



**PROLİL ENDOPEPTİDAZ (PEP) ENZİMİNİN
Escherichia coli EKSPRESYON SİSTEMİNDE
ÇÖZÜNÜR FORMDA ELDESİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

NEJLA BAKIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

PROF. DR. İSA GÖKÇE

Kasım - 2020

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROLİL ENDOPEPTİDAZ (PEP) ENZİMİNİN *Escherichia coli*
EKSPRESYON SİSTEMİNDE ÇÖZÜNÜR FORMDA ELDESİ,
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

NEJLA BAKIR

TOKAT
Kasım - 2020

Her hakkı saklıdır

Nejla Bakır tarafından hazırlanan “Prolil Endopeptidaz (PEP) Enziminin *E.coli* Ekspresyon Sisteminde Çözünür Formda Eldesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 24 KASIM 2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Aykut ÖZGÜR

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yakup ULUSU

Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi

.....

ONAY

.....

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

...../...../20.....

TEZ BEYANI

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

NEJLA BAKIR

24 Kasım 2020

ÖZET

PROLİL ENDOPEPTİDAZ (PEP) ENZİMİNİN *Escherichia coli* EKSPRESYON SİSTEMİNDE ÇÖZÜNÜR FORMDA ELDESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Prolil endopeptidaz serin peptidaz sınıfına ait büyük bir sitosolik enzimdir ve sık olarak kültürlenmiş bir mikroorganizma olan *Aspergillus niger*'den izole edilmiştir. Prolil endopeptidaz, prolin bakımından zengin prolaminleri parçalama ve enflamatuvar reaksiyonu inhibe etme yeteneklerinden dolayı umut verici bir terapötik ajandır. Günümüzde çölyak hastalığının tedavisinde prolil endopeptidaz enziminin oral yoldan verilmesinin etkili bir strateji olacağı düşünülmektedir. Bu şekilde yapılan tedavinin amacı prolil endopeptidazın mide asitleri tarafından parçalanmasını önlemek ve ince bağırsakta etkili olmasını sağlamaktır. Üretilmesi hedeflenen prolil endopeptidaz enziminin *Escherichia coli*'de rekombinant üretimi esnasında bazı problemler meydana gelmektedir. İnklüzyon cisimcikleri *Escherichia coli*'de prolil endopeptidaz enziminin yüksek seviyede ekspresyonu sırasında oluşmaktadır. Rekombinant protein üretimi sırasında meydana gelen inklüzyon cisimciklerinden proteinin yeniden kazanılması için kullanılan stratejiler uzun süre alabilmekte ve uygulamada çeşitli zorluklar içermektedir. Bu tez kapsamında prolil endopeptidaz enziminin ekspresyonu için *Escherichia coli* BL21 (DE3) hücreleri kullanılmıştır. Beş şaperon plazmid sistemi kullanılarak (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) prolil endopeptidaz enziminin inklüzyon cisimcikleri oluşturmaları engellenip çözünür formda üretimi sağlanmaya çalışılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda pKJE7 plazmidinin, prolil endopeptidaz enziminin çözünür formda üretimine bir miktar yardımcı olduğu gözlenmiştir. Prolil endopeptidaz enziminin aktivite çalışmaları spektrofotometrik analiz kullanılarak gerçekleştirilmiş olup prolil endopeptidaz enziminin K_m değeri 2,06 mM ve V_m 0,0359 mM/sn olarak bulunmuştur.

2020, 48 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Prolil endopeptidaz (PEP), Şaperon plazmitler, Coekspresyon, Rekombinant DNA, *E. coli*

ABSTRACT

OBTAINING, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SOLUBLE FORM OF PROLYL ENDOPEPTIDAZE (PEP) ENZYME IN *Escherichia coli* EXPRESSION SYSTEM

Prolyl endopeptidase is a large cytosolic enzyme belonging to the serine peptidase class and has been isolated from *Aspergillus niger*, a frequently cultured microorganism. Prolyl endopeptidase is a promising therapeutic agent due to its ability to degrade proline-rich prolamines and inhibits their inflammatory reaction. Today, it is thought that oral administration of prolyl endopeptidase enzyme will be an effective strategy in the treatment of celiac disease. The purpose of this treatment is to prevent the breakdown of prolyl endopeptidase by stomach acids and to ensure that it is effective in the small intestine. Problems occur during the recombinant production of the targeted prolyl endopeptidase enzyme in *Escherichia coli*. Inclusion bodies are formed during high level expression of prolyl endopeptidase in *Escherichia coli*. Strategies used to recover protein from inclusion bodies that occur during recombinant protein production may take a long time and contain various difficulties in practice. In the scope of this thesis, *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells were used for the expression of prolyl endopeptidase enzyme. By using five chaperone plasmid systems. (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16), prolyl endopeptidase enzyme was prevented from forming inclusion bodies and its production in soluble form was tested. As a result of the experiments, it was observed that plasmid pKJE7 helped the production of prolyl endopeptidase enzyme in some soluble form. Activity studies of the prolyl endopeptidase were carried out using spectrophotometric analysis and the K_m value of prolyl endopeptidase enzyme was found to be 2.06 mM and $V_m = 0.0359$ mM / sec.

