bulunan Maya Genetiği, Teknolojisi ve Genomik Araştırmalar Laboratuvarı'ndan Eylül 2018'de temin edildi. *E. coli* DH5 α ırkı; PETaz genini taşıyan klonlama vektörünün (pTZ57R/T-PETaz), ekspresyon vektörünün (pET26b) ve rekombinant DNA molekülünün (pET26b-PETaz) daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere çoğaltılması için kullanıldı.

E. coli SHuffle ise, bu çalışmada oluşturulan rekombinant DNA içerisine klonlanan PETaz geninden enzim üretimi için kullanıldı ve üretici firmadan (NEB, C3029J) sıvı çözelti içerisinde temin edildi. Enzim üretimi için *E. coli* SHuffle'ın seçilmesindeki en önemli etkenler:

- Transformasyon etkinliğinin yüksek olması (pUC19 DNA'sı için 1×10^6),
- Yüksek verimde protein üretimini sağlayan T7 ekspresyon sistemine sahip olması ve
- Disülfid bağlarının oluşmasını sağlayan DsbC proteinini yapısal olarak üretebildiği için sitoplazma içerisinde disülfid katlanmalarını yapabilme yeteneğine sahip olmasıdır.

Her iki ırkın genotipi Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 : Çalışmada kullanılan *E. coli* DH5 α ve *E. coli* SHuffle ırklarının özellikleri.

İrk	Genotip
<i>E. coli</i> DH5 α	F/endA1hsdR17(r-kmk+)supE44thi-1recA1 gyrA(nalr)relA1 Δ (lacZYA-arg FU169deoR[ϕ 80 dLac Δ (LacZ)M15]
<i>E. coli</i> SHuffle	fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal λ att::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) Δ trxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --TetS) endA1 Δ gor Δ (mcrC-mrr)114::IS10

3.2. BESİYERLERİ

Çalışmada kullanılan her iki *E. coli* ırkı için de Luria-Bertani (LB) besiyeri hem sıvı (Luria-Bertani Broth-LBB) hem de katı (Luria-Bertani Agar-LBA) biçimde hücre çoğaltma, stok yapma ve transformant seçimi gibi farklı deneysel amaçlar için kullanıldı. Besiyerinin içeriği Tablo 3.2’de verildi. SOC (Super Optimal Broth with Catabolic Repression) besiyeri ise glukoz içeriği sebebiyle (Tablo 3.3) transformasyon verimini artırmak amacıyla tüm transformasyon işlemlerinden sonra hücre üretimi için kullanıldı.

3.2.1 Luria Bertani Besiyeri

E. coli hücrelerinin çoğaltılması, transformasyon sonrası seçim ve uzun süreli hücre kültürü stoklarının yapılması için kullanılan LB (Luria Bertani) besiyeri, hücre çoğaltımı ve stoklanması için sıvı ve transformasyon sonrası seçim için katı olarak hazırlandı.

1 litre sıvı LB besiyerini (LBB) hazırlamak için 10 g tripton (Biolife, 4122902), 5 g maya özütü (Biolife, 4122202) ve 10 g sodyum klorür (Merck, 1.06404.1000) tartılıp temiz bir şişeye eklendikten sonra üzerine 800 mL distile su eklenerek tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım homojen hale getirildikten sonra 1 N NaOH (Merck, 1.06498.1000) ile pH 7.2’ye ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra solüsyonun hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı. Daha sonra 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak (Shenan, DSX-280KB24) steril hale getirildi. Hazırlanan LBB besiyeri hücrelerin çoğaltılması ve stoklanması için kullanıldı.

LBB besiyerinin bileşenleri Tablo 3.2 de verilmiş olup, katı besiyerinin (LBA) hazırlanması için aynı tabloda verilen bileşenlere otoklavma yapmadan önce 15 g/L bakteriyal agar (Biolife, 4110302) eklendi.

Tablo 3.2 : “Luria Bertani Broth” (LBB) besiyeri bileşimi.

Besiyeri İçeriği	Konsantrasyon (g/L)
Tripton	10
Maya özütü	5
Sodyum Klorür	10

E.coli DH5 α hücrelerine pTZ57R/T-PETaz vektörünün transformasyonu sonrası transformant seçimi için LBA besiyeri hazırlanarak sterilizasyon sonrası son konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde ampisilin antibiyotiği (Pan Biotech, P60-083910) eklendi. Elde edilen transformant hücreleri çoğaltmak için ise yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan LBB besiyerine yine sterilizasyon sonrası son konsantrasyonu 100 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde ampisilin antibiyotiği eklendi. Ampisilinli LBB besiyeri pTZ57R/T-PETaz vektörünü taşıyan transformant hücrelerin çoğaltımı için kullanıldı.

pET26b vektörünün *E.coli* DH5 α hücrelerine, rekombinant pET26b-PETaz vektörünün ise *E.coli* DH5 α ve SHuffle hücrelerine transformasyonu sonrası transformant seçimi için LBA besiyeri hazırlanarak sterilizasyon sonrası son konsantrasyonu 50 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde kanamisin antibiyotiği (Pan Biotech, P06-04050) eklendi. Elde edilen transformant hücreleri çoğaltmak için ise LBB besiyeri hazırlanarak sterilizasyon sonrası son konsantrasyonu 50 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde kanamisin antibiyotiği eklendi. Kanamisinli LBB besiyeri hem pET26b vektörünü hem de pET26b-PETaz vektörünü taşıyan transformant hücrelerin çoğaltımı için ayrı ayrı hazırlanarak kullanıldı.

3.2.2. Super Optimal Broth – Katabolit Represyon (SOC)

SOC besiyerinin hazırlanabilmesi için öncelikle Super Optimal Broth (SOB) besiyeri hazırlandı. SOB besiyeri çalışmalarda doğrudan kullanılmamakla birlikte, SOC besiyerinin elde edilmesi için hazırlandı.

Tablo 3.3 : “Super Optimal Broth” (SOB) besiyeri bileşimi.

Besiyeri İçeriği	Konsantrasyon (g/L)
Trypton	20
Maya Özütü	5
Sodyum klorür	0,5
Potasyum klorür	0,186
Magnezyum klorür	0,95

1 litre SOB besiyerini hazırlamak için Tablo 3.3'te verildiği üzere 20 g tripton, 5 g maya özütü, 0,5 g sodyum klorür, 0.186 g potasyum klorür (Merck, K49735336 811) ve 0,95 g magnezyum klorür (Merck, A0725033 743) tartılıp temiz bir şişeye eklendikten sonra üzerine 800 mL distile su eklenerek tamamen çözünene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım homojen hale getirildikten sonra 1 N NaOH ile pH 7.0'ye ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra solüsyonun hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı. Daha sonra 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Bakteri hücrelerinin transformasyona hazırlanması ve stoklanması için kullanıldı.

Daha sonra hazırlanan 1 L SOB besiyerine 20 mM (3.603 g) glukoz (Neofroxx, 1191KG001) eklendi. Glukoz içeriği nedeniyle SOC besiyeri otoklavlanmadı. Besiyeri 0.22 µm filtre (GVS, Syringe filter 0.20 µm) ile steril edildi. SOC zengin besiyeri içerdiği glukoz sayesinde transformasyon etkinliğini önemli ölçüde artırdığından transformasyon sonrası hücrelerin çoğaltılması için kullanıldı.

3.3. PLAZMİTLER

Çalışmada hedef geni çoğaltmak için “klonlama”, protein üretimini sağlamak için “ekspresyon” plazmiti olmak üzere iki farklı tipte plazmit vektör kullanıldı.

pTZ57R/T bir klonlama plazmiti olup, sentetik PETaz geni bu plazmite klonlanmış olarak temin edildi (Sentegen, Ankara). pTZ57R/T-PETaz plazmiti PETaz geninin *E. coli* DH5α hücrelerine aktararak çoğaltılması için kullanıldı.

pET26b plazmiti (Novagen, 69862) ise bir ekspresyon plazmiti olup, pTZ57R/T-PETaz plazmitinden restriksiyon enzimleri ile kesilerek çıkarılan PETaz geni, aynı restriksiyon enzimleri ile kesilen pET26b plazmitine klonlanarak rekombinant DNA oluşturuldu. Elde edilen rekombinant plazmit *E. coli* DH5α'da çoğaltılarak izole edildikten sonra *E. coli* SHuffle bakterisine aktararak PETaz enziminin üretimi için kullanıldı.

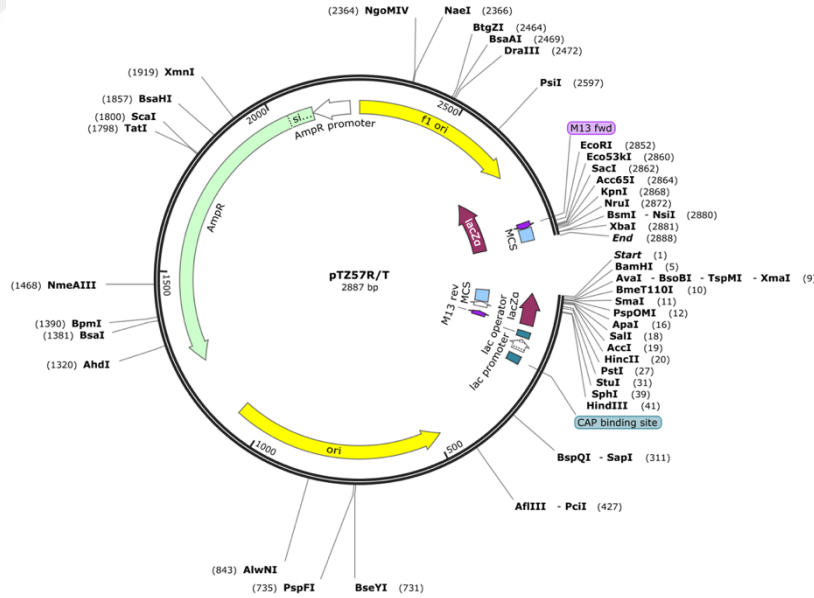
Bu çalışmada kullanılan plazmit vektörlere ait bilgiler Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan plazmit vektörler.

Plazmit	Tür	Büyüklik (bç)	Taşıdığı Antibiyotik Direnç Geni	Kullanım Şekli
pTZ57R/T	Klonlama	2887	Ampisilin ^r	Doğrudan kullanılmadı, sentetik gen ile birlikte temin edildi.
pTZ57R/T-PETaz	Klonlama	3778	Ampisilin ^r	PETaz genini çoğaltmak amacıyla doğrudan kullanıldı.
pET26b	Ekspresyon	5360	Kanamisin ^r	PETaz enzimini üretmek amacıyla doğrudan kullanıldı.

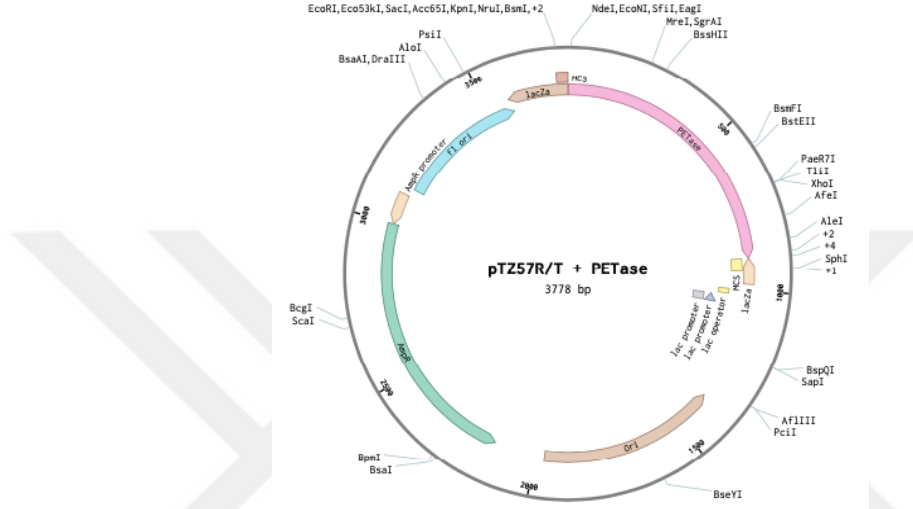
3.3.1. PETaz Genini İçeren Klonlama Plazmiti (pTZ57R/T-PETaz)

pTZ57R/T plazmiti *E. coli* bakterisinde gen çoğaltma amacıyla kullanılan ticari bir klonlama vektörü olup (Şekil 3.1), bu çalışma kapsamında da PETaz geninin çoğaltılması amacıyla kullanıldı. 2887 bç büyüklüğündeki bu vektöre çalışmalarda doğrudan bir işlem uygulanmamış olup, biyoinformatik olarak yeniden tasarlanan PETaz geni, sentetik olarak üretilmiş ve pTZ57R/T vektörü içerisine klonlanmış halde temin edildi (Sentegen, Ankara).



Şekil 3.1: pTZ57R/T plazmiti haritası. AmpR: Ampisilin direnç geni. AmpR promoter: Ampisilin direnç geni promotörü. f1 ori: Faj kökenli Replikasyon orijini. lacZα: Marker gen. lac promoter: Lac operonuna ait promotör. lac operatör: Lac operonu. MCS: Çoklu klonlama bölgesi. ori: Bakteriyal replikasyon orijini.

3779 bç uzunluğundaki pTZ57R/T-PETaz plazmiti (Şekil 3.2), *E. coli* DH5α bakterisine transformasyon ile aktarılaraq çoğaltıldı ve bol miktarda elde edildi. Plazmit içerisinde bulunan ve bu çalışma kapsamında biyoinformatik olarak yeniden tasarlanan sentetik PETaz geni restriksiyon enzimleri ile kesilip agaroz jelde yürütülerek izole edildi ve daha sonraki işlemler için kullanıldı.

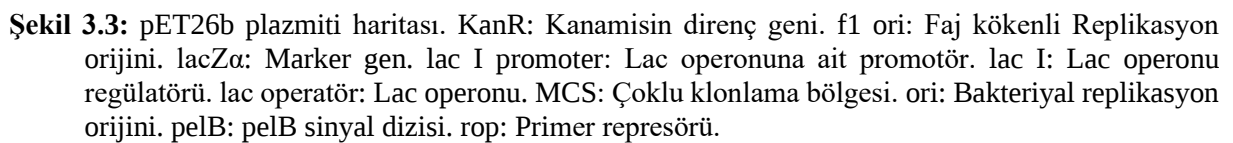


Şekil 3.2: pTZ57R/T-PETase plazmiti haritası. AmpR: Ampisilin direnç geni. AmpR promotor: Ampisilin direnç geni promotörü. f1 ori: Faj kökenli Replikasyon orijini. lacZα: Marker gen. lac promotor: Lac operonuna ait promotör. lac operatör: Lac operonu. MCS: Çoklu klonlama bölgesi. ori: Bakteriyal replikasyon orijini. PETase: PETaz geni.

3.3.2. Ekspresyon Plazmiti (pET26b)

Bu çalışma kapsamında ekspresyon plazmiti olarak pET26b kullanıldı. pET vektörleri *E. coli*'de gen anlatımı için en çok tercih edilen vektörlerdendir. T7 promotör ve terminatör bölgelerini içerdiğinden bu vektörlerin gen anlatımı sistemi “T7 ekspresyon sistemi” olarak ifade edilir. T7 ekspresyon sistemi hedef proteinin bol miktarda üretimine olanak tanır. Anlatımı yapılacak olan gene ve bu genin son ürününe göre seçilebilecek çok sayıda pET vektör bulunmaktadır. Bu çalışmada enzim üretimi için kullanılmak üzere; PETaz geninin büyüklüğüne, PETaz enziminin moleküler ağırlığına, vektörün içerdiği protein etiketine (Histidin etiketi) ve konak organizmaya göre en uygun nitelikleri taşıdığı belirlenen pET26b vektörü (Novagen, 69862) seçildi.

pET26b vektörü 5360 bç büyüklüğünde olup (Şekil 3.3), 119 kDa'a kadar olan proteinlerin üretimi için uygundur. Ayrıca üretilen proteinin periplazmik bölgeye yönlendirilmesinin



3.4. BİYOİNFORMATİK TASARIM

Biyoinformatik tasarım işlemleri için öncelikle PETaz geni, PETaz geninin içerisinde bulunduğu pTZ57R/T klonlama vektörü ve pET26b ekspresyon vektörünün dizileri biyoinformatik olarak analiz edildi. Rekombinant DNA fragmentlerinin eldesi için kullanılacak en uygun restriksiyon endonükleazlar belirlendi. Restriksiyon enzimleri seçilirken bu enzimlere ait kesim bölgelerinin genin içerisinde herhangi bir bölgede ya da ekspresyon plazmitindeki MCS (çoklu klonlama bölgesi) dışında herhangi bir bölgede bulunmamasına dikkat edildi.

I. sakaiensis bakterisine ait PETaz geni (GenBank: A0A0K896T7), *E. coli*'de doğru formda ve aktivitedeki PETaz enzimini (E.C. 3.1.1.101) oluşturacak şekilde yeniden tasarlandı ve kodon optimizasyonu yapıldı. Kodon optimizasyonu işlemleri; GC içeriğini %40-60 aralığına getirmek ve CAI (Codon Adaptation Index - Kodon Adaptasyon Endeksi) oranını artırmak; böylece konak organizmanın otolizine ve hedef genin stabilitesini kaybetmesine sebep olmadan, en yüksek verimle protein üretimini sağlamak için yapıldı.

Kodon optimizasyonu için “ExpOptimizer” (NovoPro) aracı kullanıldı (Şekil 3.4). “Sequence Type” sekmesinden DNA/RNA seçildikten sonra *Ideonella sakaiensis* PETaz genine ait dizi “Sequence” sekmesi altındaki kutucuğa girildi. “Select Expression Host” bölümünden PETaz geninin anlatımının yapılacağı organizma olarak *E. coli* bakterisi seçildi. Son olarak “Select the restriction enzymes to exclude” bölümünden çalışmada kullanılacak olan *HindIII*, *NdeI* ve *StuI* enzimleri seçilerek; bu enzimlere ait kesim bölgelerini içermeyecek şekilde optimize dizi eldesi sağlandı. Böylece rekombinant DNA'nın oluşturulması için PETaz sentetik geninin klonlama vektöründen restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sırasında kodlama yapan DNA dizisinin herhangi bir bölgesinden kesim yapılması ve gen inaktivasyonunun meydana gelmesi riski ortadan kaldırıldı. Programın her bir kodon için sunduğu alternatif kodon dizilerinden *E. coli* bakterisinde gen anlatımı için en uygun olanları seçildi. Seçimler, tekrarlı bölgelerin oluşmasını ve restriksiyon enzimleri için kesim bölgesi oluşturacak dizilerin yanyana gelmesini engelleyecek şekilde yapıldı. Daha sonra “Submit” düğmesine basılarak programın her bir kodon için önerdiği alternatif kodonlar incelendi. CAI değerini artırmak amacıyla program tarafından önerilen kodonlar arasından kullanım frekansı en yüksek olan kodonların seçimi yapıldı. Birbirine yakın kullanım frekansına sahip olan kodonlar arasından seçim ise genin GC içeriğini %40-60 aralığında tutmak için; her bir kodonun GC içeriği göz önünde bulundurularak yapıldı.