2020, 48 PAGES

KEYWORDS: Prolyl endopeptidase (PEP), Chaperone plasmids, Co-expression, Recombinant DNA, *E. coli*

ÖNSÖZ

Çalışmalarım ve akademik hayatım boyunca bana araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, çalışmanın yürütülmesi süresince laboratuvarlarının tüm imkânlarından faydalanma fırsatı veren, bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda daima yol gösteren saygıdeğer Hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen, tecrübe ve önerilerinden yararlandığım değerli hocalarım Arş. Gör. Dr. Hülya KUDUĞ CEYLAN'a, Arş. Gör. Rızvan İMAMOĞLU'na ve Arş. Gör. Özlem KAPLAN'a teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim başta annem olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	İ
ABSTRACT.....	İ
ÖNSÖZ	İİİ
İÇİNDEKİLER.....	İV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	Vİİİ
ÇİZELGE LİSTESİ.....	İX
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. Rekombinant DNA Teknolojisi	2
2.2. Prolil Endopeptidazlar	4
2.3. Çölyak Hastalığı	5
2.4. İnklüzyon Cisimcikleri	7
2.5. Şaperon Sistemleri	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	17

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	18
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	19
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Prolil Endopeptidaz Enzimini Kodlayan Genin Optimizasyonu ve Sentezi	22
3.2.2. Prolil Endopeptidaz Enzimini Kodlayan Genin Çoğaltılması	24
3.2.3. Plazmid DNA Saflaştırılması	25
3.2.4.Şaperon Proteinlerin Gen Dizisini İçeren Plazmidlerin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	26
3.2.5. Transformasyon.....	27
3.2.6.Şaperon Proteinlerin Gen Dizisini İçeren Plazmidlerin <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Transferi	27
3.2.7. PEP Enziminin Şaperon Plazmid Sistemleriyle Birlikte Ekspresyonu	27
3.2.8. <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hücrelerinin Parçalanması.....	28
3.2.9. PEP Enziminin Saflaştırılması	28
3.2.10. SDS-PAGE Analizi	29
3.2.11. Diyaliz	29
4. BULGULAR.....	30
4.1.Rekombinant PEP Enziminin Şaperon Sistemleri ile Birlikte Üretilip Üretilmediklerinin SDS-PAGE Analizi ile Belirlenmesi	30
4.2. Rekombinant Üretimi Gözlenen Şaperon pKJE7 Sisteminin Üretilmesi	35
4.3. Şaperon pKJE7 Sisteminin Saflaştırılması	36
4.4. Prolil Endopeptidaz Enziminin Aktivite Tayini	37
4.4.1. Spektrofotometrik Analiz.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	39
6. KAYNAKLAR	43
7. ÖZGEÇMİŞ	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
----------	----------

bç	baz çifti
----	-----------

μl	mikro litre
----	-------------

μM	mikro molar
----	-------------

M	Molar
---	-------

mM	mili molar
----	------------

nm	nano metre
----	------------

P	Fosfat
---	--------

Rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotary per minute)
-----	---

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

Amp	Amfisilin
-----	-----------

APS	Amonyumpersülfat
-----	------------------

ÇH	Çölyak hastalığı
----	------------------

DMSO	Dimetil sülfoksit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSB	Frozen storage buffer
İB	İnklüzyon cisimcikleri
IPTG	İzopropil β -D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria -Bertani
OD	Optik yoğunluk
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
TEMED	N,N,N,N'- Tetrametilenetilendiamin
PEP	Prolil endopeptidaz

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Plazmid kullanılarak gen klonlanması ve rekombinant DNA eldesi.	11
Şekil 2.2. Prolil endoproteaz enziminin yapısı	13
Şekil 2.3. <i>E. coli</i> sitoplazmasında protein katlanması süreci.....	20
Şekil 3.1. <i>A.niger</i> 'e ait PEP proteinine optimize edilmiş nükleotid dizisi ve kodladığı aminoasid dizisi	30
Şekil 3.2. pET22b-Prolil endoproteaz vektörü ve <i>XbaI</i> ve <i>XhoI</i> restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	30
Şekil 4.1. PEP proteinin pG-KJE8 şaparon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi.....	35
Şekil 4.2. PEP proteinin pGro7 şaparon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi.....	36
Şekil 4.3. PEP proteinin pKJE7 şaparon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi.....	37
Şekil 4.4. PEP proteinin pG-Tf2 şaparon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi.....	37
Şekil 4.5. PEP proteinin pTf16 şaparon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi.....	38
Şekil 4.6. PEP proteinin şaparon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi.....	38
Şekil 4.7. PEP proteinin şaparon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi.....	40
Şekil 4.8. Farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak PEP enzimi için çizilen Michaelis-Menten grafiği.....	41

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan şaperon proteinleri içeren plazmidler ve özellikleri	22
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve marka bilgileri	25
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar ve marka bilgileri	26



1.GİRİŞ

Enzimler canlı organizmalarda substratların kimyasal değişimini katalizleyen kompleks protein molekülleridir. Enzimler çeşitli koşullarda da katalitik aktivite gösterdiklerinden, mikroorganizmaların bu proteinleri bol miktarda üretmeleri sonucu izole edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilirler. Enzimlerin bu şekilde endüstriyel süreçlerde kullanılma işlemleri topluca “enzim teknolojisi” olarak adlandırılır (Topal, 2020).

Rekombinant DNA, genellikle farklı türlerden elde edilen DNA molekülünün, moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elde edilen DNA parçalarının bir vektörde birleştirilmesiyle oluşturulmuş yeni DNA molekülüne verilen isimdir. Rekombinant teknikler kullanılarak modifiye edilmiş mikroorganizmalar sayesinde birçok proteinin üretim miktarı arttırılmaya böylelikle, ürün maliyetinin düşürülmesi sağlanmaya çalışılmaktadır (Whitford, 2005).

Enzim teknolojisinin, artan biyoteknolojik çalışmalar, Ar-Ge faaliyetleri ve medikal araştırmalar ile bağlantılı olarak gelişmesi sonucu biyoteknolojinin endüstriyel ve moleküler enzimler ile ilgili alanlarında yapılan araştırmalar bir hayli önem kazanmıştır. Son yıllarda stratejik alan olarak değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisi teknikleri kullanılarak enzim üretimi büyük oranda ilerleme kaydetmiştir (Aydın, 2017).

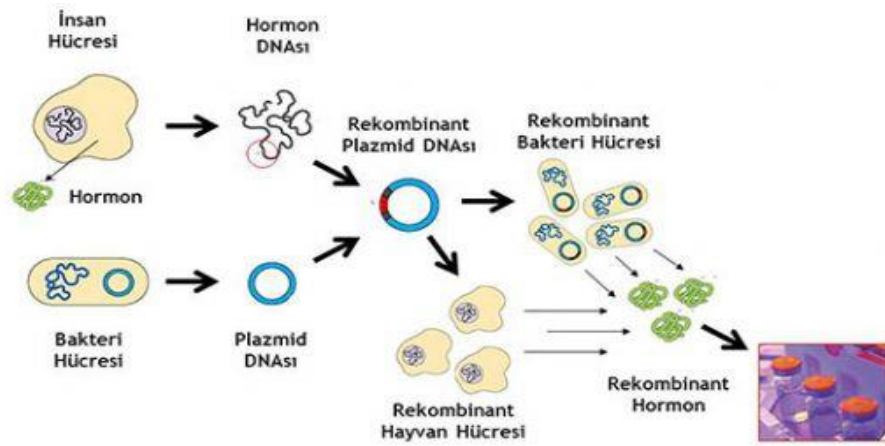
Prolil endopeptidaz (PEP), yaklaşık 30 amino asit uzunluğundaki peptidler içindeki prolil kalıntılarını parçalar. PEP enzimi buğday ve buğday alt türlerinde bulunan gluten ve diğer prolaminler gibi bazı proteinlerin ince bağırsakta parçalanmasını sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında PEP enziminin *E. coli*'de rekombinant olarak üretilmesi amaçlanmaktadır. Ancak üretimi hedeflenen PEP enziminin rekombinant olarak *E. coli*'de çözünür formda üretilmesi sırasında proteinin düzgün katlanamaması neticesinde inklüzyon cisimciklerinin oluşumu gibi problemler meydana gelmektedir. Bu problemleri ortadan kaldırmak için tercih edilen stratejilerden biri de şaperon plazmid sistemleridir. Şaperon plazmid seti, her biri optimal protein ekspresyonunu ve katlanmasını sağlamak ve proteinin yanlış katlanmasını azaltmak için "şaperon takımı" olarak işlev gören çoklu

moleküler şaperonları eksprese etmek üzere tasarlanmış beş farklı plazmidten (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) oluşur. Bu beş şaperon plazmidinden her biri ile hedef proteinin koekspresyonu sonucu çözünür formdaki proteinin geri kazanılmasını artırır ve ürün kaybını en aza indirir (AnonimD, 2020).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, kendi kendine meydana gelmesi mümkün olmayan, genellikle farklı biyolojik türlerden alınan DNA moleküllerinin gen mühendisliği teknolojisiyle kesilmesi ve elde edilen DNA parçalarının birleştirilmesi gibi işlemlerini içeren bir teknolojidir (Şekil 2.1.). Hedeflenen DNA için taşıyıcı rolündeki küçük moleküller ise vektör olarak adlandırılır. Klonlamanın temelini organizma genomundan alınan DNA'nın vektör sistemine yerleştirilmesi oluşturur. Vektör DNA'ya, organizmaya ait DNA'nın transferiyle meydana gelen molekül, rekombinant DNA olarak adlandırılmaktadır ve bu da rekombinant DNA'nın bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda klon olarak adlandırılan kopyalar oluşturulmaktadır. Klonlanan DNA transforme edilen hücrelerden saflaştırılarak doğrulanmaktadır (Kuk ve Erensoy, 2008).



Şekil 2.1. Plazmid kullanılarak gen klonlanması ve rekombinant DNA eldesi (Kuk ve Erensoy, 2008)

Gen klonlamasında önemli olan aşamalar kısaca şöyle sıralanabilir.

1. Hedef genin seçilmesi,
2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi için primer tasarımı,
3. Ligasyon ve transformasyon işlemleri
4. Taşıyıcı (vektör) DNA'nın elde edilmesi,
5. Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi,
6. Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması,
7. Seleksiyon,
8. Gen ürününün kontrol edilmesi.

Rekombinant DNA molekülü ya prokaryotik ya da ökaryotik konakçı bir hücreye yerleştirilmektedir. Konakçı hücre sonra replike olur ve onun yabancı DNA parçası ile vektör de replike hale gelmektedir. Yabancı DNA böylece çoğaltılmış olur ve sonrasında diğer analizler için çoğaltılmış DNA'lar saflaştırılmaktadır (Altıntaş ve ark., 2017).