0. Sequence Type: ☒ DNA/RNA ☐ Protein

1. Sequence (Paste the raw sequence, not fasta format):

Full length:873

```

211 CCCACCAACG CCGGCGGCAC CGTGGGCGCC ATCGCCATCG TGCCGGGCTA CACCGCGCGC CAGTCGAGCA
281 TCAAATGGTG GGGCCCGCGC CTGGCCTCGC ACGGCTTCGT GGTTCATCACC ATCGACACCA ACTCCACGCT
351 CGACCAGCCG TCCAGCCGCT CGTCGCAGCA GATGGCCGCG CTGCGCCAGG TGGCCTCGCT CAACGGCACC
421 AGCAGCAGCC CGATCTACGG CAAGGTCGAC ACCGCCCGCA TGGGCGTGAT GGGCTGGTCG ATGGGCGGTG
491 GCGGCTCGCT GATCTCGGCG GCCAACAACC CGTCGCTGAA AGCCGCGGCG CCGCAGGCCG CGTGGGACAG
561 CTCGACCAAC TTCTCGTCGG TCACCGTGCC CACGCTGATC TTCGCCTGCG AGAACGACAG CATGCCCCCG
631 GTCAACTCGT CCGCCCTGCC GATCTACGAC AGCATGTCGC GCAATGCGAA GCAGTTCCTC GAGATCAACG
701 GTGGCTCGCA CTCCTGCGCC AACAGCGGCA ACAGCAACCA GGCCTGATC GGCAGAAGG GCGTGGCCTG
771 GATGAAGCGC TTCATGGACA ACGACACGCG CTACTCCACC TTCGCCTGCG AGAACCCGAA CAGCACCCGC
841 GTGTCGGACT TCCGCACCGC GAACTGCAGC TGA

```

2. Select Expression Host:

E.coli

3. Select the restriction enzymes to exclude:

- | | | | | | |
|---------------------------------|---|--|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| ☐ AatII | ☐ Acc65I | ☐ AflIII | ☐ AgeI | ☐ AluI | ☐ ApaI |
| ☐ ApaLI | ☐ AscI | ☐ AseI | ☐ AvrII | ☐ BamHI | ☐ BclI |
| ☐ BfaI | ☐ BglII | ☐ BsiWI | ☐ BspEI | ☐ BspHI | ☐ BsrGI |
| ☐ BssHII | ☐ BstBI | ☐ BstUI | ☐ ClaI | ☐ DpnI | ☐ DraI |
| ☐ EagI | ☐ EcoRI | ☐ EcoRV | ☐ FseI | ☐ FspI | ☐ HaeIII |
| ☐ HhaI | ☒ HindIII | ☐ HpaI | ☐ KsaI | ☐ KpnI | ☐ MboI |
| ☐ MluI | ☐ MscI | ☐ MseI | ☐ MspI | ☐ NaeI | ☐ NarI |
| ☐ NciI | ☐ NcoI | ☒ NdeI | ☐ NheI | ☐ NlaIII | ☐ NotI |
| ☐ NruI | ☐ PacI | ☐ PaeR7I | ☐ PmeI | ☐ PmlI | ☐ PstI |
| ☐ PvuI | ☐ PvuII | ☐ RsaI | ☐ SacI | ☐ SacII | ☐ SalI |
| ☐ Scal | ☐ SmaI | ☐ SnaBI | ☐ SpeI | ☐ SphI | ☐ SrfI |
| ☐ SspI | ☒ StuI | ☐ XbaI | ☐ XhoI | | |

Clear

Submit

Şekil 3.4: PETaz geninin *E. coli* organizmasına göre kodon optimizasyonu için ExpOptimizer aracının kullanımı.

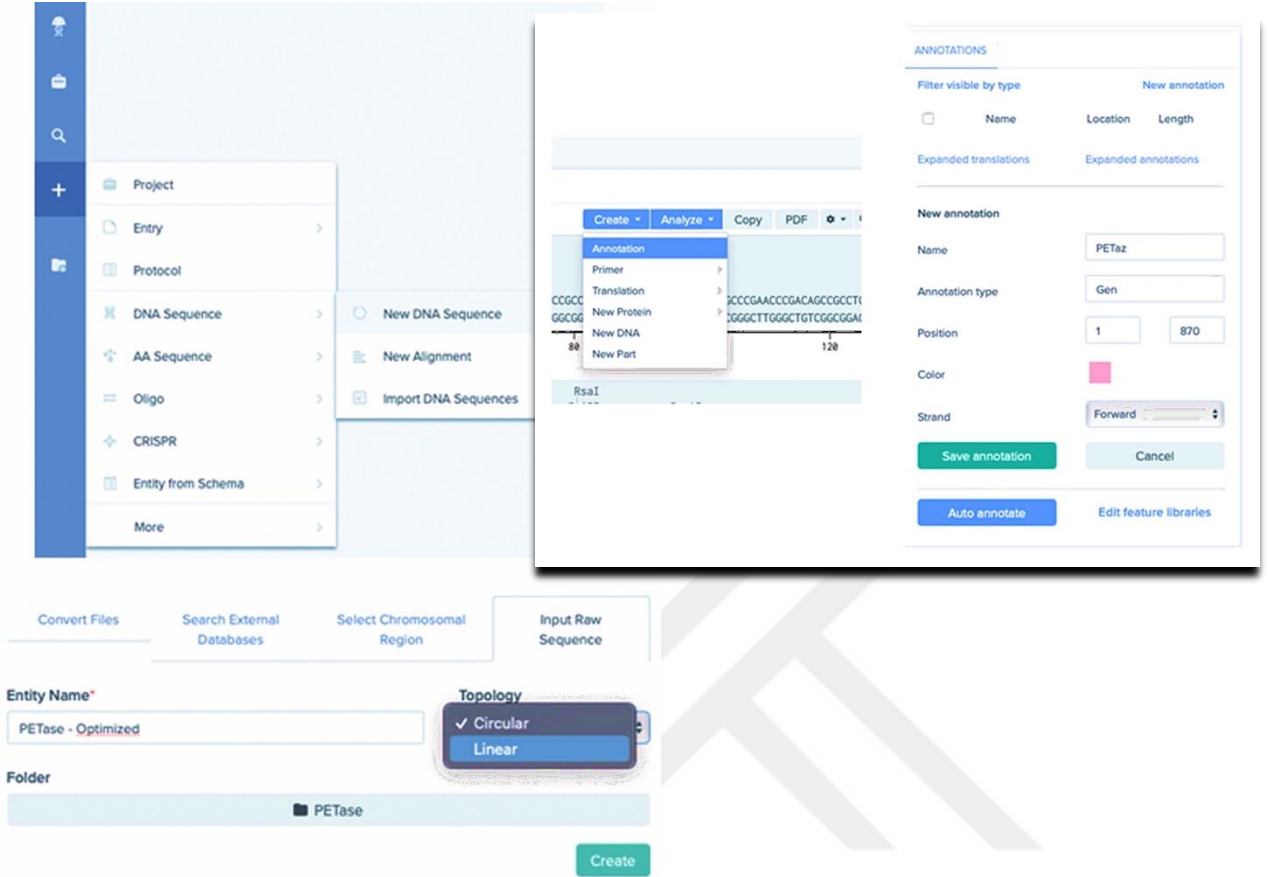
Optimize PETaz genine ait DNA dizisinin elde edilmesinden sonra, dizinin sonuna Histidin etiketine ait nükleotit dizisi (CACCACCACCACCACCAC) ve her iki ucuna restriksiyon enzimleri kesim bölgeleri biyoinformatik ortamda eklendi. Optimize PETaz dizisinin 5' ucuna *NdeI* enzimine ait kesim bölgesi (5'...CA[^]TATG...3') eklendi. Dizinin bitimini takiben 3' ucuna ise 6'lı Histidin etiketine ait nükleotit dizisi ve bu dizinin de hemen ardına *HindIII* (5'...A[^]AGCTT...3') restriksiyon enziminin kesim bölgesi eklendi. Enzimin sitoplazma içerisinde üretimi hedeflendiği için, restriksiyon enzimlerinin seçimi pET26b plazmitinde bulunan ve üretilen enzimin periplazmik alana yönlendirilmesini sağlayan pelB sinyal dizisinin

kesilerek plazmitten çıkarılmasına olanak verecek şekilde gerçekleştirildi. Bunun için MCS bölgesi dışında yer alan *NdeI* enzim kesim bölgesi hedeflenerek *pelB* sinyal dizisine ait bölgenin plazmitten kesilmesi sağlandı. Daha sonraki çalışmalarda farklı restriksiyon enzimleri ya da farklı vektörler ile çalışma gerekliliği duyulması halinde kullanılması amacıyla her iki uçta bu enzimlere ait kesim bölgelerinin dışında kalacak şekilde *StuI* enziminin kesim bölgesi de tasarlanan gen dizisine eklendi.

PETaz geninin *E. coli*'de uygun 3 boyutlu yapıda, yeterli aktivite ve verimde üretilebilmesi için yapılan kodon optimizasyonu çalışmalarının ardından rekombinant DNA molekülünü oluşturmak için yapılacak olan; restriksiyon endonükleazları ile kesim, agaroz jel elektroforezinde DNA fragmentlerinin eldesi ve ligasyon gibi önemli deneysel uygulamaların bilgisayar ortamında simülasyonu yapıldı. Böylece rekombinant plazmiti elde etmek için yapılacak çalışmalarda ulaşılması gereken ara sonuçlar ile başarılı rekombinasyon sonucunda oluşması beklenen rekombinant pET26b-PETaz plazmitine ait konformasyon ve dizi bilgileri belirlendi.

Restriksiyon enzimleri ile kesim ve ligasyonun simülasyonu için pET26b ekspresyon plazmiti ile, biyoinformatik olarak yeniden tasarlanmış PETaz geni ve DNA dizilerine ait özel bölgeler “Benchling” programına girilerek tanımlandı. Bu DNA dizilerinin programa girilebilmesi için ana sayfada bulunan “+” düğmesine basılarak açılan pencerelerden sırasıyla “DNA Sequence” ve “New DNA Sequence” seçildi. Daha sonra açılan pencerede PETaz geni doğrusal olduğu için “PETase – Optimized” ismi girildikten sonra “Topology” sekmesinden “Linear” seçildi. Plazmitlerin eklenmesi sırasında plazmitler halkasal yapıda olduğundan bu sekmeden “Circular” seçimi yapıldı. “Create” düğmesine basıldıktan sonra açılan ekrana PETaz geninin optimize edilmiş haline ait dizi bilgisi kopyalandı. Daha sonra ekranın sağ üst köşesinde yer alan “Create” sekmesinden “Annotation” seçildi. Açılan ekrana ilgili genin ismi yazılıp “annotation type” kısmına “gen” yazıldı. Tüm bu işlemler eklenen restriksiyon enzimi kesim bölgeleri ve plazmit DNA’lar için tekrarlandı. Böylece DNA dizileri üzerindeki tüm bilgiler sisteme tanımlandı.

Benchling programının kullanımı ile ilgili aşamalar Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5: DNA dizilerinin Benchling programına işlenmesi ve farklı bölgelerinin tanımlanması.

Program üzerinde tanımlanan bölgeler: promotör ve terminatör dizileri, PETaz gen kodlama bölgesi, restriksiyon enzimi kesim bölgeleri, lac operonu, histidin-etiket bölgesi, çoklu klonlama bölgesi.

3.4.1. PETaz Genini İçeren Ekspresyon Plazmitinin (pET26b-PETaz) Biyoinformatik Ortamda Görselleştirilmesi ve Genetik Konformasyonunun Belirlenmesi

5' ucunda *NdeI* ve 3' ucunda *HindIII* restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri bulunan PETaz sentetik genini taşıyan pTZ57R/T vektörü ile pET26b ekspresyon vektörüne ait plazmit DNA'nın dizileri 3.3.1'de anlatıldığı şekilde Benchling programına yüklendi ve her iki plazmit vektörün üzerindeki önemli diziler tanımlanarak etiketlendi.

Tanımlama işleminin ardından, restriksiyon enzimleri ile kesim ve ligasyon işlemleri sonrası rekombinant DNA elde edilmesi bilgisayar ortamında simüle edildi. Böylece kesim sonrası

oluşan yapışkan uçların uyumluluğu, agaroz jelde elde edilecek DNA fragmentlerine ait bilgiler, rekombinant plazmitin yapısı, büyüklüğü ve elemanları, PETaz geninin plazmit üzerindeki konumu ve yönü gibi önemli parametreler program üzerinde belirlendi ve görselleştirildi.

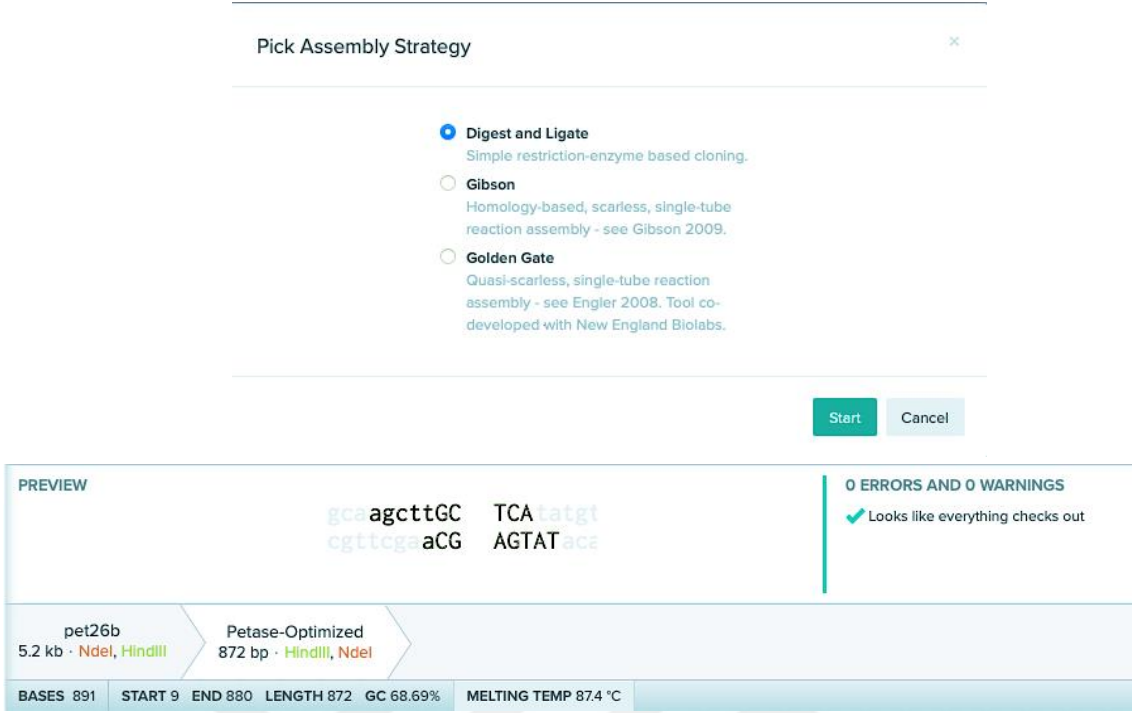
PETaz geni ve pET26b plazmitinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi sonrasında agaroz jelde oluşması beklenen DNA fragmentlerinin boyut, sayı ve jel üzerindeki konumları belirlendi. Agaroz jelde oluşacak bantlara ait görüntülerin eldesi için program ana sayfasında sağ kısmında bulunan “Digests” sekmesine girilerek, açılan penceredeki listeden *HindIII* ve *NdeI* enzimleri seçildi ve “Run Digest” düğmesine basıldı (Şekil 3.6).

The screenshot shows the 'NEW DIGEST' tab in the Benchling software. The 'Enzyme Lists' dropdown is set to 'Deduplicated Commercial'. The 'Cut Sites Visible on Maps' dropdown is set to 'Single Cutters'. The 'Find Enzyme' section has a search bar with the text 'Search by name or number of cuts'. Below this is a table with columns: Name, Cuts, Selected, and Color. The table lists several enzymes: HindIII (1 cut, selected), HinfI (0 cuts), HpaI (0 cuts), HpaII (5 cuts), and HphI (4 cuts). The 'HindIII' row is highlighted in orange. Below the table, there is a 'Show enzymes that cut' dropdown set to 'anywhere in the sequence' and a checkbox for 'Highlight enzymes with compatible sticky ends' which is checked. At the bottom is a blue 'RUN DIGEST' button.

Name	Cuts	Selected	Color
HindIII	1	☒	Red
HinfI	0	☐	Green
HpaI	0	☐	Blue
HpaII	5	☐	Yellow
HphI	4	☐	Purple

Şekil 3.6: Benchling programında restriksiyon enzimleri ile kesim işleminin simülasyonu.

Kesilerek agaroz jelden izole edilen DNA fragmentlerini ligasyon işlemlerinin simülasyonu için ana sayfanın sağ alt kısmında bulunan “Assembly Wizard” sekmesinden “Digest and Ligase” seçildi. Burada yer alan “Backbone” sekmesi için bir önceki aşamada restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pET26b plazmit omurgası, “Insert” kısmına ise yine aynı aşamada restriksiyon enzimleri ile kesilmiş PETaz geni seçildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: Benchling programında restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA fragmentlerinin ligasyon simülasyonu.

Biyoinformatik tasarım işlemlerinin tamamlanmasının ardından, çalışmalarda kullanılacak olan DNA dizilerinin temini aşamasına geçildi. PETaz enziminin asıl üretildiği organizma olan *Ideonella sakaiensis* bakterisine ulaşarak DNA izole etmek bu çalışma kapsamında mümkün olmadığından, tasarımı yapılan PETaz geni, pTZ57R/T vektörünün içinde sentetik gen üretimi ile elde edildi (Sentegen, Ankara). pET26b ekspresyon vektörü ise üretici firma Novagen'den temin edildi.

3.5. PLAZMİTLERİN ÇOĞALTILMASI

Çalışma boyunca kullanılan pTZ57R/T-PETaz ve pET26b plazmitleri ile rekombinant plazmitin; restriksiyon enzimi ile kesim, ligasyon ve transformasyon işlemlerinde kullanılmak üzere yeterli miktarda çoğaltılması amacıyla bu plazmitler *E. coli* DH5α ırkına ısı şoku yöntemiyle transforme edilerek çoğaltıldı. İçerdiği antibiyotik direnç genine uygun antibiyotiği içeren LBA besiyerinde seçilen transformant hücreler, yine uygun antibiyotiği içeren 2'şer adet 5 mL'lik LBB içeren 15 mL'lik deney tüplerine öze ucuyla alınıp aktarıldıktan sonra, 150 rpm hızda çalkalama yapan 37°C sıcaklıktaki çalkalamalı inkübatörde (CLS, CLSI-55T) gece boyu inkübe edilerek çoğaltıldı. LBB sıvı besiyerinde çoğaltılan farklı plazmitlerin aktarıldığı 2'şer

adet 5 mL’lik hücre kültürlerinden biri -80°C’de gliserol stoğa alındı, ikincisi ise plazmit izolasyonunda kullanıldı. Çoğaltılan ve izole edilen plazmitler sonraki aşamalarda rekombinant DNA’nın oluşturulması için yapılan deneylerde kullanıldı.