Rekombinant DNA teknolojisi, günümüzde genetik hastalıklarda tanı, rekombinant protein ve aşı yapımı, başka canlılardan gen transferi yoluyla transgenik bitki ve hayvan soyları elde edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin başlıca uygulama yöntemleri arasında gen klonlamasının önemi ve yeri çok fazladır. Hatta esasını oluşturur. Gen klonlaması, basit olarak bir genin benzer kopyalarının elde edilmesi veya bir bireyden orijin alan gen gruplarının oluşturulması olarak tanımlanabilir. Bir tek bakterinin seçici katı besi yerinde üreyerek milyonlarca eş nesil oluşturması ve petride gözle görülebilecek koloni meydana getirmesi de buna örnek verilebilir. Ancak

bu tanım, bugün biyoteknolojide, önemli bir ürünün (veya proteinin) sentezini kodlayan genin ait olduğu hücre (prokaryotik veya ökaryotik) genomundan (veya kromozomundan) özel yöntemlerle (genellikle restriksiyon endonükleaz enzimleri ile) kesilerek çıkarılması, bunun bir taşıyıcı (vektör) DNA'sı ile birleştirilerek alıcı bir hücreye (prokaryotik veya ökaryotik) transfer edilmesi, bu alıcı hücrede genin ekspresyonunun sağlanmasıdır (Altıntaş ve ark., 2017).

2.2. Prolil Endopeptidazlar

Prolil endopeptidaz farklı bir serin peptidaz sınıfına ait büyük bir sitozolik enzimdir (Şekil 2.2.). PEP, peptit hormonlarının ve nöropeptitlerin olgunlaşması ve parçalanmasında rol oynar. PEP yaklaşık 30 aminoasit uzunluğundaki peptidler içindeki prolil kalıntılarını C-terminal tarafındaki peptid bağlarını parçalama özelliğine sahiptir (Anonim A, 2020).



Şekil 2.2. Prolil endopeptidaz enziminin yapısı (<https://www.uniprot.org/uniprot/P48147>, 2020)

PEP insan rahminde oksitosin parçalayıcı bir enzim olarak bulunmuştur. Peptidaz başlangıçta prolin kalıntılarının karboksil tarafındaki peptit bağımlı hidroliz ettiğinden dolayı prolin sonrası parçalama enzimi olarak adlandırılmıştır (Polgar, 2001).

PEP grubu, peptitleri içerdikleri prolin amino asitlerinden parçalayabilen endo-proteaz bir enzim ailesidir. Bu nedenle bu enzim sınıfı yoğun bir şekilde nörolojik hastalıklar için potansiyel farmasötik hedefler olarak araştırılmıştır. Beynin içinde yüksek konsantrasyonda, PEP aktivitesi bulunmuştur. Bu bulgu, dahili prolin kalıntılarına sahip birkaç nöropeptidin PEP tarafından tanındığı gerçeğiyle birlikte, PEP inhibitörleri ve nörolojik hastalıkların etkileri üzerine önemli oranda araştırma yapılmasını sağlamıştır. PEP aktivitesi, Alzheimer hastalığı, amnezi, depresyon ve şizofreni gibi çeşitli nörolojik bozuklukların yanı sıra kan basıncı regülasyonu, anoreksiya gibi diğer hastalıklarla bağlantılıdır. PEP enzim sınıfı, hem farmasötik bir hedef hem de ajan olarak mükemmel bir fırsatı temsil eder. Günümüzde PEP'e özgü inhibitörler çok çeşitli hastalıkların özellikle nörolojik hastalıkların tedavisi için değerlendirilmektedir. Son birkaç yıldır PEP, prolin açısından zengin gluten tarafından tetiklenen ince bağırsağın enflamatuvar bir hastalığı olan çölyak hastalığı için terapötik bir ajan olarak da çalışılmıştır Her durumda PEP enzimlerinin yapısı ve mekanizması, farmakolojik hedeflerin kolaylaştırılmasında kritik bir rol oynamıştır (Gass ve Khosla, 2006).

2.3. Çölyak Hastalığı

Çölyak Hastalığı (ÇH), buğday ve buğday alt türlerinde bulunan gluten ve diğer prolaminler bazı proteinlerin tüketilmesinden dolayı ishal, halsizlik, kilo kaybı gibi belirtileri olan genetik bir hastalıktır. ÇH'nin semptomları prolin kalıntıları bakımından zengin ve birçok proteaza dirençli olduğu bilinen prolaminler nedeniyle ince bağırsakta meydana gelen otoimmün bir enflamatuvar reaksiyondan kaynaklanmaktadır. Günümüzde ÇH için mevcut bir tedavi yoktur ve temel tedavi sadece prolamin içeren yiyecekleri yemekten kaçınmaktır. Tedavi için önerilen çözümlerden biri de bağırsaktaki prolaminleri doğrudan parçalayabilen ve oto-immün tepkisini azaltabilen bazı mikrobiyal PEP'lerin oral yoldan verilmesidir. Bu şekilde yapılan tedavinin amacı PEP'in mide

asitleri tarafından parçalanmasını önlemek ve ince bağırsakta etkili olmasını sağlamaktır (Anonim A, 2020).

ÇH, ince bağırsağın hem çocukları hem de yetişkinleri etkileyen yüksek prevalanslı kalıtsal bir hastalıktır. Bu çok faktörlü hastalık, yutulan buğday gluteni ve benzer çavdar ve arpa proteinlerinin bağırsak villerinin hasar görmesine ve besinleri emme kabiliyetinin büyük ölçüde azalmasına yol açmaktadır. Tedavi edilmezse çölyak artan anemi, infertilite, osteoporoz ve bağırsak lenfoma riski ortaya çıkabilmektedir (Gass ve Khosla, 2006).

ÇH, yüksek prolin ve glutamin kalıntısı içeriğine sahip proteinlerin karmaşık bir yapısı olan glutene anormal bir bağışıklık tepkisi ile karakterize küçük bir bağırsak bozukluğudur. Prolince zengin protein sekanslarını ayırmak için enzimlerinin yetersizliği göz önüne alındığında gluten bozulmaya karşı direnç gösterir. Günümüzde ÇH için mevcut olan başarılı terapi buğday, arpa ve çavdar içeren tüm ürünlerin hariç tutulmasını gerektiren ömür boyu glutensiz bir diyetdir. Elverişsiz özellikleri ve düşük fiyatı nedeniyle buğday gluteni gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuç olarak doğal glutensiz gıdalar kasıtlı olarak veya kazayla gluten içerebilir. ÇH hastaları yanlışlıkla glutene maruz kalabilirler. Çarpıcı bir şekilde bir glutensiz diyeti takiben ÇH'nin yaklaşık % 50'si semptomlar dan muzdarip olmaya devam etmektedir ve muhtemelen yanlışlıkla glutene maruz kalmaya bağlı olarak otoantikorlar veya villöz atrofi ortaya çıkmaktadır. Gluteni hidrolize edebilen *Aspergillus niger* prolil-endoproteaz (AN-PEP) gibi enzimlerle oral takviye glutenin yutulmasının zararlı etkilerini önlemek için önerilmiştir. Oral enzim takviyesi basitliği, kolaylığı ve az yan etki riski nedeniyle çekici bir seçenektir (Montserrat ve ark., 2014). *Aspergillus niger* prolil endoproteaz (AN-PEP), gluteni parçalayan benzersiz bir enzimdir. Doğal olarak meydana gelir ve yaygın olarak kullanılan diğer sindirim enzimleri ve sitrik asit dahil olmak üzere daha büyük bileşenler yapmak için sık olarak kültürlenmiş bir mikroorganizma olan *A. niger*'den izole edilmiştir. AN-PEP bir 'endoproteazdır' ve proteini yalnızca N ve C terminal uçları yerine tüm protein ve peptit zincirleri boyunca içeriden parçaladığı anlamına gelmektedir. Oral sindirim enzimleri, diyet glutenden kaçınanlar için umut verici bir yardımcı tedaviyi temsil etmektedir. AN-PEP ile ilgili yapılan çalışmalar, daha önce mevcut olan ve yaygın

olarak kullanılan sindirim enziminden daha üstün olduğunu göstermiştir. Ayrıca diyetle alınan glutene yanlılıkla maruz kalmaya karşı koruma olarak da önerilebilmektedir (Edens ve ark., 2005).

2.4. İnküzyon Cisimcikleri

İnküzyon cisimcikleri (İB)'ler *E.coli*'de heterolog proteinlerin yüksek seviyede ekspresyonu sırasında meydana gelmektedir. Bunlar sıklıkla ekspresyon konakçılarının sitoplazmasında veya periplazmasında yerleşir ve elektron mikroskobu altında yoğun agregatlar olarak görülmektedir. Yüksek düzeyde ekspresyon sırasında proteinlerin toplanması genellikle ribozomlardan ortaya çıkan yüksek polipeptit zincirlerinin yüksek lokal konsantrasyonuna, yetersiz katlanma ve şaperonların bulunmamasına bağlanmaktadır. Bu faktörler sitoplazmada kısmen katlanmış veya yanlış katlanmış protein ara maddelerinin oluşmasına yol açar (Upadhyay ve ark., 2012).

İB'ler, *E. coli* gibi bazı konakçı hücrelerin sitoplazması içinde oluşan mikron büyüklüğünde katı protein partikülleridir. Bir proteinin aşırı ekspresyonundan sonra İB'ler esas olarak ilgili rekombinant proteinden oluşur. Granüllere, ürün dışı protein, nükleik asitler ve hücre zarfı kontaminantları dahil olmak üzere bazı kontaminantlar da dahil edilebilir (Middelberg, 2000).

2.5. Şaperon Sistemleri

Şaperon, proteinlerin doğru katlanma ve açılmalarına, makromolekül yapının birleşme ve ayrılmasına aracılık ederek araformlarda kalıcı yapıların oluşmasını engellerler. Şaperon proteinler kısmen katlanmış ya da doğru katlanmamış polipeptidlerle etkileşime girererek bunların doğru katlanma yoluna girmesini ya da doğru katlanmanın gerçekleşmesi için uygun mikroçevreyi sağlarlar. Bazı şaperonlar oligomerik proteinlerde dördüncül yapının bir araya gelmesinde görevlidir (Anonim F, 2020).

E. coli'nin basit yapıya sahip olması, manipüle etmenin kolay olması, besiyeri bileşenlerinin ucuz olması, kolay ölçeklendirilmesi, hızlı ifadelenme, yüksek verim elde etme gibi avantajlara sahip olmasından dolayı bakteriyel ekspresyon için önemli oranda tercih edilmektedir. Ancak kodon kullanımı, inklüzyon cisimcikleri oluşumu, birçok ökaryotik protein için düşük verim, az miktarda salgılama, büyüklüğü fazla proteinleri üretmede zorluk gibi dezavantajları da bulunmaktadır. *E. coli* sisteminde meydana gelen bu sorunları çözmek için şaperon plazmidleri kullanılabilmektedir. *E. coli* büyük miktarlarda rekombinant protein üretmek için kullanıldığında inklüzyon cisimcikleri olarak bilinen, çözünmeyen yanlış katlanmış proteinlerin yoğun agregatlarını oluşturmaktadır. Bu inklüzyon oluşumunun yüksek protein konsantrasyonlarına izin vermesi, hassas proteinleri proteolitik bozulmalardan korumak ve hücreyi toksik proteinlerden korumak gibi faydaları da mevcuttur. Fakat bu proteini çözündürmek ve doğru 'aktif' formda yeniden katlamak gibi zorlukları da meydana getirmektedir. Peptid zincirinin doğal yapısına katlanması için gerekli olan tüm bilgiler peptidin birincil amino asit dizisinde bulunur. Bir proteinin rastgele bir aramayla katlaması için çok farklı olası konformasyon vardır. Her bir protein için yeniden katlanma şartları optimize edilmelidir. Önemli değişkenlerden olan tampon tipi, pH, iyonik güç ve yoğunlukla kombinasyon halinde katkı maddeleri (gliserol, redoks reaktifleri, amino asitler, metal iyonu, deterjanlar, şaperonlar) optimize edilir.