3.5.1. Kompetant *E. coli* Bakterilerinin Hazırlanması

Transformasyon işleminin gerçekleştirilebilmesi amacıyla hem *E. coli* DH5α hem de *E. coli* SHuffle hücreleri CaCl₂ yöntemi ile kompetant (transformasyona yeterli) hale getirildi. Bu işlem için 5 mL LBB içeren 15 mL’lik deney tüpünde 37°C ve 150 rpm’de bir gece boyunca üretilen sıvı *E. coli* kültürünün 0.5 mL’si 50 mL’lik yeni bir LBB besiyerine ekilip, 37°C ve 150 devir/dakika hızda OD₆₀₀ = 0.4 olana kadar üretildi. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler soğuk koşullarda gerçekleştirildi. Elde edilen kültür 10 dakika boyunca buzda bekletildikten sonra önceden 4°C’ye ayarlanan soğutmalı santrifüjde (Nüve, NF80R) 14.000 rpm’de 4 dakika boyunca santrifüjlendi. Daha sonra elde edilen süpernatant atılarak pellet, üzerine 4°C sıcaklıkta 10 mL 0.1 M CaCl₂ (Merck, 208291) eklenerek homojen hale getirildi ve hücreler 30 dakika buzda bekletildi. Santrifüj işlemi tekrarlandıktan sonra elde edilen pellet 2 mL 0.1 M CaCl₂ içinde süspanse edilip her 200’er µl’lik hücre süspansiyonu bir transformasyon için ayrıldı ve kullanılabilecek kadar -20°C buzdolabında saklandı.

3.5.2. PETaz Genini İçeren Klonlama Plazmitinin (pTZ57R/T-PETaz) *E.coli* DH5α’ya Transformasyonu

Bir önceki aşamada kompetant hale getirilmiş olan *E. coli* DH5α hücre süspansiyonundan 200 µL alınarak, PETaz enzimine ait optimize nükleotid dizisini taşıyan 1 µg pTZ57R/T-PETaz plazmit DNA’sı (plazmitin izolasyonu 3.6 başlığında anlatılacaktır) ısı şoku yöntemi (Mandel ve Higa, 1970) ile bu hücrelere transforme edildi. Bunun için kompetant hücreleri içeren Eppendorf tüpüne plazmit DNA’sı eklenip 30 dakika boyunca buzda bekletildikten sonra, 42°C su banyosunda 90 saniye tutuldu ve ardından hemen buza koyularak 2 dakika bekletildi. İşlem sonrası buzdan alınan tüp içerisine daha önceden hazırlanarak steril edilmiş ve 37°C’ye ısıtılmış 800 µL SOC besiyeri eklenerek son kültür hacmi 1 mL’ye tamamlandı. Elde edilen kültür 37°C ve 150 rpm’de 90 dakika inkübe edildikten sonra 100 µL/Petri olacak şekilde 100 µg/mL ampicilin antibiyotiği içeren LBA Petrilere yayma yöntemi ile ekildi.

3.5.3. Ekspresyon Plazmitinin *E. coli* DH5α'ya Transformasyonu

Daha önce kompetant hale getirilmiş olan 200 µL'lik *E. coli* DH5α hücre süspansiyonuna, ekspresyon vektörü olarak kullanılacak pET26b plazmiti 3.5.2.'de anlatıldığı şekilde ısı şoku yöntemiyle transforme edildi. Kültür 37°C ve 150 rpm'de 90 dakika inkübe edildikten sonra 100 µL/Petri olacak şekilde 50 µg/mL kanamisin antibiyotiği içeren LBA Petrilere yayma yöntemi ile ekildi.

3.5.4. Transformasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Plazmitlerin çoğaltılması için *E.coli* DH5α bakterisine transformasyonla aktarımı sonrası seçici katı besiyeri içeren her bir Petri kabında ertesi gün üreyen koloniler belirlenerek transformasyon etkinliği hesaplandı. Transformasyon etkinliğini hesaplayabilmek için öncelikle Petrilere ekim sırasında eklenen DNA miktarı;

$$\text{Petrideki DNA Miktarı} = \frac{\text{Petriye ekilen hücre hacmi } (\mu\text{L}) \times \text{DNA miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Toplam hücre hacmi } (\mu\text{L})}$$

formülü ile hesaplandı.

Daha sonra her bir Petride inkübasyon sonrasında oluşan koloni sayısı belirlendi (CFU). Bulunan CFU değeri aşağıdaki formüle yazılarak "Transformasyon Etkinliği" hesaplandı (He ve diğ., 2005).

$$TE = \frac{CFU}{\text{Petrideki DNA miktarı } (\mu\text{g})}$$

TE: Transformasyon Etkinliği. **CFU:** Colony Forming Unit. **Petrideki DNA miktarı:** Transformasyon sırasında hücreler üzerine eklenen DNA'dan, Petriye ekilen hücreler ile birlikte gelen kısım.

3.6. PLAZMİT İZOLASYONU

pTZ57R/T-PETaz DNA'sının aktarıldığı *E. coli* DH5α bakteri kültürünün 37°C'lik inkübatörde (CLS, CLGI 55T) gece boyunca LBA+100 µg/mL ampicilin seçici besiyeri içeren Petri kaplarında inkübasyonu sonrası, besiyerinde üreyen koloniler seçilerek, 15 mL'lik deney tüplerinde bulunan 5 mL LBB+100 µg/mL ampicilin besiyerine ekildi. pET26b ve pET26b-

PETaz plazmitlerinin izolasyonu için ise bu plazmitlerin aktarıldığı *E.coli* DH5 α bakteri kültürlerinin 37°C'lik inkübatörde gece boyunca LBA+50 μ g/mL kanamisin seçici besiyeri içeren Petri kaplarında inkübasyonu sonrası, besiyerinde üreyen koloniler seçilerek, 15 mL'lik deney tüplerinde bulunan 5 mL LBB+50 μ g/mL kanamisin besiyerine ekildi. Tüm kültürler 37°C ve 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası çoğalan transformant hücre kültürlerinden plazmit izolasyonu "GeneJET Plasmid Miniprep Kit" (Thermo Scientific, K0502) plazmit izolasyon kiti (kit içeriğindeki tamponlar ve kullanım amaçları Tablo 3.5'te verildi.) ile üreticinin talimatlarında bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi.

Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen 5 mL'lik hücre kültürleri 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı. Hücrelerin süspansiyon haline getirilebilmesi için pelletlerin üzerine 250'şer μ L "Resuspension Solution" eklendi ve vorteks (Dragonlab, MX-F) ile tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Ardından, hücrelerin parçalanması ve plazmit DNA'ların serbest kalması için, elde edilen hücre süspansiyonlarının üzerine 250'şer μ L "Lysis Solution" eklendi ve tüpler 6'şar kez yavaşça ters yüz edildi. Bu aşamada plazmit DNA'ların zarar görmemesi için çok hızlı ya da çok uzun süreli karıştırmadan kaçınıldı. Liziz sonrası nötralizasyonu sağlamak için süspansiyonlar üzerine 350'şer μ L "Neutralization Solution" eklenerek yine 6'şar kez yavaşça ters yüz edildi. Liziz aşamasında olduğu gibi plazmit DNA'lara zarar verecek uygulamalardan kaçınıldı. Liziz ve nötralizasyon sonrası açığa çıkan hücre zarı ve diğer istenmeyen hücre bileşenlerinin ayrılması için karışımlar 12.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi. Plazmit DNA'larını içeren süpernatantlar pelletle temas etmeden dikkatlice ve mikropipet yardımıyla tüplerden alınarak "GeneJET Spin Column" kolonlarına aktarıldı. Kolonların zarar görmemesi için bu aşamada pipet ucunu kolonlara değdirmemeye ve doğrudan kolonlar üzerine püskürtme yapmamaya dikkat edildi. Süpernatantların aktarıldığı kolonlar 10.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi ve plazmit DNA'ların kolona bağlanması sağlandı. Santrifüj sonrası toplama tüpünde biriken sıvı kısımlar atılarak DNA dışındaki diğer istenmeyen moleküllerin yıkanarak atılması için kolonlara 500'er μ L "Wash Solution" eklenerek 12.000 rpm'de 1'er dakika boyunca santrifüjlendi. Sıvı kısım atılarak yıkama işlemi tekrarlandı. Kolonları kurutarak etanol kontaminasyonunu engellemek amacıyla boş kolonlar 12.000 rpm'de 2 dakika boş şekilde santrifüjlendi. Santrifüj sonrası kolonlar toplama tüplerinden ayrılarak yeni steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Kolonlar üzerine 30'ar μ L "Elution Buffer" eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 13.000

rpm’de 2 dakika santrifüjlenerek DNA’ların temiz tüplere çökmesi sağlandı. Tüplerde toplanan plazmit DNA’ları daha sonra kullanılmak üzere -20°C buzdolabına kaldırıldı.

Tablo 3.5: “GeneJET Spin Column” plazmit izolasyon kitinde bulunan tamponlar ve çalışmada kullanım amaçları.

Tampon	Kullanım Amacı
Resuspension Solution	İzolasyonun yapılacağı hücre kültürü çöktürüp süpernatanttan ayrıldıktan sonra çöken hücrelerin plazmit izolasyonu için yeniden süspansiyon haline getirilmesi
Lysis Solution	Yeniden süspanse edilmiş bakteri hücrelerinin parçalanarak hücre içeriğinin ortama salınması
Neutralization Solution	Liziz sonrası oluşan solüsyon içerisinde DNA’nın zarar görmemesi için ortam pH’nın düzenlenmesi
Wash Solution	Parçalanarak nötralize edilen hücre lizatının santrifüjle çötürülerek elde edilen homojenatın kolona eklendikten sonra yıkanması ve DNA dışındaki moleküllerin uzaklaştırılması
Elution Buffer	Yıkanan kolonda bulunan saf DNA’nın kolondan ayrılarak deney tüpünde elde edilmesi

3.6.1. İzole Edilen DNA Örneklerinin Miktar ve Sıfık Analizi

Çalışmalar boyunca farklı kaynaklardan (*E.coli*’den ya da agaroz jelden) izole edilen tüm DNA örneklerinin sıfık ve konsantrasyon ölçümleri 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede gerçekleştirildi. Spektrofotometrik ölçüm sonrası örneklerin DNA kontaminasyonu içermediğinden ve izolasyon esnasında zarar görerek parçalanmadığından emin olmak için izole edilen DNA’lar agaroz jele yüklenerek kontrol edildi.

3.6.1.1. Spektrofotometrik Ölçüm

E.coli’den ya da agaroz jelden izole edilen DNA örneklerinin spektrofotometrik analizi UV-Vis Spektrofotometre (Implen, N50) ile gerçekleştirildi. Ölçüm için cihazın açılış ekranında bulunan menüden “Nucleic Acids” seçildi. Açılan ekrandaki menüden, bu çalışmada ölçümü yapılan DNA’lar çift iplikli yapıda olduğundan “dsDNA” seçildi. DNA örneklerinin içerisinde çözdürüldüğü elüsyon tamponundan 1,5 μL alınarak cihaza yüklendi ve “BLANK” tuşuna basıldı, böylece içerisinde DNA bulunmayan solüsyonun absorbansı ölçülerek referans kabul edildi. Cihazın yükleme alanı distile H_2O ile temizlendikten sonra, izole edilen DNA örneklerinden 1,5 μL alınarak cihaza yüklendi ve “SAMPLE” düğmesine basıldı. Tüm DNA

örneklerinin aynı şekilde absorbans ölçümü yapılarak miktar ve saflık analizleri gerçekleştirildi. Her bir örnek için ölçüm işlemi iki kez tekrarlandı.

3.6.1.2. Agaroz Jelde Kontrol

E.coli'den izole edilen plazmit DNA'larının kontrolü %1'lik agaroz jelde yapıldı. Rekombinant DNA'nın oluşturulması için kullanılmak üzere restriksiyon enzimleriyle kesilen ve jelde ayrılarak izole edilen DNA örnekleri ise jelden izolasyon verimini artırmak amacıyla %0.6'lık agaroz jelde yürütüldü (Bölüm 3.7.3'te anlatılacaktır).

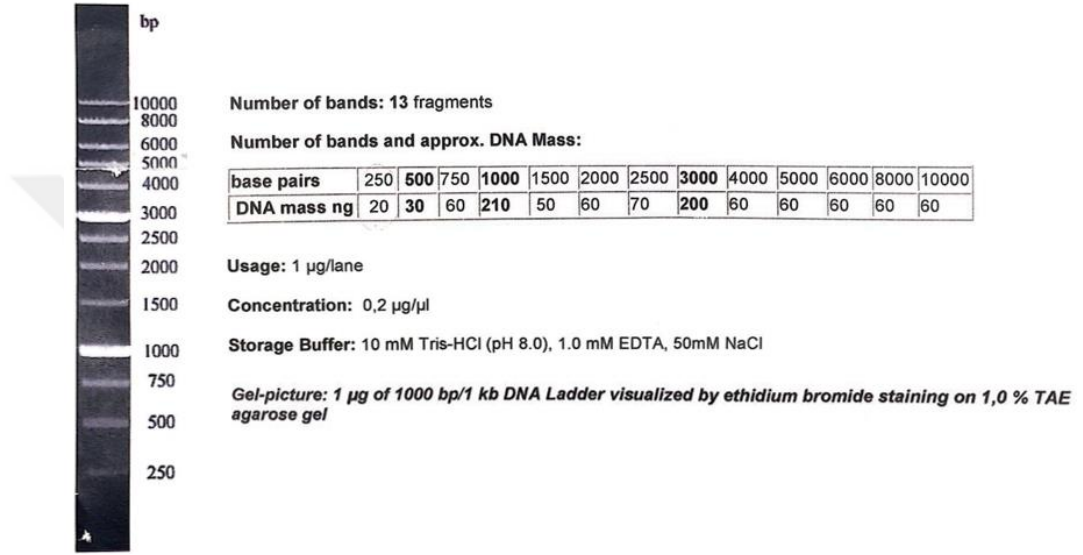
Agaroz jeli hazırlamak için öncelikle 50X TAE (Tris-asetat-EDTA) stok solüsyonu Tablo 3.6'da verilen bileşimde hazırlandı. 1 litre 50X TAE tamponunu hazırlamak için 242 g Tris (Neofroxx, 1115KG001) tartılarak üzerine 750 mL distile H₂O eklendi. Manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra üzerine 57.1 mL glasiyel asetik asit (Merck, 1.0063.2500) ve 0.5 M EDTA (Neofroxx, 1340GR500) eklendi. Elde edilen homojen karışımın hacmi distile H₂O ile 1 litreye tamamlandı.

Tablo 3.6: 50X TAE stok solüsyonunun bileşenleri.

Bileşen	Miktar (1 litre için)
Tris	242 g
Glasiyel asetik asit	57.1 mL
EDTA (0.5 M)	10 mL
1X TAE Tamponu (1 L)	20 mL 50X TAE, 980 mL dH ₂ O
*0.5 M EDTA (1 L)	146,12 g EDTA, 40 g NaOH (pH 8.0)

%1'lik agaroz jel hazırlamak için 50X TAE tamponunun 20 mL'sine 980 mL distile H₂O eklenerek 1X TAE tamponu elde edildi. Daha sonra 1 g agaroz (peqGOLD, 35-1010) tartılıp üzerine 100 mL 1X TAE eklendi. Mikrodalga fırında (Vestel, MD20MB) her 1 dakikada bir çalkalanarak toplam 3 dakikada eritildi. Oda sıcaklığında ~50-55°C sıcaklığa gelene kadar bekletildikten sonra, üzerine son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde Etidyum Bromür (Neofroxx, 1254ML015) eklendi. Etidyum bromürün jel içerisinde homojen şekilde dağılması için yavaşça karıştırıldıktan sonra, karışım önceden hazırlanmış ve tarak yerleştirilmiş yatay elektroforez kasetine döküldü. Jelin katılaşması için kaset oda sıcaklığında 40 dakika bekletildi.

Katılaşılan jel 1X TAE tamponu içeren yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Tarak çıkarıldıktan sonra oluşan kuyucuklara, 50 μ L örnek ve 10 μ L 6X loading dye (yükleme boyası; NEB, B7024S) karıştırılarak oluşturulan 60 μ L'lik örnekler yüklendi. Marker olarak “GeneON 1kb DNA Ladder” (Şekil 3.8) kullanıldı. Örnekler 120 voltta (10 V/cm) 25 dakika boyunca yürütüldü. Agaroz jel elektroforezi sonrasında oluşan DNA bantları 302 nm dalga boyundaki UV ışık altında gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.



Şekil 3.8: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan “GeneON 1kb DNA Ladder”.

3.7. REKOMBİNANT DNA’NIN OLUŞTURULMASI

Çalışmanın bu aşamasında, daha önce 3.5.2 ve 3.5.3’te anlatıldığı üzere *E. coli* DH5 α ’ya transformasyonla aktararak çoğaltılan ve izole edilen pTZ57R/T-PETaz klonlama plazmiti ile pET26b ekspresyon plazmiti rekombinant DNA’yı oluşturmak üzere *HindIII* ve *NdeI* restriksiyon endonükleazları ile kesime uğrattıldı. Enzim kesimi sonrasında oluşması beklenen DNA fragmentlerinin görünür hale getirilmesi ve elde edilebilmesi için agaroz jel elektroforezi yapıldı. PETaz genine ve pET26b plazmitinin omurgasına ait DNA fragmentleri agaroz jelden izole edildi. Bu fragmentler ligasyon reaksiyonuna tabi tutularak rekombinant pET26b–PETaz plazmitinin oluşması sağlandı.

3.7.1. PETaz Geni İçeren Klonlama Plazmitinin (pTZ57R/T-PETaz) Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

Biyoinformatik olarak yeniden tasarlanmış PETaz genini içeren pTZ57R/T-PETaz plazmiti, genin her iki ucuna yerleştirilmiş tanıma bölgeleri bulunan *HindIII* (NEB, R3104) ve *NdeI* (NEB, R0111S) restriksiyon enzimleri ile 37°C sıcaklığa ayarlanan su banyosunda 4 saat boyunca çiftli kesime bırakıldı. Reaksiyon tamponu olarak her iki enzimin de aktif olarak kesim yapabildiği “10X CutSmart” tamponu kullanıldı. Kesim reaksiyonu Tablo 3.7’de verilen şekilde hazırlandı. En iyi verimde çalışmaları için tüm reaksiyon bileşenleri steril tüpe aktarılıp karıştırıldıktan sonra *HindIII* ve *NdeI* restriksiyon enzimleri en son eklendi.

Tablo 3.7: pTZ57R/T-PETaz plazmitinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu bileşenleri.

Bileşen	Miktar (µL)
pTZ57R/T-PETaz	20 (2 µg)
<i>HindIII</i>	1
<i>NdeI</i>	1
Tampon (10X CutSmart)	10
Nükleazsız Su	18
Toplam	50

3.7.2. Ekspresyon Plazmitinin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

pET26b ekspresyon plazmiti, PETaz geni ile yapışkan uç ligasyonu yapmak üzere uygun uçların oluşması için, 3.7.1.’de anlatıldığı gibi *HindIII* ve *NdeI* enzimleri ile çiftli kesime bırakıldı. Kesim reaksiyonu Tablo 3.8’de verilen bileşimde hazırlandı.

Tablo 3.8: pET26b ekspresyon plazmitinin restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonu bileşenleri.