Yeniden katlanma optimizasyonları;

- Protein sekansına ve yapısal özelliklere dayalı olarak özel yeniden katlama stratejisinin seçimi.
- Tampon değişimi: Inklüzyonu azaltmaya yönelik çözümler, hangi parametrelerin yeniden katlama sonuçlarını etkilediğini belirlemek için yirmi farklı yeniden katlama tamponu ile seyreltilme.
- Denatürasyon çözme: Teknikler; seyreltme, diyaliz, diafiltrasyon ve kromatografi (iyon değişimi, boyut dışlama ve afinite).
- Analiz: Yeniden katlama sonuçları, SDS-PAGE, HPLC ve/veya fonksiyonel analiz ile doğrulama (Anonim C, 2019).

E. coli 'de meydana gelen inklüzyon oluşumunu azaltmak için uygulanan stratejiler uzun zaman alabilmektedir. Çünkü bu işlemler için tekrarlar yapıp sonuçlar elde edilmeye çalışılmaktadır. Bu süreci kısaltmak için şaperon sistemlerini kullanmak daha pratik ve zaman açısından fayda sağlanacağı düşünülen bir stratejidir. Kompleksleri oluşturan proteinler rekombinant ekspresyon sırasında agregat oluşturma eğilimindedir. Bu yüzden en iyi yöntem proteinleri uygun partner proteinle ifade etmektir. Şaperonlar, çözünür formda protein oluşumuna yardımcı olan proteinlerden biridir. Araştırmacılar, bazı proteinlerin şaperonlarla birlikte ekspres edildiklerinde gelişmiş çözünürlüklerini gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte belirli bir protein için uygun şaperon seçiminin üstlenilmesi zordur ve yalnızca deneme yanılma yöntemleriyle çözülebilir bir protein elde edilebilir. Rekombinant proteinlerin şaperonlarla birlikte ko-ekspresyonu, gelişmiş çözünürlük, daha geliştirilmiş spesifik aktivite ve hedef proteinin verimine yardımcı olabilir. *E. coli* 'de sıklıkla kullanılan şaperon sistemlerin bazıları aşağıda verilmiştir (Anonim B, 2019).

PDI: Protein disülfür izomeras, hem izomeras hem de şaperon görevi gören bir enzimdir. Protein olgunlaşması ve disülfid bağ oluşumu sırasında polipeptid zincirinin katlanmasına ve birleştirilmesine yardımcı olur.

GroEL /GroES: GroEL ve beraberindeki şaperon GroES, proteinlerin düzgün bir şekilde katlanması için birlikte çalışır. Doğal olmayan proteinler önce GroEL'in hidrofobik amino asitlerine eklenir ve daha sonra ATP ve GroES'in tetiklenmesiyle GroEL'in boşluğunda ATP hidroliz edilir ve düzgün bir şekilde katlanmış protein dışarıya salınır.

DnaKJE: DnaK, DnaJ, GrpE şaperonları, protein agregatlarını çözündürmek ve onları aktif proteinlere dönüştürmek için bir ısı şoku proteini olan ClpB ile birlikte çalışan DnaKJE sistemini oluşturur.

TF: Tetikleyici faktör, yeni oluşan polipeptid zincirine bağlanan ilk şaperondur. TF yeni sentezlenmiş proteini açık konformasyonda tutar ve birikmesini önler. Tetikleme faktörü ayrıca Peptidil-Prolil cis / trans izomeras (PPlase) aktivitesine sahiptir.

Skp: *E. coli*'de, periplazmik on yedi kilodalton proteini (Skp) şaperon görevi görür ve bakteriyel periplazmada uygun protein katlanmasına yardımcı olur. Proteinlerin skp ile birlikte ifade edilmesi rekombinant proteinlerin uygun şekilde katlanmasına yardımcı olur. Skp ayrıca virölans faktörlerinin birlikte ifadesinde de kullanılır.

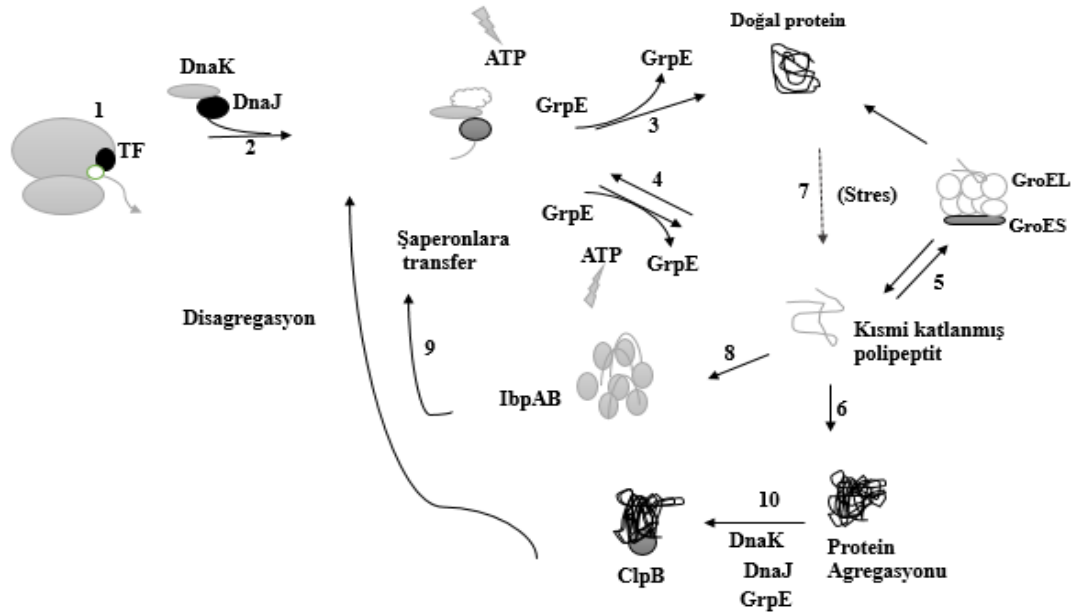
FkpA: Eşzamanlı ifade FkpA ile scFv fragmanının üretkenliğinin on katı artar. Bakteriyel zarf proteinlerinin toplam oluşumunu önleyen periplazmik bir proteindir. Şaperon aktivitesinin yanı sıra PPlase aktivitesine de sahiptir.