Bileşen	Miktar (μl)
pET26b	30 (3 μg)
<i>HindIII</i>	1
<i>NdeI</i>	1
Tampon (10X CutSmart)	10
Nükleazsız Su	8
Toplam	50

3.7.3. Agaroz Jel Elektroforezinde DNA Fragmentlerinin Ayrılması

HindIII ve *NdeI* restriksiyon enzimleri ile çiftli kesime uğratılan pTZ57R/T-PETaz plazmiti ile pET26b ekspresyon plazmiti, %0.6'lık (w/v) agaroz jelde 60 voltta (5V/cm) 60 dakika boyunca yürütüldü.

%0.6'lık agaroz jel hazırlamak için 0.6 gr agaroz tartıldıktan sonra 3.6.1.2'de anlatıldığı şekilde agaroz jel hazırlandı. Jelde elde edilen kuyucuklara, 50 μL kesim reaksiyonu ve 10 μL 6X loading dye (yükleme boyası; NEB, B7024S) karıştırılarak oluşturulan 60 μL'lik örnekler yüklendi. Marker olarak "GeneON 1kb DNA Ladder" (Şekil 3.8) kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi sonrasında oluşan DNA bantları 302 nm dalga boyundaki UV ışık altında gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

3.7.4. DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Saflaştırılması

Agaroz jel elektroforezi sonucu PETaz genine ve pET26b plazmit omurgasına ait olduğu belirlenen DNA fragmentleri UV ışık kaynağı altında bistüri yardımıyla kesildi ve 1.5 mL'lik Eppendorf tüplerine alındı. Jelden geri kazanım işlemi "GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)" (Vivantis, GF-GC-100) jel ve PCR izolasyon kiti (kit içeriğindeki tamponlar ve kullanım amaçları Tablo 3.9'da verildi.) ile üreticinin önerdiği koşullarda bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Boş Eppendorf tüplerinin darası alındıktan sonra, içinde jel parçaları bulunan tüpler ayrı ayrı tartılarak, içeriğindeki jelin net ağırlığına göre üzerine 1 hacim "Buffer DB" eklendi. Jel ağırlığı ve tampon miktarı PETaz için 0.1 g ve 100 μL, pET26b için ise 0.18 g ve

180 µL olarak belirlendi. Eppendorf tüpleri içinde bulunan jel ve tampon karışımları daha önceden 50°C sıcaklığa ayarlanan su banyosuna (CLS, CLWB-14T) yerleştirildi. Tüpler her 1 dakikada bir karıştırılarak jel parçaları tamamen eriyene kadar su banyosunda tutuldu. Jeller tamamen eritildikten sonra elde edilen homojen karışımlar kit içerisinde sağlanan kolonlu toplama tüplerine yüklendi. Bağlanma etkinliğini artırmak için tüpler belirtilenden düşük hızda (10.000xg yerine 6000xg) ve daha uzun sürede (1 dk yerine 10 dk) santrifüjlendi. Kolondan geçen alt sıvıda herhangi bir DNA örneği kalma ihtimaline karşın bu adım iki kez tekrarlandı. İkinci bağlanmadan sonra alt sıvı atılarak kolonlara 650 µL “Wash Buffer” eklenerek istenmeyen bileşenlerin yıkanması için tüpler 10.000 rpm’de 1’er dakika santrifüjlendi. Süzüntü atıldıktan etanol kontaminasyonunu önlemek için toplama tüpleri aynı ayarda bir kez de boş şekilde santrifüjlendi. Kolonların üzerindeki etanolün tamamen uçurulması için tüpler çalışma kabini içerisinde kapakları açık şekilde 5 dakika bekletildi. Kurutma sonrasında kolonlar toplama tüplerinden ayrılarak steril 1,5 mL’lik Eppendorf tüplerine yerleştirildi. Kolonlardaki DNA’nın elüsyonu için nükleazsız su kullanıldı. Elüsyon etkinliğini artırmak için nükleazsız su kolona yükleme öncesinde 70°C’ye ısıtıldı ve çift elüsyon uygulandı. Toplam hacim 50 µL olacak şekilde; ilk elüsyonda 30 µL, ikinci elüsyonda ise 20 µL nükleazsız su yüklenen kolonlar oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 10.000 rpm’de 1’er dakika santrifüjlendi. Eppendorf tüplerinde çöken sıvılar DNA kaynağı olarak kullanıldı. Elde edilen DNA’lar 3.6.1.’de anlatıldığı şekilde analiz edildi ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

Tablo 3.9: “Vivantis GF-1 AmbiClean Kit (PCR & Gel)” Jelden DNA Saflaştırma kitinin içerisinde bulunan tamponlar ve çalışmada kullanım amaçları.

Tampon	Kullanım Amacı
Buffer DB	İzole edilecek DNA’nın bulunduğu jelin eritilerek kolona bağlanması
Wash Buffer	İzole edilecek DNA’nın içerisinde bulunduğu jel eritilip kolona yüklendikten sonra, istenmeyen kirletici maddelerin DNA örneğinden uzaklaştırılması

3.7.5. PETaz Geni ile pET26b Ekspresyon Plazmitinin Ligasyonu

Jelden geri kazanımı yapılan PETaz genine ve pET26b plazmit omurgasına ait DNA fragmentleri “Thermo Scientific™ T4 DNA Ligase” kullanılarak DNA:vektör oranı 3:1 olacak şekilde Tablo 3.10’da gösterilen bileşimde bir araya getirildi. En iyi verimde çalışması için tüm reaksiyon bileşenleri steril Eppendorf tüpüne aktarılıp karıştırıldıktan sonra T4 DNA Ligaz en son eklendi. Ligasyonun gerçekleşmesi için reaksiyon karışımı 4°C’de buzdolabında bir gece inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.10: Ligasyon reaksiyonu bileşenleri.

Bileşen	Miktar (μl)
Insert DNA (PETaz)	2,5 (0.9 pmol)
Vektör (pET26b)	3 (0.03 pmol)
T4 DNA Ligaz (5U / μL)	0.2
T4 DNA Ligaz Buffer (10X)	2
Nükleazsız Su	12,3
Toplam	20

3.8. REKOMBİNANT DNA’NIN ÇOĞALTILMASI VE SAFLAŞTIRILMASI

3.7.5.’te anlatıldığı üzere hazırlanan ligasyon reaksiyonunun 5 μL’si, 3.5.1’de belirtildiği şekilde kompetant hale getirilen *E. coli* DH5α hücrelerine 3.5.2’de belirtildiği şekilde transformasyonla aktarıldı. Transformasyon sonrası 50 μg/mL kanamisin içeren LBA seçici besiyerinin bulunduğu Petri kaplarına ekilen hücreler 37°C sıcaklıktaki inkübatörde bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası transformasyon etkinliği daha önce 3.5.4’te anlatıldığı şekilde hesaplandı. Seçici besiyerinden seçilen transformant kültürler 50 μg/mL kanamisin içeren 5 mL LBB besiyerinin bulunduğu 15 mL’lik deney tüplerinde 37°C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca çoğaltıldı. Gecelik inkübasyon sonrası hücreler, sıvı kültürlerin 10.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlenmesiyle çöktürüldü. Elde edilen hücre pelletleri sıvı besiyerinden tamamen arındırılarak -20°C’de 30 dakika bekletildi. Koloni PCR ile analiz edildikten sonra pozitif sonuç

verenler seçilerek bu hücre pelletlerinden plazmit izolasyonu “Thermo Scientific™ GeneJet Plasmid Miniprep Kit” ile 3.5.4.’te daha önce belirtildiği şekilde yapıldı.

3.9. REKOMBİNANT DNA’NIN ANALİZİ VE KONTROLÜ

pET26b plazmiti ile PETaz enziminin ligasyonu sonrası 3.4’te anlatılan biyoinformatik tasarıma uygun boyut ve konformasyona sahip pET26b-PETaz rekombinant plazmitlerini taşıyan kolonileri seçmek amacıyla kontrol çalışmaları yapıldı. Bunun için öncelikle, rekombinant plazmitin içinde bulunduğu ligasyon reaksiyonu *E. coli* DH5 α bakterisine 3.5.2’de belirtildiği şekilde transformasyonla aktarıldı. Transformasyonun yapıldığı hücre kültürü 50 μ g/mL kanamisin içeren seçici LBA besiyerinin bulunduğu Petri kaplarına ekilerek bir gece boyunca 37°C’ye ayarlanan inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası koloni oluşturan hücrelerden örnekler alınarak rekombinant plazmiti taşıyan kolonileri belirlemek için bu örnekler koloni PCR ile analiz edildi. Koloni PCR’da pozitif sonuç veren kolonilerden rekombinant plazmit DNA’sı izole edildi. İzole edilen plazmitler *HindIII* ve *NdeI* restriksiyon enzimleriyle çiftli kesime bırakılarak agaroz jelde kontrol edildi.

3.9.1. Koloni PCR

Ligasyon ve transformasyon sonrası kanamisinli LBA besiyerinde elde edilen kolonilerden 10 adet seçilerek koloni PCR ile analiz edildi. pET26b-PETaz plazmiti içerisinde T7 promotör ve terminatör bölgeleri bulunduğundan, PETaz geninin varlığını saptamak için yapılan koloni PCR’da dizi bilgisi Tablo 3.11’de verilen standart T7 primerleri kullanıldı.

Tablo 3.11: Koloni PCR’da kullanılan T7 primerlerine ait nükleotid dizileri.

T7 Forward Primer	5’TAATACGACTCACTATAGGG3’
T7 Reverse Primer	5’GCTAGTTATTGCTCAGCGG3’

PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için “GeneON PCR Kit” kullanıldı. Besiyerinde seçilen koloniler 15 mL’lik deney tüpünde bulunan 5 mL LBB+50 μ g/mL kanamisin besiyerine ekilerek 37°C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan çalkalamalı inkübatörde bir gece boyunca üretildi. Elde edilen hücre kültürleri 10.000 rpm’e ayarlanan santrifüjle çöktürüldükten

sonra hücre pelletlerinden öze ucu ile alınan az miktarda hücre 37,5 µL nükleazsız su içeren bir PCR tüpüne aktararak süspansiyon haline getirildi. Bu hücre süspansiyonları koloni PCR için kalıp olarak kullanıldı. Diğer PCR bileşenleri Tablo 3.12’de verilen miktarlarda steril PCR tüpüne sırasıyla kit içeriğinden tabloda belirtilen miktarlarda alınarak eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Reaksiyon bileşenlerini içeren PCR tüpü, PCR cihazındaki (Blue- Ray, TurboCycler 2) kuyucuklardan birine yerleştirilerek cihazın çalışma koşulları Tablo 3.13’te verilen şekilde ayarlandı ve reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.12: Kalıp DNA üzerine eklenen koloni PCR bileşenleri.

Bileşen	Miktar (µl)
Buffer (10X)	5
dNTP-Mix	1
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
Forward Primer (10 µM)	2
Reverse Primer (10 µM)	2
Taq Polimeraz	1
Kalıp DNA’yı içeren Nükleazsız Su	37,5
Toplam	50

Tablo 3.13: Koloni PCR reaksiyon koşulları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	1 dk	30
Bağlanma	54	30 sn	
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	5 dk	1

3.9.2. Rekombinant DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

E. coli DH5 α hücrelerinden izole edilen ve koloni PCR ile analiz edilen pET26b-PETaz rekombinant DNA'ları kontrol amacıyla *HindIII* ve *NdeI* enzimleri ile 37°C'de 1 saat boyunca çiftli kesime bırakıldı. Daha önce 3.7.1.'de anlatıldığı şekilde restriksiyon enzimleri ile kesilen pET26b-PETaz plazmitine ait DNA fragmentleri 3.6.1.2'de anlatıldığı şekilde agaroz jel elektroforeziyle analiz edildi. Kontrol olarak restriksiyon enzimleri ile kesilmemiş DNA da agaroz jele yüklendi. 50 μ L hacimdeki örneklerin her biri 10 μ L 6X loading dye (yükleme boyası) ile boyandı.

Koloni PCR'da ve agaroz jelde pozitif sonuçlar veren rekombinant DNA'lar son olarak NGS (Next Generation Sequencing) DNA dizileme tekniği ile doğrulandı (Sentegen, Ankara). Dizileme işleminin yapılabilmesi için 3.8'de anlatıldığı üzere çoğaltılan ve saflaştırılan rekombinant DNA örnekleri, en az konsantrasyon 80 ng/ μ L ve son hacim 10 μ L olacak şekilde nükleazsız su ile steril PCR tüplerinde hazırlandı. PCR tüpleri içerisinde iletilen örneklerin dizileme işlemi hizmet sağlayıcı firma bünyesinde bulunan ve Tablo 3.11'de dizi bilgisi verilen T7 primer stoğu kullanılarak, firma tarafından Torrent Personal Genome Machine (PGM) cihazı ile gerçekleştirildi.

3.10. PETAZ GENİNİN EKSPRESYONU

Agaroz jel, koloni PCR ve NGS ile dizi doğrulaması yapılan rekombinant pET26b-PETaz plazmiti ekspresyon için *E. coli* SHuffle hücrelerine 3.4.3.'te anlatıldığı şekilde transforme edildi. Transformasyon sonrası 50 μ g/mL kanamisin içeren LBA seçici besiyerinin bulunduğu Petri kaplarına ekilen hücreler 30°C sıcaklıktaki inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen transformant hücrelerden seçilen kolonilerin her biri 15 mL'lik deney tüplerinde bulunan 10 mL LBB+50 μ g/mL kanamisin besiyerine ekildi. Her bir hücre kültürü 30°C ve 150 rpm'de OD 0.6 olana kadar çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Hücre kültürünün OD değerini ölçmek için kültürden alınan 100 μ L örnek üzerine 900 μ L distile H₂O eklenerek 10 kat seyreltildi. Aynı seyreltme işlemi steril LBB besiyerine de uygulandıktan sonra 2 μ L seyreltilmiş steril LBB besiyeri "OD 600" ölçüm moduna ayarlanan UV-Vis spektrofotometre cihazının örnek bölmesine yüklenerek "BLANK" düğmesine basıldı. Daha sonra yükleme bölmesi distile H₂O ile temizlenen cihaza 2 μ L seyreltilmiş hücre kültürü yüklenerek "SAMPLE" düğmesine basıldı ve işlem 2 kez tekrarlanarak hücre kültürünün OD

değeri ölçüldü. Gen anlatımının indüklenmesi sırasında kullanmak amacıyla 100 mM IPTG stok solüsyonu hazırlamak için, üretici firmadan toz formda temin edilen 0.238 g IPTG (GoldBio, 367-93-1) üzerine 10 mL steril distile H₂O eklendi ve homojen hale gelene kadar vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra 0.22 µm filtre ile steril edildi. İnkübasyon sonrası OD 0.6 değerine ulaşan hücre kültürleri gen anlatımının indüksiyonu için çalkalamalı inkübatörden alınarak üzerlerine 100 mM konsantrasyondaki IPTG stok solüsyonundan 40'ar µL eklendi. İndükleyici eklenen kültürler 30°C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama hızına ayarlanan çalkalamalı inkübatörde 4 saat boyunca inkübe edildi.

3.11. PETAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU

PETaz enziminin izolasyonu için 2 farklı yol izlendi. Bunlardan ilki, saf protein elde etmek için uygulanan manyetik afinite saflaştırması, ikincisi ise hücre lizatından protein izolasyonudur.

Bir önceki aşamada IPTG ile gen anlatımının indüklendiği hücre kültürlerinden saf enzim elde etmek için manyetik afinite saflaştırması “MagneHis™ Protein Purification System” (Promega, V8500) protein izolasyon kiti (kit içeriğindeki tamponlar ve kullanım amaçları Tablo 3.14’te verildi.) ve “GeneOn Magnetic Tube Separation Rack” manyetik ayırma standı kullanılarak yapıldı. İndüklenmiş hücre kültüründen 1 mL alınarak 10.000 rpm’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Hücre pelleti, izolasyon verimini artırmak amacıyla -20°C’de 15 dakika bekletildi. Her 1 O.D₆₀₀ için 10 µL “FastBreak™ Cell Lysis Reagent” (10X) 90 µl nükleazsız su içerisinde seyreltilerek 1X konsantrasyonda lizis tamponu elde edildi. 1 mL’lik hücre pelleti üzerine, hücrelerin parçalanması amacıyla 100 µL 1X lizis tamponu eklenerek vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Lizize uğratılan hücreler üzerine DNA kontaminasyonunu engellemek için 1 µL DNaz I enzimi eklendi ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi.

Kit içerisinde bulunan ve Histidin etiketlerine bağlanarak saflaştırma yapmayı sağlayan manyetik parçacıkların bağlanma etkinliğini artırmak için hücre lizatına 500 mM NaCl (Her 1 mL hücre lizatı için 0.03 g) eklendi. Kit içerisinde sağlanan “MagneHis™ Ni-Particles” manyetik parçacıkları vorteksle karıştırılarak homojen hale getirildi. Homojen solüsyondan 30 µL alınarak hücre süspansiyonu üzerine eklendi. Tüp 10 kez ters yüz edilerek iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. Daha sonra “GeneOn Magnetic Tube Separation Rack” adındaki manyetik ayırma standına yerleştirilerek manyetik parçacıklara

bağlanan Histidin etiketli proteinlerin 30 saniye boyunca tüp duvarına çekilmesi beklendi. Tüpler ayırma standından kaldırılmadan süpernatant atıldı ve tüp manyetik standdan çıkarıldı. Daha sonra protein bağlı parçacıkların istenmeyen diğer bileşenlerden ayrılması için üzerine 150 µL “MagneHis™ Binding/Wash Buffer” yıkama tamponu eklenerek pipetaj ve yıkama işlemi yapıldı. Protein bağlı manyetik Nikel parçacıkları ile yıkama solüsyonu tamamen karıştıktan sonra tüp tekrar manyetik standda yerleştirildi. 30 saniye boyunca Nikel parçacıkların tüp duvarına çekilmesi beklendi. Süpernatant atıldı ve bu yıkama adımı 2 kez daha tekrarlanarak toplamda 3 kez yapıldı. Son yıkamadan sonra süpernatant atılıp tüp manyetik standdan ayrıldı ve 100 µL “MagneHis™ Elution Buffer” elüsyon tamponu pipetaj yapılarak iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra tüp tekrar manyetik standda yerleştirildi. Elüsyon ile proteinler manyetik parçacıklardan ayrılarak süpernatantta kalırken, manyetik parçacıkların ise tüp duvarında kalması sağlandı. Manyetik Nikel parçacıklarının tüp duvarına çekilmesi için 30 saniye beklendikten sonra saflaştırılmış proteini içeren süpernatant alınarak 1.5 mL’lik steril tüpe aktarıldı. Bu yöntem kültürlerden saf protein elde etmek amacıyla uygulandı.

Tablo 3.14: “MagneHis™ Protein Purification System” protein izolasyon kitinin içerisinde bulunan tamponlar ve çalışmada kullanım amaçları.

Tampon	Kullanım Amacı
FastBreak™ Cell Lysis Reagent	İndüksiyon sonrası çöktürülerek süpernatanttan ayrılan hücrelerin parçalanarak hücre içeriğinin ortama salınması
MagneHis™ Ni-Particles	Parçalanmış hücrelere ait lizatta bulunan Histidin etiketli proteinlerin Nikel parçacıklarına bağlanarak saflaştırılması
MagneHis™ Binding/Wash Buffer	Nikel parçacıklarına bağlanan Histidin etiketli proteinlerin, parçalanmış hücrelere ait homojenatta bulunan diğer moleküllerden yıkanarak ayrılması
MagneHis™ Elution Buffer	Nikel parçacıklarına bağlanarak manyetik bölgeye çekilen proteinlerin, Nikel parçacıklarından ayrılarak saf şekilde elde edilmesi

Hücre lizatından protein izolasyonu için ise seçilen koloniden IPTG ile indüklenmiş 10 mL’lik hücre kültürü 10.000 rpm’de 25 dakika boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı, hücre pelleti üzerine 1 mL “FastBreak™ Cell Lysis Reagent” liziz solüsyonu eklenerek yeniden süspansiyon haline getirildi. Elde edilen hücre süspansiyonu buza yerleştirildikten sonra, %10 çıkış gücünde 20 sn açık 10 sn kapalı olacak şekilde toplam 7

dakika boyunca ultrasonikatörde (Bandelin, Sonopuls SH70G) parçalandı. Ardından elde edilen hücre lizatı 10.000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek homojenat steril bir tüpe aktarıldı ve protein kaynağı olarak kullanıldı.

3.12. ENZİM KONSANTRASYONUNUN TAYİNİ

E. coli SHuffle bakterilerinden izole edilen enzimlerin miktar ve konsantrasyon analizleri spektrofotometrik ölçüm ve Bradford yöntemi ile yapıldı. İzolasyon sonrası elde edilen örnekler doğrudan spektrofotometrede ölçüldükten sonra Warburg – Christian yöntemi ile konsantrasyon hesaplamaları yapıldı. Daha sonra saf protein örnekleri Bradford Yöntemi ile analiz edildi.

3.12.1. Absorbans Analizi

E. coli SHuffle hücrelerinden izole edilen PETaz enziminin 280 nm’deki absorbansının spektrofotometrik ölçümü “Allsheng Nano-400” ve “NanoDrop™ 2000C” cihazları ile yapıldı. Öncelikle PETaz enziminin içerisinde bulunduğu MagneHis™ Elution Buffer solüsyonundan alınan 1.5 µL’lik örnek “blank” olarak cihaza tanımlandı. Daha sonra PETaz enzimi içeren solüsyonların her birinden 1.5 µL örnek alınarak saflık ve konsantrasyon ölçümü yapıldı. Her bir örnek için ölçüm işlemi iki kez tekrarlandı.

Protein örneklerinin konsantrasyonunu doğru şekilde hesaplayabilmek için, bu örneklerin spektrofotometrik ölçümlerinden elde edilen sonuçlar Warburg - Christian yöntemi ve Schleif – Wensink formülüne uygulandı.

Warburg – Christian yönteminde, ölçümü yapılan proteinin A_{280}/A_{260} oranına göre ilgili tablodaki (Tablo 3.15) düzeltme faktörü bulunduktan sonra:

$$\text{Protein derişimi (mg/mL)} = \text{Faktör} \times A_{280}$$

formülüne göre her bir örneğin protein derişimi hesaplandı. Protein izolasyonu sonucunda izole edilen 4 ayrı örnek: PS1, PS2, PS3 ve PP1 olarak adlandırıldı. Bu örneklerin spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapılarak A_{280}/A_{260} oranı her bir örnek için ayrı ayrı hesaplandı. Hesaplanan oranlar tabloda bulunarak her örneğe ait düzeltme faktörü belirlendi. Belirlenen faktör formülde yerine konularak protein derişimi hesaplandı.

Tablo 3.15: A_{280}/A_{260} oranına bağlı olarak, örnekteki nükleik asit oranı (%) ve düzeltme faktörlerinin yaklaşık değeri (1 cm ışık yolu için).

A_{280}/A_{260} Oranı	Nükleik Asit (%)	Faktör
1.75	0.00	1.116
1.63	0.25	1.081
1.52	0.50	1.054
1.40	0.75	1.023
1.36	1.00	0.994
1.30	1.25	0.970
1.25	1.50	0.944
1.16	2.00	0.899
1.09	2.50	0.852
1.03	3.00	0.814
0.979	3.50	0.776
0.939	4.00	0.743
0.874	5.00	0.682
0.846	5.50	0.656
0.822	6.00	0.632
0.804	6.50	0.607
0.784	7.00	0.585
0.767	7.50	0.565
*0.753	8.00	0.545
0.730	9.00	0.508
*0.705	10.00	0.478
0.671	12.00	0.422
*0.644	14.00	0.377
0.615	17.00	0.322
0.595	20.00	0.278

Schleif - Wensink formülü:

$$\text{Protein derişimi (mg/mL)} = 1.5 \times A_{280} - 0.75 \times A_{260}$$

3.12.2. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

E. coli SHuffle hücrelerinden izole edilen saf PETaz enzimi örneklerinin miktar tayini için Bradford yöntemi ile analiz yapıldı. 3.12.1’de spektrofotometrik ölçüm sonuçları verilen homojenat örneği analiz için uygun olmayan yüksek tuzluluk oranı ve kontaminant molekül içeriği sebebiyle Bradford analizine dahil edilmedi. Bradford analizi için örnek hazırlanması sırasında “Bio-Rad Protein Assay Kit II” kolorimetrik protein ölçüm kiti (Bio-Rad, 5000002), standart olarak BSA (Bovine Serum Albumin) kullanıldı. Liyofilize BSA üzerine 20 mL deiyonize su eklenerek 1 mg/mL konsantrasyonundaki BSA stok solüsyonu elde edildi. Son

hacim 100 μL olacak şekilde seyreltilerek 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, ve 0.5 mg/mL konsantrasyonda 5 adet BSA standardı hazırlandı. Kit içerisinde bulunan “Dye Reagent Concentrate” boya belirteci solüsyonunu spektrofotometrik ölçüme hazırlamak için 400 μL boya belirteci 1.6 mL distile H_2O ile sulandırıldı. Saflaştırılmış proteini içeren ve son hacmi 100 μL olan saflaştırılmış protein solüsyonlarının her birine 900 μL deiyonize distile H_2O eklenerek karıştırıldı ve bu örnekler analizlerde kullanıldı. BSA standart solüsyonları ve örnek solüsyonlarının her birinden 10’ar μL pipetaj yapılarak 96 kuyucuklu mikropate üzerinde yer alan kuyucuklara ayrı ayrı yüklendi. Daha sonra her bir kuyucuk üzerine 200’er μL sulandırılmış boya belirteci eklendi ve tüm solüsyonlar homojen hale gelene kadar pipetaj yapıldı. Her örnek 2’şer tekrarlı olarak kuyucuklara yüklendi. Mikropate 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Mikropate “Thermo Scientific Multiscan GO Microplate Spectrophotometer” cihazına yerleştirilerek örneklerin 595 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Ölçüm sonrası elde edilen veriler ile BSA standart grafiği grafiği oluşturuldu. Örneklerin protein konsantrasyonu BSA standart alınarak hesaplandı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada *Ideonella sakaiensis* bakterisinin ürettiği PETaz enzim geninin, biyoinformatik olarak yeniden tasarlanmasıyla *Escherichia coli*'de PETaz enziminin rekombinant olarak üretilmesi amaçlandı. Bu amaçla PETaz enzimine ait gen dizisi, üzerinde kodon optimizasyonu işlemleri ve biyoinformatik tasarım çalışmaları gerçekleştirildikten sonra, pTZ57R/T klonlama vektörü içerisinde sentetik olarak temin edildi. Optimize PETaz geni pTZ57R/T plazmitinden *HindIII* ve *NdeI* restriksiyon endonükleazları ile kesilip çıkarıldıktan sonra aynı enzimlerle kesilen pET26b ekspresyon vektörüne klonlandı. Elde edilen rekombinant pET26b-PETaz plazmiti *E. coli* SHuffle bakterisine transformasyonla aktarıldı ve rekombinant hücreler IPTG ile indüklenerek gen anlatımı sağlandı. Daha sonra indüklenmiş hücrelerden saflaştırılan PETaz enzimi spektrofotometrik yöntemler ile analiz edildi.

4.1. BİYOİNFORMATİK YOLLA TASARLANMIŞ SENTETİK PETAZ GENİNİN ÖZELLİKLERİ

Ideonella sakaiensis bakterisine ait 870 bp uzunluğundaki PETaz geninin *E. coli*'ye göre kodon optimizasyonu yapıldı. Optimizasyon işlemi sonrasında GC içeriği %68.73'ten %56.78'e düşürüldü. Böylece GC içeriğinin optimum aralık olduğu kabul edilen %40-60 aralığında kalması sağlandı. Optimizasyon sonrası CAI (kodon adaptasyon endeksi) ise 0.64'ten 0.80'e çıkarıldı. Her bir kodonun konak organizmada kullanım eğiliminin bir ölçüsü olan CAI'nin artırılması; hedef genin ekspresyon başarısını artırmaktadır. PETaz geninin kodon optimizasyonuna ait analiz sonuçları Şekil 4.1'de verilmiştir.

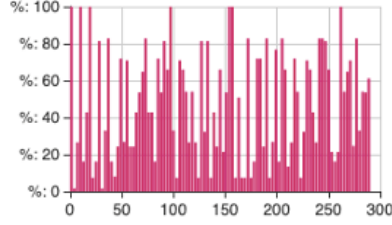
CAI before optimization: 0.64 (Optimizasyon Öncesi CAI)
 CAI after optimization: 0.80 (Optimizasyon Sonrası CAI)
 GC content before optimization: 68.73% (Optimizasyon Öncesi GC İçeriği)
 GC content after optimization: 56.78% (Optimizasyon Sonrası GC İçeriği)

Copy the optimized sequence

Synthesis this gene

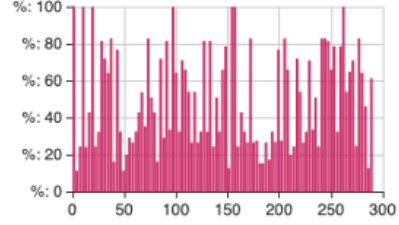
Relative Adaptiveness (input)

Girilen Dizinin Uyum Yüzdesi



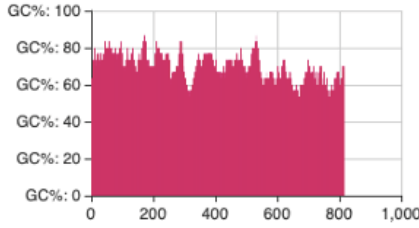
Relative Adaptiveness (optimized)

Optimize Dizinin Uyum Yüzdesi



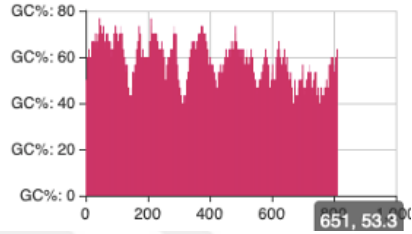
GC content (before optimization)

Optimizasyon Öncesi GC İçeriği



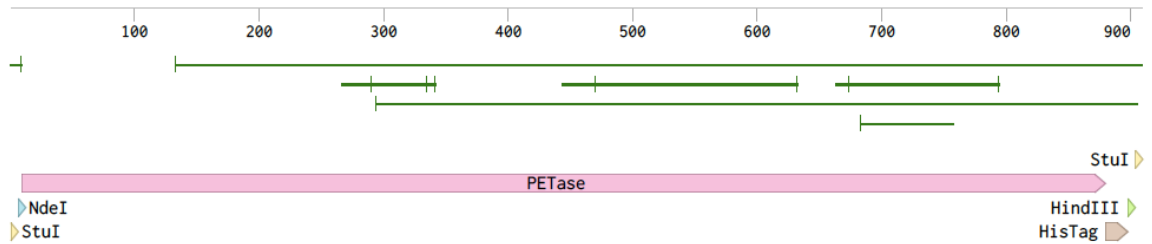
GC content (after optimization)

Optimizasyon Sonrası GC İçeriği



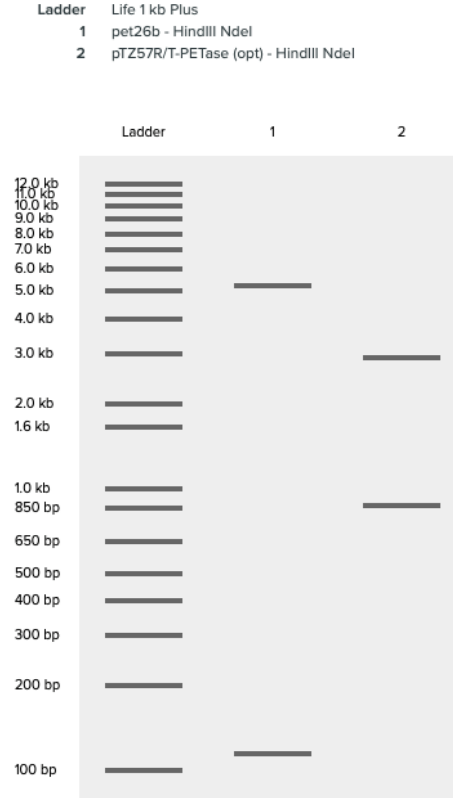
Şekil 4.1: PETaz dizisi kodon optimizasyonu sonuçları.

Optimize edilen gen dizisinin 5' ucuna *HindIII* (5'...AAGCTT...3') ve 3' ucuna *NdeI* (5'...CATATG...3') enzimlerinin kesim bölgeleri eklendi. Aynı zamanda her iki uca *StuI* (5'...AGGCCT...3') enzimi kesim bölgeleri dahil edildi. Genin bitimini takiben 5' ucuna 6'lı Histidin etiketine ait nükleotit dizisi eklendi. Yapılan bu biyoinformatik tasarım ve optimizasyonlar sonrası 909 bç uzunluğunda yeni PETaz dizisi elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Biyoinformatik olarak yeniden tasarlanmış optimize PETaz geni (909 bç).

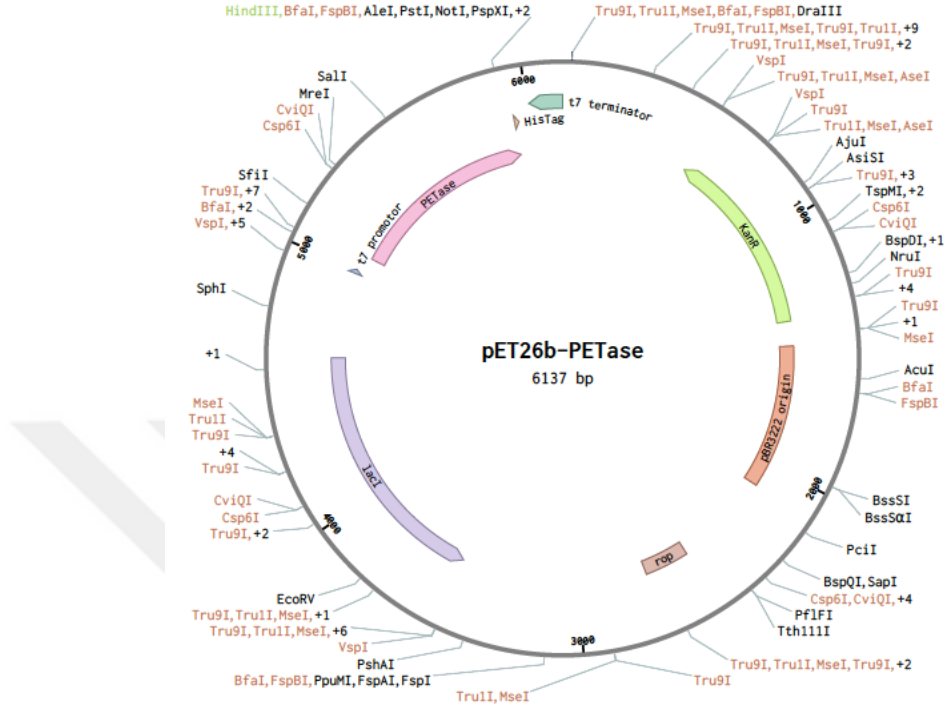
Optimize edilen PETaz genine ait dizinin, pTZ57R/T plazmidi içine klonlanabilmesi için; PTZ57R/T-PETaz ve pET26b plazmitleri Benchling programına girildikten sonra *HindIII* ve *NdeI* restriksiyon enzimleri ile kesim reaksiyonunun simülasyonu gerçekleştirildi. Kesim sonrası agaroz jele yüklenen DNA fragmentlerinin oluşturacağı bantlara ait görüntüler bilgisayar ortamında elde edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: PETaz geni ve pET26b plazmitinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonrasında agaroz jelde oluşması beklenen bantlar. 1) pET26b plazmit omurgası (5245 bç) ve MCS'a ait bölge (115 bç) 2) pTZ57R/T plazmit omurgası (2906 bç) ve PETaz geni (890 bç).

Daha sonra, restriksiyon enzimleri ile kesilip agaroz jelden izole edilecek DNA fragmentlerinin ligasyon işlemi için uygunluğu kontrol edildi ve oluşacak rekombinant DNA'nın görselleştirilmesi yapıldı. Elde edilecek pET26b-PETaz rekombinant DNA'sının boyutu 6137 bç olarak tespit edildi (Şekil 4.4)

pET26b-PETase (6137 bp)



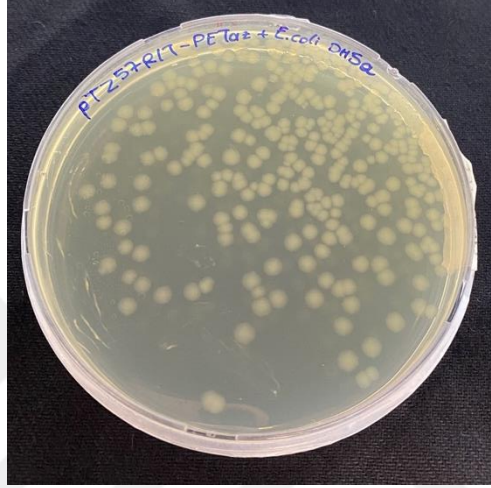
Şekil 4.4: Biyoinformatik olarak tasarlanmış pET26b-PETaz rekombinant plazmiti.

4.2. pTZ57R/T-PETaz KLONLAMA, pET26b EKSPRESYON VE pET26b-PETaz REKOMBİNANT PLAZMİTLERİ İÇİN TRANSFORMASYONUN DOĞRULANMASI

Bu çalışmada klonlama ve gen anlatımı amacıyla *E. coli* DH5α'ya pTZ57R/T-PETaz, pET26b ve pET26b-PETaz plazmitleri; *E. coli* SHuffle bakterisine ise pET26b-PETaz rekombinant plazmiti transformasyon yoluyla başarıyla aktarıldı. Transformasyon işlemi sonrasında transformant bakterilerin, ve transformant bakteriler arasında da doğru plazmit DNA'yı taşıyan bakterilerin seçimi için seçici besiyerinde ve agaroz jelde kontroller yapıldı. Her bir transformasyon sonrasında transformasyon etkinliği 3.5.4'te verilen formüller kullanılarak hesaplandı.

4.2.1. Transformantların Seçici Besiyerinde Kontrolü

E. coli DH5 α bakterisine plazmit çoğaltma amacıyla pTZ57R/T-PETaz plazmiti transformasyon ile aktarıldı. Bakterilerin ampisilinli LBA besiyerinde üremesi sonucu oluşan 225 adet transformant koloni (Şekil 4.5) plazmitin başarıyla transforme edildiğini gösterdi.