VanX: Bu hücre içi agregat oluşumunu engelleyerek istenen proteini ortama salmak için kullanılan bir lizis ortağıdır (Anonim B, 2019).

Mevcut prosedürler arasında proteinlerin şaperon proteinleriyle birlikte ekspresyonu yoluyla çözünür formda elde edilmesi daha avantajlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Protein katlama işlemi için şaperonların bir takım olarak işbirliği içinde çalıştığı bilinmektedir. Birçok çalışmada, genellikle İB oluşumunun geleneksel yöntemlerle engellenemediği proteinlerde, şaperon takımıyla birlikte ekspresyonun, çözünebilir formda proteinlerin geri kazanımını arttırdığı bildirilmiştir (Anonim B, 2019).

İB, proteinlerin hem katlanmamış hem de uygun intra-moleküler etkileşim içinde olmayan inaktif formudur. Mikroskopik analizler, inklüzyon cisimciklerinin boyut ve şeklinin sitoplazmik ve periplazmik alanlarda farklı olduğunu göstermiştir (Mukhopadhyay, 1997). İB silindirik veya oval formlarda olabilir ve şekillerin çapı 0,5 ile 1,3 µm arasında değişmektedir (Carrio ve Villaverde, 2002). Üstelik İB yüksek oranda hidrat formdadır ve yüksek hızlı santrifüjleme ile kolayca ayrılabilen süngerimsi yapılara sahiptirler (Singh ve Panda, 2005). Çalışmalar, İB çözünebilir ve çözünmeyen proteinler arasındaki dengesizliğin sonucu olan dinamik, tersine çevrilebilir ve kinetik yapıya sahip olduğunu göstermiştir (Villaverde ve Carrio, 2003). Ayrıca, İB proteinlerinin in vitro aktif formlara dönüştürülmesi gerçekten çok zordur ve inklüzyon cisimciklerinin izolasyonu, çözünürleştirilmesi ve yeniden katlanmasını içeren prosedürler düşük verimle sonuçlanmaktadır (Vallejo ve Rinas, 2004). İB çözünmesi çoğunlukla intramoleküler etkileşimlerin bozulmasını uyaran üre, HCl ve guanidin hidroklorür gibi denatüre edici

maddelere bağılıdır (Villaverde ve Carrio, 2003). Bu yüzden, yeniden katlama prosedürü kullanılarak proteinin eldesinden ziyade İB formunun azaltılması ve proteinin çözünür ekspresyonunun sağlanması daha etkili bir yaklaşım olarak düşünülmektedir. Bu kapsamda, rekombinant proteinlerin üretilmesinde, çözünür ekspresyon ve İB oluşumunun önlenmesi için moleküler şaperonlar, düşük sıcaklık, uygun promotor, proteinin sinyal peptidlerle periplazmaya salgılanması gibi çeşitli prosedürler kullanılmıştır (Schumann ve ark., 2004). Birçok rekombinant proteinin, genellikle bakteriyel hücrelerde fazla miktarda sentezlendiklerinde, düzgün katlanamamakta ve İB oluşturma eğilimi göstermektedir (Khosrowabadi ve ark., 2018). Üretilmesi hedeflenen proteinlerle birlikte fazla miktarda şaperon proteinlerinin üretilmesi in vivo da protein katlanmasını artırabilmektedir (Sachsenhauser ve Bardwell, 2018). *E. coli*’de moleküler şaperonlarla birlikte ekspresyon çözünebilir proteinlerin miktarını artırmak için kullanılan en yaygın yaklaşımdır. Şaperon ko-ekspresyon sisteminin, insan interferongama, fare endostatin, insan ORP150 ve insan lizozimi gibi çeşitli agregasyona yatkın rekombinant proteinlerin çözünürlüğünü arttırdığı ortaya koyulmuştur (Nishihara ve ark., 2000; Yan ve ark., 2012; Nausch ve ark., 2013; Singhal ve ark., 2015). Amrein ve arkadaşlarının (1995), çalışmasında p50csk Protein-Tyrosine Kinase Candida proteininin şaperon proteinlerle birlikte ekspresyonu protein çözünürlüğünü ve aktivitesini %50 den daha fazla artırmıştır (Amrein ve ark., 1995). Temelde DnaK-DnaJ-GrpE, trigger faktör (TF), ve GroEL-GroES olmak üzere 3 çeşit şaperon sistemi vardır (Lu ve ark., 2016; Schlapschy ve Skerra, 2011; Tong ve ark., 2016). Moleküler şaperonlar yeni oluşan polipeptit zincirleriyle ribozomlarda etkileşmekte ve protein katlanmasının sağlanmasında, disülfid bağ oluşumu ve agregasyonun önlenmesinde görev almaktadır (Lu ve ark., 2016; Shen ve ark., 2016; Thomas ve ark., 2016). Şekil 2.4’de *E. coli* hücrelerinin sitoplazmasında proteinlerin şaperon proteinler yardımıyla katlanma süreci gösterilmiştir (Kolaj ve ark., 2009).