Şekil 4.5: pTZ57R/T-PETaz plazmitinin *E. coli* DH5 α bakterisine transformasyonu sonrası 100 μ g/mL ampisilinli LBA besiyerinde gözlenen koloniler.

pTZ57R/T-PETaz plazmitinin *E. coli* DH5 α bakterisine transformasyon ile aktarımı sonucunda transformasyon etkinliği $4,5 \times 10^2$ olarak hesaplandı.

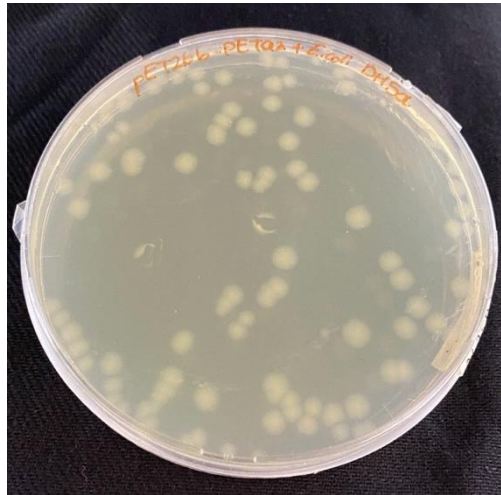
E. coli DH5 α bakterisine çoğaltma amacıyla pET26b plazmiti transformasyonla aktarıldı. Bakterilerin kanamisinli LBA besiyerinde üremesi sonucu oluşan 154 adet transformant koloni plazmitin başarıyla transforme edildiğini gösterdi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: pET26b plazmitinin *E. coli* DH5α bakterisine transformasyonu sonrası 50 µg/mL kanamisinli LBA besiyerinde gözlenen koloniler.

pET26b plazmitinin *E. coli* DH5α bakterisine transformasyon ile aktarımı sonucunda transformasyon etkinliği $3,08 \times 10^2$ olarak hesaplandı.

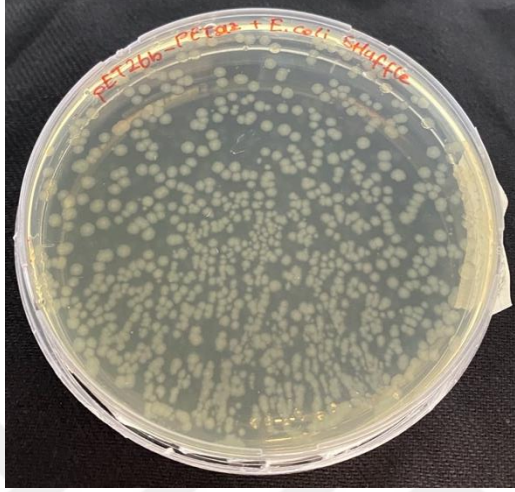
pET26b ve PETaz DNA fragmentlerinin ligasyonundan hemen sonra pET26b-PETaz plazmitini içermesi beklenen ligasyon karışımı *E. coli* DH5α bakterisine çoğaltım amacıyla transformasyonla aktarıldı. Bakterilerin kanamisinli LBA besiyerinde üremesi sonucu oluşan 81 adet transformant koloni plazmitin başarıyla transforme edildiğini gösterdi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7: pET26b-PETaz ligasyon reaksiyonunun *E. coli* DH5α'ya transformasyonu sonucu 50 µg/mL kanamisinli LBA besiyerinde gözlenen koloniler.

pET26b-PETaz rekombinant plazmitinin *E. coli* DH5α bakterisine transformasyon ile aktarımı sonucunda transformasyon etkinliği $1,62 \times 10^2$ olarak hesaplandı.

pET26b-PETaz rekombinant plazmiti, PETaz enzimi üretimi için *E. coli* SHuffle bakterisine transformasyonla aktarıldıktan sonra bakterilerin kanamisinli LBA besiyerinde üremesi sonucu oluşan 623 adet transformant koloni rekombinant plazmitin başarıyla aktarıldığını gösterdi (Şekil 4.8).

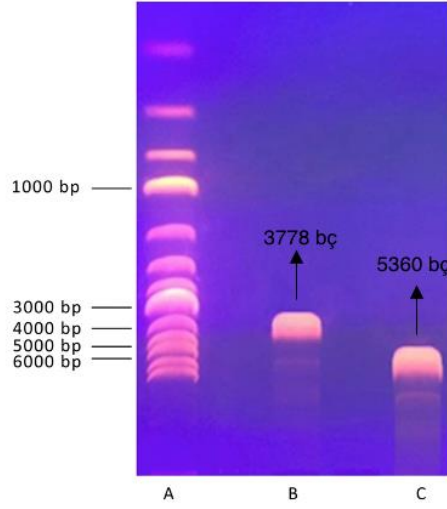


Şekil 4.8: Rekombinant pTZ57R/T plazmitinin transforme edildiği *E. coli* SHuffle bakterilerinin 50 µg/mL kanamisinli LBA besiyerinde oluşturduğu koloniler.

pET26b-PETaz rekombinant plazmitinin *E. coli* SHuffle bakterisine transformasyon ile aktarımı sonucunda transformasyon etkinliği $1,24 \times 10^3$ olarak hesaplandı.

4.2.2. Agaroz Jelde Kontrol

Klonlama amacıyla *E. coli* DH5α bakterisine transformasyonla aktarılarak çoğaltılan pTZ57R/T-PETaz ve pET26b plazmitleri izole edildikten sonra miktar ve saflık kontrolü için agaroz jele yüklendi. Agaroz jelde yürütüldükten sonra, 3778 bç uzunluğundaki pTZ57R/T-PETaz plazmitinin ve 5360 bç uzunluğundaki pET26b plazmitinin agaroz jelde doğru yerde ve net bantlar verdiği gözlemlendi (Şekil 4.9). Örneklerde herhangi bir kontaminasyon olmadığı sonucuna varıldı.



Şekil 4.9: *E. coli* DH5 α bakterisine transforme edilip çoğaltıldıktan sonra izole edilen plazmitlerin agaroz jelde kontrolü. A) DNA Ladder. B) pTZ57R/T-PETaz plazmiti. C) pET26b plazmiti.

4.3. REKOMBİNANT DNA'NIN OLUŞTURULMASINDA KULLANILAN PLAZMİT DNA'LARININ ANALİZİ

Bu çalışmada kullanılan tüm plazmit DNA'lar çoğaltma ve stok amacıyla *E. coli* DH5 α bakterisine transforme edilerek klonlanmıştır. Daha sonra izole edilen bu plazmitlerin miktar ve saflığı hem spektrofotometrik ölçüm ile hem de agaroz jele yüklenerek kontrol ve analiz edilmiştir.

4.3.1. Kalitatif Analiz

Bu çalışmada kullanılan tüm plazmitlerin kalitatif analizi agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın farklı aşamalarında *E. coli* DH5 α 'dan izole edilen pTZ57R/T-PETaz, pET26b ve pET26b-PETaz plazmitleri agaroz jele yüklenerek kontrol edildi. Böylece spektrofotometrik ölçümdeki hata payı en aza indirgenerek kontrol sağlandı. pTZ57R/T-PETaz ve pET26b plazmitlerinin izolasyonu sonrası agaroz jelde oluşan bantlar daha önce Şekil 4.9'da verildiği gibidir. pET26b-PETaz plazmitinin kontrolü için yapılan agaroz jel elektroforez sonuçları ise Bölüm 4.5.2'de detaylı olarak açıklanacaktır.

4.3.2. Kantitatif Analiz

İzolasyon sonrası plazmitlerin kantitatif analizi için spektrofotometrik ölçüm yöntemi kullanıldı. İzole edilen plazmit DNA'ların 260 ve 280 nm'deki absorbans ölçümleri alınarak

miktar ve saflık tayini yapıldı. *E. coli* DH5 α bakterisine transformasyonla klonlanan plazmitlerin izolasyonu sonrası spektrofotometrede ölçümleri gerçekleştirildi. Her bir örnek için ölçüm işlemi iki kez tekrarlandı. Bu ölçümler sonucunda pTZ57R/T-PETaz plazmitinin konsantrasyonu 153.22 ng/ μ l, A_{260}/A_{280} oranı 1.94 olarak ölçüldü. pET26b plazmitinin konsantrasyonu 110.302 ng/ μ l, $A_{260}/280$ oranı 1.84 olarak ölçüldü. pET26b-PETaz rekombinant plazmitinin ise konsantrasyonu 222.399 ng/ μ l, A_{260}/A_{280} oranı 1.94 olarak ölçüldü (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: *E. coli* DH5 α bakterisinden izole edilen pTZ57R/T-PETaz, pET26b ve pET26b-PETaz plazmitlerine ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}
pTZ57R/T-PETaz	153.22	1.94
pET26b	110.302	1.84
pET26b – PETaz	222.399	1.94

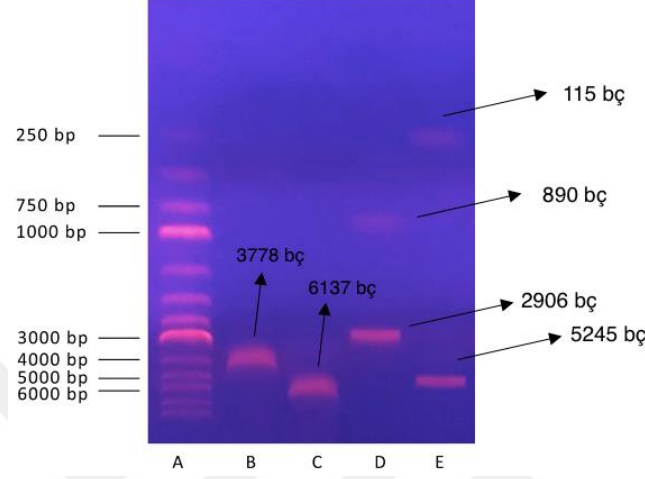
4.4. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ İLE KESİLEN PLAZMİT VE KLONLANACAK DNA FRAGMENTLERİNİN KONTROLÜ

PETaz geni ile pET26b plazmitinin ligasyonu öncesinde ve sonrasında, DNA fragmentlerinin agaroz jelde görüntülenmesi yoluyla kontroller gerçekleştirildi. Ligasyon öncesi yapılan restriksiyon enzimi ile kesim işlemi sonrası iki adet agaroz jel elektroforez deneyi yapıldı. Bunlardan ilki, az miktarda kesim reaksiyonunun kuyucuklara yüklenerek kontrol işleminin yapıldığı, ikincisi ise bol miktarda kesim reaksiyonunun yüklenerek DNA fragmentlerinin ayrıldığı ve jelden DNA ekstraksiyonunun yapıldığı ayırma jelidir. Jelden DNA ekstraksiyonu sırasında çok miktarda DNA örneği jelde kaybolma ya da kırılma riski taşıdığından, jelden izolasyon sonrası elde edilen DNA örnekleri de yeni bir agaroz jele yüklenerek analiz edildi.

4.4.1. Restriksiyon Enzimleri ile Kesilen PETaz ve pET26b DNA Fragmentlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

pTZ57R/T-PETaz plazmitinin *HindIII* ve *NdeI* enzimleri ile başarıyla kesime uğratılması sonucu %0.6'lık agaroz jelde PETaz genine ve pTZ57R/T plazmit omurgasına ait 890 bp ve 2906 bp boyutunda iki adet DNA fragmenti elde edildi. pET26b plazmitinin *HindIII* ve *NdeI*

enzimleri ile kesime uğratılması sonucu ise %0.6'lık agaroz jelde 5245 bç boyutundaki plazmit omurgasına ait DNA fragmenti ile, MCS'a ait 115 bç'lik DNA fragmenti elde edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA fragmentlerinin agaroz jelde kontrolü. **A)** DNA Ladder **B)** pTZ57R/T-PETaz plazmiti. **C)** pET26b plazmiti. **D)** *HindIII* ve *NdeI* enzimleri ile kesilmiş pTZ57R/T-PETaz plazmitine ait DNA fragmentleri. **E)** *HindIII* ve *NdeI* enzimleri ile kesilmiş pET26b plazmitine ait DNA fragmentleri.

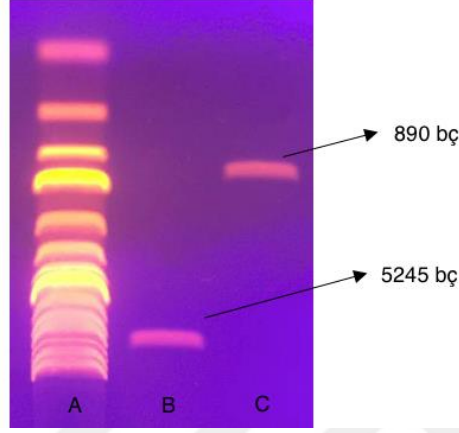
4.4.2. Agaroz Jelden Geri Kazanılan DNA Fragmentlerinin Kalitatif ve Kantitatif Analizi

PETaz genine ait 890 bç'lik DNA fragmenti ile 5245 bç'lik pET26b plazmit omurgası rekombinant DNA'yı oluşturmak üzere agaroz jelden izole edildi. Agaroz jelden başarıyla saflaştırılan PETaz geni ve pET26b omurgasına ait DNA fragmentlerinin konsantrasyon ve saflık ölçümleri yapıldı (Tablo 4.2)

Tablo 4.2: Restriksiyon enzimleri ile kesim sonrası agaroz jelden izole edilen pET26b plazmit omurgasının ve PETaz geninin spektrofotometrik ölçümü. **dPET26b:** Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pET26b plazmiti. **dPETaz:** Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş PETaz enzimi.

Örnek	Konsantrasyon ng/(μ L)	A_{260}/A_{280}
dPET26b	56.6	1.32
dPETaz	69.6	1.28

Kesim sonu elde edilen DNA fragmentlerinin her birinden 5'er μL 'lik örnekler ayrıldı. Fragmentlerin kalitesini belirlemek ve böylece ligasyon verimini artırmak için, bu örnekler yeniden agaroz jele yüklendi. Restriksiyon enzimleri kesilerek agaroz jelden izole edilen DNA fragmentleri, tekrar agaroz jele yüklenerek her iki örneğin de temiz bir ışına verdiği saptandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jelden izole edilerek yeni bir agaroz jele yüklenerek kontrol edilen DNA fragmentleri. **A)** DNA Ladder. **B)** pET26b plazmit omurgası. **C)** PETaz geni.

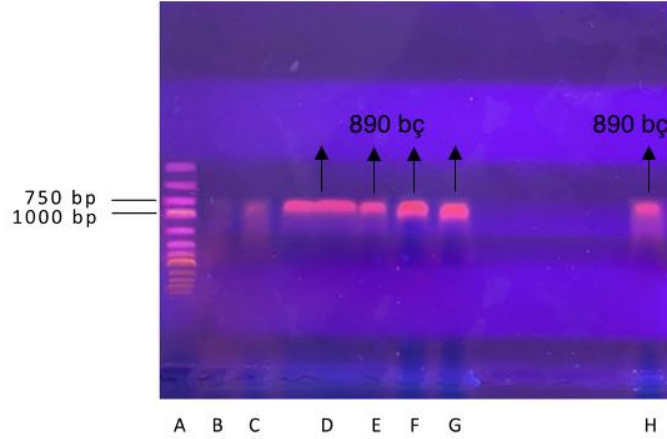
4.5. REKOMBİNASYONUN DOĞRULANMASI

Çalışmanın bu aşamasında; pET26b plazmitinin PETaz geni ile ligasyonu sonrasında seçici besiyerinde elde edilen pozitif transformantlardan doğru rekombinant plazmiti alanların seçilebilmesi için koloni PCR ve agaroz jelde görüntüleme işlemleri yapıldı.

4.5.1. Koloni PCR ile Rekombinant DNA Varlığının Saptanması

Agaroz jelden izole edilen PETaz geni ve pET26b plazmit omurgası ile ligasyon reaksiyonuna sokuldu. Reaksiyonun sonlanması ardından, ligasyon bileşimi ile transformasyonu yapılan *E. coli* DH5 α hücrelerin 50 $\mu\text{g/mL}$ kanamisinli LBA selektif besiyerinde 81 adet koloni oluşturduğu gözlemlendi. Bu kolonilerden 10 tane seçilerek koloni PCR ile analiz edildi. Koloni PCR sonrasında agaroz jele yüklenen örneklerden doğru bantları verenler belirlenerek sonraki çalışmalar için kullanıldı.

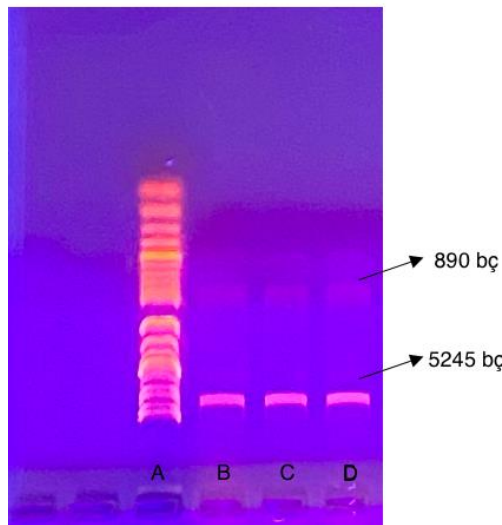
Koloni PCR sonrası agaroz jele yüklenen örneklerden elde edilen bant görüntüleri Şekil 4.12'de verildiği gibidir.



Şekil 4.12: Koloni PCR sonrası jelde gözlenen DNA fragmentleri. A) DNA Ladder. B) Negatif koloni. C) Negatif koloni. D, E, F, G ve H) Doğru ışıma veren bantlar.

4.5.2. Rekombinant DNA'nın Agaroz Jelde Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü

Koloni PCR sonrası agaroz jelde doğru ışımaları veren örnekler 15 mL'lik deney tüpünde 5 mL LBB+50 µg/mL kanamisin besiyerinde çoğaltıldıktan sonra bu kültürlerden plazmit izolasyonu yapıldı. İzole edilen plazmitler *HindIII* ve *NdeI* enzimleri ile kesime uğratılarak yeniden agaroz jele yüklendi. Klonlanan geni ve plazmit omurgasını içeren örnekler belirlendi. Bu örneklerden 3 tanesinde (Şekil 4.11; E, F ve G kolonları) 890 bç uzunluğundaki PETaz geni ve 5245 bç uzunluğundaki pET26b plazmit omurgası belirgin şekilde görüntülendi (Şekil 4.12). Bu örnekler P1, P2 ve P3 olarak adlandırıldı ve protein üretiminde kullanılmak üzere 4°C'de saklandı.



Şekil 4.13: Rekombinant plazmitin agaroz jelde kontrolü. A) DNA Ladder. B, C ve D) 3 farklı koloniden izole edilerek *HindIII* ve *NdeI* restriksiyon enzimleri ile kesilen pET26b-PETaz rekombinant plazmiti.

4.6. ENZİM ÜRETİMİNİN ANALİZİ

İzole edilen PETaz enziminin analizi için spektrofotometrik analizler yapıldı. Bunun için hem PETaz enziminin bulunduğu homojenat hem de Histidin etiketli PETaz enziminin bulunduğu saf protein solusyonlarının spektrofotometrede absorbansı ölçülerek enzim konsantrasyonları hesaplandı. P1, P2 ve P3 örneklerinden üretilen saf proteinler PS1 PS2 ve PS3 olarak; P1 örneğinden elde edilen homojenat ise PH1 olarak adlandırıldı. İzolasyon sonrası spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılan saf protein örneklerinin konsantrasyonları Warburg – Christian Yöntemi ve Schleif – Wensink formülü kullanılarak ayrı ayrı hesaplandı. Her iki hesaplama sonucunda da elde edilen konsantrasyon değerlerinin her bir saf protein örneği için birbirine oldukça yakın olduğu gözlemlendi. Daha sonra saflaştırılmış protein içeren örnekler Bradford Yöntemi ile analiz edilerek konsantrasyonları hesaplandı.

4.6.1. Spektrofotometrik Analiz Sonuçları

Spektrofotometrik ölçümler sonucu elde edilen absorbans değerleri Schleif ve Wensink tarafından geliştirilen formül ile de hesaplandı. İzolasyon sonrası elde edilen 4 farklı protein örneğinin spektrofotometrik ölçüm sonrası elde edilen konsantrasyon ve absorbans değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Bu değerler formülde yerine konularak protein konsantrasyonu hesaplandı.

Tablo 4.3: İzolasyon sonrası farklı PETaz enzimi gruplarına ait absorbans ölçümü.

Örnek	Konsantrasyon (mg/mL)	A ₂₈₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀ /A ₂₆₀
PS 1	2.865	1.92	2.543	0.755
PS 2	1.19	1.356	1.923	0.705
PS 3	1.317	1.317	2.003	0.657
PH 1	12.348	8.273	11.733	0.705

$$PS1 = 1.0464 \text{ mg/mL}$$

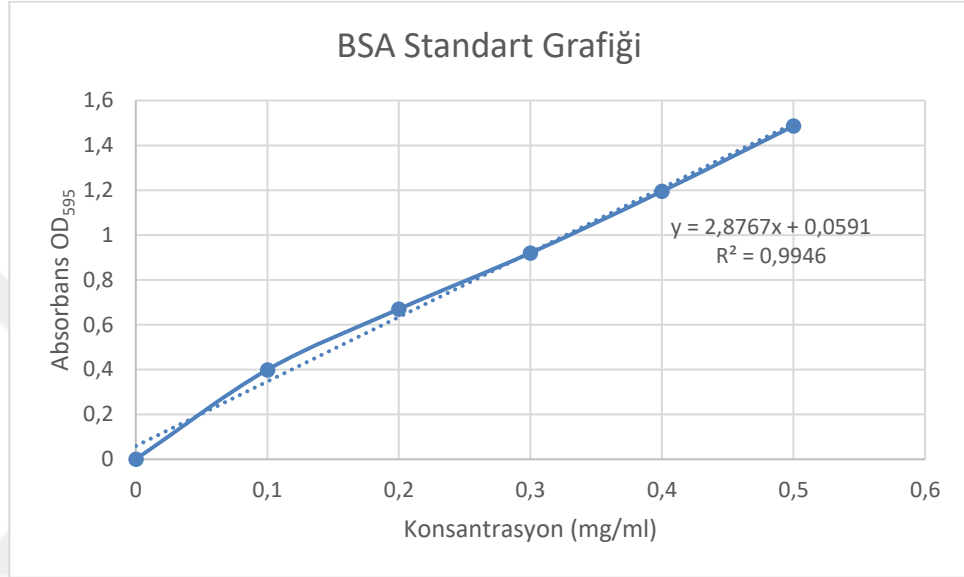
$$PS2 = 0.6481 \text{ mg/mL}$$

$$PS3 = 0.4965 \text{ mg/mL}$$

$$PH1 = 3.9544 \text{ mg/mL}$$

4.6.2. Bradford Analizi Sonuçları

E. coli SHuffle bakterisinden izole edilerek 260 ve 280 nm’de spektral analizi yapılan saf protein örnekleri Bradford Yöntemi ile analiz edildi. Standart olarak BSA kullanıldı. 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, ve 0.5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan BSA örneklerinin 595 nm’de verdiği absorbansa göre standart grafiği elde edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.14: BSA standart grafiği.

Standart grafiğinin elde edilmesinin ardından, saf enzim örneklerinin de 595 nm’de absorbansı ölçüldü. Ölçüm sonucu elde edilen absorbans değerleri, BSA standart grafiğinden elde edilen formülde (aşağıda verilmiştir) yerine koyularak, her bir örneğin konsantrasyonu hesaplandı (Tablo 4.4).

BSA standart grafiğinden;

$$y = 22,8767x + 0,059191$$

formülü elde edildi. Her bir örnekten elde edilen absorbans değeri formülde “y” yerine konularak, “x” değerine karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplandı.

Tablo 4.4: Enzim örneklerinin Bradford Analizi ile hesaplanan konsantrasyonları.

Örnek	Absorbans	Konsantrasyon (mg/mL)
PS 1	2.7513	0.935
PS 2	1.6704	0.560
PS 3	1.7583	0.590

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Biyoteknoloji; biyolojik kaynaklı ham maddelerin gıda, ilaç, aşı gibi insan yaşamı için stratejik öneme sahip ürünleri üretmek amacıyla mühendislik ve biyolojik tekniklerin bir arada kullanılmasını ifade eder. Bir başka deyişle insan sağlığını ve çevresini iyileştirmek veya değiştirmek amacıyla canlı organizmaların veya bu organizmalara ait ürünlerin kullanıldığı teknolojidir (Verma ve diğ., 2011). İnsanoğlunun var olduğu en eski tarihlerden bu yana biyoteknoloji, insan hayatı için kritik öneme sahip ürünlerin elde edilmesinde kullanılmıştır. Günümüzde ise biyoteknoloji ve beraberinde rekombinant DNA teknolojisi, insanın var olduğu hemen her alanda büyük önem arz eden; sağlık, tarım, gıda, çevre alanlarında yeni ürün üretimi, hali hazırda ürün ve sistemlerin geliştirilmesi amacıyla farklı türlere ait DNA'ların manipülasyon ve yeniden kombinasyonu ile konak organizmada bir araya getirilmesine dayanır (Taylor, 2019). Cohen ve diğ. (1973)'nin rekombinant DNA teknolojisini kullanarak biyoteknolojik ürün üretiminin tarihteki ilk örneğini, insan insülin hormonunu *E. coli* bakterisinde üreterek ortaya koymasından sonra rekombinant DNA teknolojisi ve uygulamaları oldukça hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Günümüzde ilaç ve aşı üretimiyle sağlık teknolojilerinin iyileştirilmesi, biyoyakıt eldesi, su ve topraktaki kirleticilerin temizlenmesi, besin değeri yüksek tarım ürünlerinin üretilmesi gibi bir çok hayati uygulama için rekombinant DNA teknolojisinden faydalanılmaktadır (Khan ve diğ., 2016).

Bugünün dünyasında kritik öneme sahip, insanın var olduğu her alanda kullanılan ürünlerin üretiminde kullanılan plastik maddeler içerisinde PET (polietilen tereftalat); dayanıklılığı, gıdaya uyumlu olması, şeffaf görünümüne sahip olması ve ulaşılabilirliği gibi sebeplerle en çok kullanılan plastik türlerinden biridir. PET'in fazla miktarda ve bilinçsizce kullanımından kaynaklanan sorunlar, atık toplama ve geri dönüşüm sürecindeki aksaklıklar, doğada kaybolması çok uzun yıllar süren PET'in ciddi miktarda çevre kirliliğine sebebiyetiyle sonuçlanmaktadır. Üretiminde ham madde olarak petrol rafinerileri yan ürünlerinin kullanıldığı PET'ler, sahip oldukları çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerin de katkısıyla önemli bir geri dönüşüm potansiyeline sahiptir (Sinha ve diğ., 2010; Bartolome, 2012; Malik ve diğ., 2016).

PET türü plastiğin geri dönüşümü için kullanılan fiziksel geri dönüşüm yöntemleri (birincil ve ikincil geri dönüşüm) sonrası ortaya çıkan plastik maddelerin kalitesi oldukça düşük olup; bu yöntemle geri dönüştürülmüş PET, en çok kullanıldığı sektör olan gıda sektöründe ve insanla

doğrudan temas eden diğer sektörlerde yeniden kullanılamaz. Dolayısıyla kullanım alanı oldukça daralır, fakat bu yöntem maliyet bakımından avantajlı olup, yeni ham madde ihtiyacını giderecek potansiyel taşımaz. PET türü plastiğin geri dönüşümü için kullanılan diğer bir yöntem olarak kimyasal (üçüncül) geri dönüşüm, fiziksel yöntemin aksine PET'in ham maddelerine kadar ayrışmasını sağlar. Fakat bu yöntem de ek teçhizat ve malzeme gereksinimi sebebiyle çok yüksek maliyetlere sahiptir. Diğer bir seçenek olan yakma (dördüncül geri dönüşüm) ise genellikle tehlikeli, toplanması zor, yüksek maliyetli, diğer atıklarla kontamine olmuş plastiklerden termal enerji eldesi için kullanılır. Dolayısıyla bu yöntemde de plastik ham madde ihtiyacını karşılayacak düzeyde bir geri dönüşüm beklenemez.

Fiziksel ve kimyasal geri dönüşüm yöntemlerine ek olarak özellikle son yıllarda plastik atıkların biyoteknolojik yöntemlerle de geri dönüştürülmesini sağlayacak süreçler üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Henüz çok fazla ticari örneği olmamakla birlikte Fransa menşeli Carbios firması PET türü plastiğin mikrobiyal kökenli enzimlerle endüstriyel düzeyde geri dönüştürülmesi alanında faaliyet göstermektedir (Carbios, 2021).

Yoshida ve diğ. (2016)'nin yapmış olduğu çalışmada ilk kez *Ideonella sakaiensis* organizmasının varlığı bildirilmiş ve PET'i salgıladığı iki enzimle (PETaz ve MHETaz) monomerik ham maddelerine parçaladığı keşfedilmiştir. Çalışmada, PET'i karbon kaynağı olarak kullanan gram negatif *Ideonella sakaiensis* bakterisinin önce PETaz enzimini salgılayarak PET'i oligomerik ham maddesi olan MHET'e; daha sonra da MHETaz enzimini salgılayarak MHET'i monomerik PET ham maddeleri olan Etilen glikol (EG) ve tereftalik asit (TPA)'e parçaladığı gösterilmiştir.

PETaz enziminin diğer plastik parçalayıcı enzimlere oranla oda koşullarında oldukça yüksek aktivite gösterdiği bilinmekte olup (Yoshida ve diğ., 2016); substrat özgüllüğü, başka herhangi bir enzim kullanımını gerektirmemesi ve bakteriyal kökenli olduğundan kolay üretilebilmesi sebebiyle endüstriyel düzeyde PET geri dönüşümü için önemli bir alternatif oluşturmaktadır.

Gram negatif bir toprak bakterisi olan *E. coli*, rekombinant DNA teknolojisi ile biyoteknolojik ürün üretiminde en çok kullanılan organizmalardan biridir. Genomu tanımlanmış bir model organizma olan *E. coli*; kolay ve hızlı üremesi, düşük maliyetli üretim koşulları, manipülasyonu ve takibinin kolay olması gibi sebeplerle rekombinant DNA teknolojisi uygulamaları için son derece uygundur.

Bu tez çalışması kapsamında, doğal koşullarda *Ideonella sakaiensis* bakterisi tarafından üretilen ve PET polimerini hidrolize ederek MHET oligomerine indirgeyen PETaz enziminin *E. coli* organizmasının sitoplazmasında üretilmesinin; henüz literatürde çok yeni olan bu enzimin geliştirilmesi ve plastik geri dönüşüm sektöründe kullanılabilecek hale getirilmesi amacıyla bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutması hedeflenmiştir. Bu amaçla PETaz geni, biyoinformatik olarak optimize edilip yeniden tasarlanmış, pTZ57R/T klonlama vektörü içerisinde sentetik olarak elde edilmiştir. Elde edilen optimize PETaz geni Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak pET29b ekspresyon plazmitine klonlanmıştır. Bu işlemin sonucunda elde edilen pET26b-PETaz rekombinant DNA molekülü PETaz enziminin üretimi amacıyla *E. coli* SHuffle bakterisine aktarılmıştır. Rekombinant pET26b-PETaz plazmitini taşıyan *E. coli* bakterileri gen anlatımı ve PETaz enziminin üretimi için IPTG ile indüklenmiştir. İndüklenmiş hücre kültüründen izole edilen PETaz enziminin spektrofotometrik yöntemlerle analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *E. coli* bakterisinin PETaz enziminin sitoplazmada üretimi için uygun bir konak olduğunu göstermiştir.

PETaz geninin biyoinformatik tasarımı için öncelikle kodon optimizasyonu yapılmıştır. Kodon optimizasyonunda odak GC içeriği ve CAI değerleridir. Bir DNA molekülünde GC içeriğinin düşük olması, DNA'nın termal kararlılığını olumsuz yönde etkilerken, %60'tan fazla olması da konak organizma olan bakterinin kolaylıkla otolize uğramasına sebep olabilir (Levin ve Van Sickle 1976; Yakovchuk, 2006). Bu nedenle bu çalışmada PETaz geni için yapılan kodon optimizasyonu çalışmasında da GC içeriğinin %40-60 aralığında tutularak optimal stabilite sağlanmaya çalışılmıştır. CAI (Kodon Adaptasyon Endeksi) ise bir organizmanın bir gen üzerinde yer alan her bir kodonu kullanım eğiliminin ölçüsüdür (Sharp ve Li, 1987). Bu nedenle özellikle heterolog gen anlatımının yapılacağı organizma için ilgili gendeki CAI hesaplanarak kodon optimizasyonu ile bu oran artırılmaya çalışılır. Bu tez çalışması kapsamında, PETaz geninin anlatımını en iyi şekilde sağlamak için yapılan kodon optimizasyonu sonucunda GC içeriği %68.73'ten %56.78'e düşürülmüş; CAI ise 0.64'ten 0.80'e çıkarılmıştır.

PETaz enziminin rekombinant üretimi için şimdiye kadar yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, orijinal PETaz enziminin üretildiği organizma olan *Ideonella sakaiensis* bakterisinin endüstriyel kullanım için yeterli verimde enzim üretememesinden yola çıkılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında da olduğu gibi, PETaz enziminin rekombinant üretimi için yapılan çalışmalarda endüstriyel kullanıma uygun verim ve aktivitede

enzim üretimi amaçlanmıştır. PETaz enzimi üretimi için yapılan çalışmaların birçoğunda, enzimin üretilmesi için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bu nedenle farklı sinyal dizileri ile modifiye edilen PETaz geni, farklı organizmalarda üretilerek verim analizleri yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmaların önemli bir kısmında yerinde biyoremediasyona yönelik tür geliştirmek, ya da endüstriyel üretimde izolasyon maliyetini azaltmak için enzimin ekstraselüler üretimine yönelik stratejiler uygulansa da, bu durum enzim aktivitesini ve izolasyon verimini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu tez çalışmasında ise, literatürdeki diğer çalışmaların aksine, PETaz enziminin hücre içerisinde üretildikten sonra, izole edilerek kullanımı stratejisine yoğunlaşmıştır. Bunun sebebi, yüksek miktarda enzim elde etmenin yanında, elde edilen enzimin iyi aktivitede çalışmasının hedeflenmesidir. PETaz enziminin yapısında 2 adet disülfid bağı bulunduğu, bu nedenle de literatürde daha önce bildirilen plastik parçalayıcı enzimlere göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Enzim fazla miktarda üretilip hücre dışına salgılsa dahi, disülfid katlanmalarının yapılması için gerekli şartlar sağlanmadığı takdirde enzim aktivitesinde önemli oranda kayıp yaşanacağı düşünülmektedir (Joo ve diğ., 2018). Bu nedenle, bu tez çalışmasında PETaz enzimi, disülfid bağlarını sitoplazma içerisinde yapabilme yeteneğindeki *E.coli* SHuffle bakterisi kullanılarak, hücre içinde üretilmiş ve daha sonra izole edilmiştir. Böylece disülfid katlanmalarını yaparak uygun 3 boyutlu yapıya sahip olan protein miktarının toplam protein miktarı içerisindeki oranının artırılması, sonuç olarak hem yüksek aktivite hem de yüksek verimde enzim elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada gerçekleştirilen deneyler sonucunda; 1 mL'lik indüklenmiş hücre kültüründen elde edilen PETaz enzimi konsantrasyonunun en yüksek 0,935 mg/mL olduğu belirlenmiştir. 10 mL'lik indüklenmiş hücre kültürüne ait homojenattan elde edilen toplam protein konsantrasyonu ise 3,9544 mg/mL olarak belirlenmiştir.

PETaz enziminin *E. coli*'de üretimi için Seo ve diğ.'nin (2018) yaptığı çalışmada, *I. sakaiensis* organizmasına ait PETaz genine farklı sinyal dizileri eklenerek, üretilen enzimin hücre dışına salgılanması sağlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda hücre dışına salgılanan PETaz enziminin PET üzerindeki hidroliz etkisini koruduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan pET26b vektöründe bulunan pelB sinyal dizisi plazmitten kesilerek çıkarılmıştır. Bu sinyal dizisini kullanarak PETaz enzimi üretimini gerçekleştiren Seo ve diğ.'nin (2018) yaptığı çalışmada, MalE ve LamB sinyal dizilerine göre oldukça düşük verimde enzim elde edilmiştir. MalE sinyal dizisini taşıyan PETaz geninden enzim üretimi sonucunda 1 litre hücre kültüründen 6.2 mg; LamB sinyal dizisini taşıyan PETaz geninin anlatımı sonucunda ise 1 litre hücre

kültüründen toplam 3.0 mg enzim elde edilmiştir. Aynı çalışmada, aynı kültür koşullarında sinyal dizisi kullanılmayan ve hücre içinde üretilip izole edilen enzim konsantrasyonunun ise 4.0 mg olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise PETaz geni hücre içerisinde üretilmiştir. Yapısında 2 adet disülfid bağı taşıyan PETaz geni, sitoplazma içerisinde disülfid bağlarını yapabilme yeteneğindeki *E. coli* SHuffle bakterisine aktarılmıştır. Böylece gen anlatım ürünü olan enzimin disülfid katlanmalarını daha etkin şekilde yapması ve protein izolasyon sonrası edilen solüsyonu içerisindeki aktif enzim oranının artırılması amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda 10 mL indüklenmiş hücre kültüründen izole edilen toplam protein miktarı 3.9544 mg olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada elde edilen toplam protein miktarı, aynı miktarda hücre kültüründen MalE ve LamB sinyal dizileri kullanılarak besiyerinden elde edilen toplam protein miktarına göre 29 ile 60 kat daha fazladır.

Huang ve diğ.'nin 2018'de yayınladığı çalışmada, PETaz geni *Bacillus subtilis* 168 organizmasında *Bacillus* ırkına ait farklı sinyal peptitleri kullanılarak rekombinant olarak üretilmiştir. Aynı zamanda PETaz enziminin orijinal sinyal dizisi kullanılarak da üretim denemesi yapılmıştır. 20 mL'lik hücre kültürlerinden izole edilen enzimlerle yapılan çalışmalar sonucunda en iyi verimin 15 mg/L (0.015 mg/mL) ile SP_{PETase} sinyal peptidinin kullanıldığı enzime ait olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada 1 mL hücre kültüründen elde edilen en iyi izolasyon verimi 0.935 mg/mL konsantrasyon ile PS1 örneğine aittir. Dolayısıyla bu tez çalışmada elde edilen izolasyon veriminin *Bacillus subtilis* 168 organizması ile üretim sonrası elde edilen izolasyon verimine göre çok daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

Kim ve diğ. (2020)'nin yaptığı çalışmada, PETaz geni yeşil bir mikroalg olan *Chlamydomonas reinhardtii* organizmasına aktarılmıştır. Fakat bu organizmada PETaz enziminin üretimi için inkübasyon süresi 5-14 gün arasında değişmektedir. Bu nedenle bu çalışmada da kullanılan ve enzim üretim süresi çok daha kısa olan *E. coli* bakterisi önemli bir alternatif olarak göze çarpmaktadır. *C. reinhardtii* ile yapılan çalışmalar sonucunda 10 mL hücre kültüründen izole edilen en düşük ve en yüksek total protein konsantrasyonunun 1.6 ile 2.75 mg arasında olduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında ise 10 mL'lik hücre kültüründen izole edilen total protein konsantrasyonu 3.9544 mg olarak belirlenmiştir. *C. reinhardtii*'den elde edilen konsantrasyonlar ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada *E.coli*'den elde edilen enzim konsantrasyonlarının 1.44 ile 2.44 kat daha fazla olduğu belirlendi. Ancak liziz sonrası elde

edilen solüsyonlardaki total protein miktarını, hedef protein dışındaki diğer bazı hücresel proteinlerin de etkileyeceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu verilere göre enzimin hücre dışına yönlendirilmesine kıyasla, bu çalışmada olduğu gibi hücre içinde üretildikten sonra konak organizmanın lizisi sonrası enzim izole edilmesinin verimi çok daha fazla artırdığı görülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, enzim üretim koşullarının optimizasyonu ve ilave genetik manipölasyonlar ile PETaz enziminin *E. coli*'de endüstriyel başarıyı verecek şekilde üretilebileceğini destekler niteliktedir.



KAYNAKLAR

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z. & Wassie, M., 2017, The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review, *Open Journal of Environmental Biology*, 2(1), 038-046.
- Adamu, S., Koki, A., Adamu, S., Musa, A. & Abdullahi, A., 2016, Biotechnology as a Cradle of Scientific Development: A Review on Historical Perspective, *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 10(4), 1-12.
- Aguado, J. & Serrano, D., 1999, *Feedstock Recycling Of Plastic Wastes*, United Kingdom: The Royal Society of Chemistry.
- Akkaya, A. & Pazarlıoğlu, N., 2012, 21. Yüzyılın Anahtar Teknolojisi: Beyaz Biyoteknoloji, *Kırıkkale Üniversitesi Bilimde Gelişmeler Dergisi*, 1(1), 22-23.
- Al-Salem, S., 2009, Establishing an integrated databank for plastic manufacturers and converters in Kuwait, *Waste Management*, 29(1), 479-484.
- Al-Salem, S., Lettieri, P. & Baeyens, J., 2009, Recycling and recovery routes of plastic solid waste (PSW): A review, *Waste Management*, 29(10), 2625-2643.
- Alexander, M., 1999, *Biodegradation And Bioremediation*, 2nd ed. London: Academic Press.
- Allard, A. & Neilson, A., 1997, Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39(4), 253-285.
- Almeida, C., Rodrigues, A., Bonilla, S. & Giannetti, B., 2010, Emergy as a tool for Ecodesign: evaluating materials selection for beverage packages in Brazil, *Journal of Cleaner Production*, 18(1), 32-43.
- Amienyo, D., Gujba, H., Stichnothe, H. & Azapagic, A., 2012, Life cycle environmental impacts of carbonated soft drinks, *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 18(1), 77-92.
- Austin, H., Allen, M., Donohoe, B., Rorrer, N., Kearns, F., Silveira, R., Pollard, B., Dominick, G., Duman, R., El Omari, K., Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W., Amore, A., Skaf, M., Crowley, M., Thorne, A., Johnson, C., Woodcock, H., McGeehan, J. & Beckham, G., 2018, Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19), E4350-E4357.
- Bartolome, L., Imran, M., Gyoo, B., A., W. & Hyun, D., 2012, Recent Developments in the Chemical Recycling of PET, *Material Recycling - Trends and Perspectives*,.
- Biharee, A., Yadav, A., Tiwarii, A., Yadav, R., Shukla, P. & Gupta, A., 2018 Review on Bioinformatics And Some Computer Aided Drug Design Software, *Mosofiya Group Conference*, Allahabad U.P.: Researchgate, 80-83.
- Buchholz, K., & Collins, J., (2013), The roots a short history of industrial microbiology and biotechnology, *Applied Microbiology And Biotechnology*, 97(9), 3747-3762.

- Carbios, 2021, *Biorecyclage-Carbios*. Kaynak: <https://carbios.fr/technologies/le-biorecyclage> [Ziyaret Tarihi: 31.01.2021].
- Chertkov, O., Sikorski, J., Nolan, M., Lapidus, A., Lucas, S., Del Rio, T., Tice, H., Cheng, J., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Djao, O., Land, M., Hauser, L., Chang, Y., Jeffries, C., Brettin, T., Han, C., Detter, J., Rohde, M., Göker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Klenk, H. & Kyrpides, N., 2011, Complete genome sequence of *Thermomonospora curvata* type strain (B9T), *Standards in Genomic Sciences*, 4(1), 13-22.
- Childers, M. & Daggett, V., 2017, Insights from molecular Dynamics simulations for computational protein design, *Molecular Systems Design & Engineering*, 2(1), 9-33.
- Chilton, T., Burnley, S. & Nesaratnam, S., 2010, A life cycle assessment of the closed-loop recycling and thermal recovery of post-consumer PET, *Resources, Conservation and Recycling*, 54(12), 1241-1249.
- Cohen, S., Chang, A., Boyer, H. & Helling, R., 1973, Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240-3244.
- Crippa, M. & Morico, B., 2019, PET depolymerization: a novel process for plastic waste chemical recycling, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 215-229.
- Daboussi, F., Leduc, S., Maréchal, A., Dubois, G., Guyot, V., Perez-Michaut, C., Amato, A., Falciatore, A., Juillerat, A., Beurdeley, M., Voytas, D., Cavarec, L. & Duchateau, P., 2014, Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology. *Nature Communications*, 5(1).
- Das, S. & Dash, H., 2014, Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas, *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 1-21.
- Demain, A. & Vaishnav, P., 2009, Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnology Advances*, 27(3), 297-306.
- Devi B., R., 2015, Recombinant DNA Technology And Bio-Informatics, *Paramount Publishing House*, 144-148.
- Farmer, N., 2013, The future: global trends and analysis for the international packaging market in relation to the speed of impact of packaging innovation and likely material changes, *Trends in Packaging of Food, Beverages and Other Fast-Moving Consumer Goods (FMCG)*, 288-312.
- Fawzy, Y., Abdel-Hamid, H., El-Okr, M., & Atta, A., 2018, Structural, optical and electrical properties of PET polymer films modified by low energy Ar⁺ ion beams, *Surface Review And Letters*, 25(03), 1850066.
- Figueroa, Y., Hinks, D. & Montero, G., 2006, A Heterogeneous Kinetic Model for the Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Cyclo-tris-ethylene Terephthalate, *Biotechnology Progress*, 22(4), 1209-1214.

- Food and Drug Administration, (2006), *Guidance for Industry: Use of Recycled Plastics in Food Packaging (Chemistry Considerations)*, College Park: Division of Food Contact Notifications in the Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), 1-30.
- Geyer, R., Jambeck, J. & Law, K., 2017, Production, use, and fate of all plastics ever made, *Science Advances*, 3(7), e1700782.
- Grause, G., 2003, *Chemisches Recycling Von Polyethylenterephthalat Und Polymethylmethacrylat*, Hamburg: *Universität Hamburg*.
- Harris, EH., 2009, *The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use.*, 2nd ed. Cambridge: *Academic Press*.
- He, G., Tu, Z., Li, K., Chen, M., Chang, J., Chen, L., Yao, Q., Liu, D., Ye, H., Shi, J. and Wu, X., 2005, An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains, *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1).
- Hempel, F. & Maier, U., 2016, Microalgae as Solar-Powered Protein Factories, *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*, 241-262.
- Herrero Acero, E., Ribitsch, D., Steinkellner, G., Gruber, K., Greimel, K., Eiteljoerg, I., Trotscha, E., Wei, R., Zimmermann, W., Zinn, M., Cavaco-Paulo, A., Freddi, G., Schwab, H. & Guebitz, G., 2011, Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from *Thermobifida*, *Macromolecules*, 44(12), 4632-4640.
- Herzog, K., Müller, R. & Deckwer, W., 2006, Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases, *Polymer Degradation and Stability*, 91(10), 2486-2498.
- Hesper, B., Paulien H., 1970, Bioinformatica: een werkconcept, *Kameleon*, 1(6), 28-29.
- Houghton, J., Weatherwax, S. & Ferrell, J., 2006, *Breaking The Biological Barriers To Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda*, Washington, DC: *US Department of Energy*.
- Huang, X., Cao, L., Qin, Z., Li, S., Kong, W. & Liu, Y., 2018, Tat-Independent Secretion of Polyethylene Terephthalate Hydrolase PETase in *Bacillus subtilis* 168 Mediated by Its Native Signal Peptide, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(50), 13217-13227.
- IMARC, 2019, *PET Bottle Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity And Forecast 2020-2025*, Kaynak: <https://www.imarcgroup.com/PET-bottle-manufacturing-plant>, [Ziyaret Tarihi: 04.11.2020].
- Intini, F. & Kühtz, S., 2011, Recycling in buildings: an LCA case study of a thermal insulation panel made of polyester fiber, recycled from post-consumer PET bottles, *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 16(4), 306-315.
- İhracat Genel Müdürlüğü: Maden, Metal ve Orman Ürünleri Daire Başkanlığı, 2020, *Ambalaj Sektörü*, Ankara: Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı, 2-10.
- Jambeck, J., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R. & Law, K., 2015, Plastic waste inputs from land into the ocean, *Science*, 347(6223), 768-771.

- Ji, L., 2013. Study on Preparation Process and Properties of Polyethylene Terephthalate (PET), *Applied Mechanics and Materials*, 312, 406-410.
- Johnson, I., 1983, Human insulin from recombinant DNA technology, *Science*, 219(4585), 632-637.
- Joo, S., Cho, I., Seo, H., Son, H., Sagong, H., Shin, T., Choi, S., Lee, S. & Kim, K., 2018, Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation, *Nature Communications*, 9(1).
- Kawai, F., Oda, M., Tamashiro, T., Waku, T., Tanaka, N., Yamamoto, M., Mizushima, H., Miyakawa, T. & Tanokura, M., 2014, A novel Ca^{2+} -activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 10053-10064.
- Khan, S., Ullah, M., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M. & Hou, H., 2016 Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life *International Journal of Genomics*, 1-14.
- Kim, J., Park, S., Tran, Q., Cho, D., Choi, D., Lee, Y. & Kim, H., 2020, Functional expression of polyethylene terephthalate-degrading enzyme (PETase) in green microalgae, *Microbial Cell Factories*, 19(1).
- Kleeberg, I., Welzel, K., VandenHeuvel, J., Müller, R. & Deckwer, W., 2005, Characterization of a New Extracellular Hydrolase from *Thermobifida fusca* Degrading Aliphatic–Aromatic Copolyesters, *Biomacromolecules*, 6(1), 262-270.
- Lepoittevin, B. & Roger, P., 2011, Poly(ethylene terephthalate), *Handbook of Engineering and Speciality Thermoplastics*, 97-126.
- Levin, R. & Van Sickle, C., 1976, Autolysis of high-GC isolates of *Pseudomonas putrefaciens*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 42(1-2), 145-155.
- Liu, C., Shi, C., Zhu, S., Wei, R. & Yin, C., 2019, Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1), 289-294.
- Luscombe, N., Greenbaum, D. & Gerstein, M., 2001, What is bioinformatics? An introduction and overview, *Yearbook of Medical Informatics*, 10(01), 83-100.
- Malik, N., Kumar, P., Shrivastava, S., & Ghosh, S., 2016, An overview on PET waste recycling for application in packaging, *International Journal Of Plastics Technology*, 21(1), 1-24.
- Mandel, M. & Higa, A., 1970, Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection, *Journal of Molecular Biology*, 53, 159-162.
- Margesin, R. & Schinner, F., 2001, Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5-6), 650-663.
- Mertz, J. & Davis, R., 1972, Cleavage of DNA by R1 Restriction Endonuclease Generates Cohesive Ends, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(11), 3370-3374.
- Moog, D., Schmitt, J., Senger, J., Zarzycki, J., Rexer, K., Linne, U., Erb, T. & Maier, U., 2019, Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation, *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1-15.

- Mosier, N. & Ladisch, M., 2008, *Modern Biotechnology: Connecting Innovations Inmicrobiology And Biochemistry Toengineering Fundamentals*, ISBN: 978-0-470-11485-8
- Mustafa, M., Khan, M., Nguyen, D., & Iqbal, S., 2018, Techniques in Biotechnology, *Omics Technologies And Bio-Engineering*, 233-249.
- Müller, R., Kleeberg, I. & Deckwer, W., 2001, Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents, *Journal of Biotechnology*, 86(2), 87-95.
- Müller, R., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K. & Deckwer, W., 2005, Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*, *acromolecular Rapid Communications*, 26(17), 1400-1405.
- Nakkabi, A. S. M. A. E., Elmoualij, N., Sadiki, M., Ibnsouda, S., Koraichi, S. I., & Fahim, M., 2015, Biodegradation of poly (ethylene terephthalate) by *Bacillus subtilis*, *Int J Recent Adv Multidiscip Res*, 2(12), 1060-1062.
- Nigam, P., 2013, Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications, *Biomolecules*, 3(4), 597-611.
- Nymark, M., Sharma, A., Sparstad, T., Bones, A. & Winge, P., 2016, A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae, *Scientific Reports*, 6(1), 1-6.
- PAGEV, 2017, *Türkiye PET Termoform Sektör Raporu*, Türk Plastik Sanayicileri Araştırma, Geliştirme ve Eğitim Vakfı, Kaynak: <https://pagev.org/upload/files/Hammadde%20Yeni%20Tebliğ%20Bilg.%203/Türkiye%20PET%20Termoform%20Sektör%20Raporu.pdf> , [Ziyaret Tarihi: 15.01.2021].
- Patel, A., Singhanian, R., & Pandey, A., 2017, Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, *Biotechnology Of Microbial Enzymes*, 13-41.
- Plastics Europe, 2018, *An analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data*, Plastics – the Facts, 11-19.
- Plastics Insight, 2018, *Polyethylene Terephthalate (PET): Production, Price, Market And Its Properties*, Kaynak: <https://www.plasticsinsight.com/resin-intelligence/resin-prices/polyethylene-terephthalate/>, [Ziyaret Tarihi: 04.11.2020]
- Rezaie, E., Bidmeshki Pour, A., Amani, J. & Mahmoodzadeh Hosseini, H., 2019, Bioinformatics Predictions, Expression, Purification and Structural Analysis of the PE38KDEL-scfv Immunotoxin Against EPHA2 Receptor, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(2), 979-996.
- Ribitsch, D., Herrero Acero, E., Greimel, K., Dellacher, A., Zitzenbacher, S., Marold, A., Rodriguez, R., Steinkellner, G., Gruber, K., Schwab, H. & Guebitz, G., 2012, A New Esterase from *Thermobifida halotolerans* Hydrolyses Polyethylene Terephthalate (PET) and Polylactic Acid (PLA), *Polymers*, 4(1), 617-629.
- Saadi, M., Karkhah, A. & Nouri, H., 2017, Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches, *Infection, Genetics and Evolution*, 51, 227-234.

- Seo, H., Kim, S., Son, H., Sagong, H., Joo, S. & Kim, K., 2019, Production of extracellular PETase from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1), 250-255.
- Sharp, P. & Li, W., 1987, The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications, *Nucleic Acids Research*, 15(3), 1281-1295.
- Sinha, V., Patel, M. & Patel, J., 2010, Pet Waste Management by Chemical Recycling: A Review, *Journal of Polymers and the Environment*, 18(1), 8-25.
- Sulaiman, S., You, D., Kanaya, E., Koga, Y., & Kanaya, S., 2014, Crystal Structure and Thermodynamic and Kinetic Stability of Metagenome-Derived LC-Cutinase, *Biochemistry*, 53(11), 1858-1869.
- Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K., 2019, Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects, *ACS Catalysis*, 9(5), 4089-4105.
- Taşdelen, A. & Oran, S., 2017, *Plastik Geri Dönüşümünde Zorluklar Ve Fırsatlar*, Turkchem, Kaynak: <http://www.turkchem.net/plastik-geri-donusumunde-zorluklar-firsatlar.html>, [Ziyaret Tarihi: 21.10.2020].
- Taylor, S., 2019, The Past, Present, and Future of Recombinant DNA Technology, *Capstone Papers*, 23.
- Tayyar, A. & Üstün, S., 2010, Geri Kazanılmış PET'in Kullanımı, *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 53-62.
- Terpe, K., 2006, Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211-222.
- Thakur, A., Putatunda, C., Sharma, R., Mehta, R., Solanki, P., & Bhatia, K., 2020, Innovative Techniques for Improving Microbial Enzyme Production, *Microbial Diversity, Interventions And Scope*, 157-184. ,
- Thompson, R., Swan, S., Moore, C. & vom Saal, F., 2009, Our plastic age, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364(1526), 1973-1976.
- Tokiwa, Y. & Suzuki, T., 1977, Hydrolysis of polyesters by lipases, *Nature*, 270(5632), 76-78.
- Tuly, S., Joarder, M., & Haque, M., 2019, Liquid fuel production by pyrolysis of polythene and PET plastic, *8th Bsme International Conference on Thermal Engineering*.
- Verma, A. S., Agrahari, S., Rastogi, S., & Singh, A. 2011, Biotechnology in the realm of history, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(3), 321.
- Vittaladevaram, V., 2017, Fermentative Production of Microbial Enzymes and their Applications: Present status and future prospects, *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 2(04), 90-94.
- Volesky, B., Luong, J. & Aunstrup, K., 1984, Microbial Enzymes: Production, Purification, and Isolation, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2(2), 119-146.

- Vural, A., Demir, S. & Boyno, G., 2018, Biyoremediasyon ve Fungusların Biyoremediasyonda Kullanılması, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 490-501.
- Wang, N., Guan, F., Lv, X., Han, D., Zhang, Y., Wu, N., Xia, X. & Tian, J., 2020, Enhancing secretion of polyethylene terephthalate hydrolase PETase in *Bacillus subtilis* WB600 mediated by the SP amy signal peptide, *Letters in Applied Microbiology*, 71(3), 235-241.
- Wei, R., Oeser, T., Billig, S., & Zimmermann, W., 2012, A high-throughput assay for enzymatic polyester hydrolysis activity by fluorimetric detection, *Biotechnology Journal*, 7(12), 1517-1521.
- Yakovchuk, P., 2006, Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix, *Nucleic Acids Research*, 34(2), 564-574.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K., 2016 A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate), *Science*, 351(6278), 1196-1199.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Begüm Esra AYTAN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	13.06.2017

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

Makale ve Bildiriler	
AYTAN, B. & ARI, Ş., 2019. Polietilen Tereftalat Türü Plastik Depolimerize Eden Enzimin Biyoteknolojik Olarak Yeniden Tasarımı ve Üretimi, <i>20. Uluslararası Katılımlı Biyoteknoloji Kongresi</i>, 10-12 Ekim, Ankara, 28.	