Şekil 2.3. *E. coli* sitoplazmasında protein katlanması süreci.

Oluşmaya başlayan oligopeptidler ribozomal çıkış tüneline çıktıklarında tetikleyici faktör (TF) şaperonu ile karşılaşırlar (1). Aynı zamanda bu oligopeptitler uygun konformasyonda (3) katlanmayı destekleyen DnaJ ve GrpE ile işbirliği yapan DnaK (2) tarafından da yakalanabilirler. Daha sonra DnaK (4) ve TF tarafından yeniden yakalanabilir ve muhtemelen bu katlanma döngüsü protein uygun konformasyona gelinceye kadar devam edebilir, uygun konformasyona katlanmak için GroEL-GroES (5) ile etkileşime girebilir veya agregasyona maruz kalabilir (6). Isı stresi ile birlikte, agregasyona eğilimli hidrofobik bölgelerin ortaya çıkmasıyla sonuçlanan, termolabil proteinlerin kısmi açılımı meydana gelebilir (7). Bazı küçük HSPlar kısmen katlanmış proteinleri, Hsp70 ve Hsp60 şaperonlar DnaK ve GroEL'e (8,9) transfer için tutarken, katlanmamış proteinlerin ayrıştırılması ClpB tarafından Hsp70 ailesiyle işbirliği içinde gerçekleştirilir (10), katlama işleminin tamamlanması için DnaK / DnaJ / GrpE takımına tekrar transfer edilir (Şekil 2.3.) (Kolaj ve ark., 2009).

DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL, GroES ve Trigger faktörleri *E. coli*'de kullanılan bazı sitoplazmik şaperonlardır. Bu şaperonlar *E. coli*'de protein çözünürlüğünü geliştirmek için tek başlarına veya kombinasyon halinde kullanılmıştır (Arya ve ark., 2015; Cui ve

ark., 2011; de Marco, 2007; Levy ve ark., 2001; Ronez ve ark., 2012). Proteinin yeniden katlanmasını sağlamak için yaygın olarak kullanılan en verimli şaperon kombinasyonları, Groel-GroES ve DnaK-DnaJ-GrpE'dir (Jhamb ve Sahoo., 2012; Yan ve ark., 2012, Voulgaridou ve ark., 2013). Ek olarak, DnaK-DnaJ-GrpE'nin katlanamamış proteinlerin salgılanmasına yardımcı olduğu ve GroEL-GroES şaperonlarının peptidlerin inklüzyonun oluşumunu azalttığı gözlenmiştir (Sorensen ve Mortensen, 2005). Trigger faktör (TF), peptit çıkış alanının yakınında ribozomlara bağlanır ve kısa zincirlerle etkileşir (Hartl ve Hayer-Hartl, 2002). Trigger faktörün, GroEL ile etkileştiği ve protein katlanmasını kolaylaştırmak için GroEL-substrat bağlanmasını geliştirdiği gösterilmiştir (Folwarczna ve ark., 2012). GroE-GroES'nin birlikte sentezlenmesinin, çözünebilir formda anti-B tipi natriüretik peptit tek zincirli antikorun (scFv) yaklaşık %65'inin üretilmesi ile sonuçlandığı bilinmektedir; bu, şaperonların yokluğunda olandan 2.4 kat daha yüksektir (Maeng ve ark., 2011). DnaK-DnaJ-GrpE sistemi ise, yeni sentezlenmiş proteinlerin uygun şekilde katlanmasını kolaylaştırmak ya da GroEL-GroES sistemine transfer edilmesine aracılık etmek için yeni polipeptidlerle etkileşime girmektedir (Ewalt ve ark., 1997). *E. coli* sitoplazmasında DnaK şaperon proteini, ATP'ye bağımlı bir şekilde davranır ve hem normal hem de stresli büyüme koşulları altında protein katlanmasına aracılık etmek için DnaJ ve GrpE şaperon proteinleri ile işbirliği yapar (Chung ve ark., 2003). DnaK-DnaJ ve GrpE sistemi, polipeptit zincirlerinin katlanması, membrandan protein aktarımı, hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, çok alt birimli protein yapısının birleştirilmesi, protein agregasyonunun çözülmesi ve ısı şoku cevabının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Dumitru ve ark., 2004). Ying ve arkadaşları (2004), DnaK-DnaJ ve GrpE'nin anti-BSA tek zincirli antikor ile ekspresyon sisteminin bu antikor fragmanının çözünürlüğünü belirgin bir şekilde geliştirdiğini bildirmiştir (Ying ve ark., 2004). Hu ve arkadaşları (2007), DnaK-DnaJ-GrpE (DnaKJE) ile ekspresyon yoluyla scFv proteinin çözünebilir üretiminin 100 katına kadar arttığını ortaya koymuştur (Hu ve ark., 2007). DnaK ile ClpB (Hsp100) gibi diğer şaperonlar, proteini çözünürleştirir ve agregasyonu önler (Betiku, 2006; Nausch ve ark., 2013). IbpA ve IbpB gibi diğer ısı şoku proteinleri ısı ile denatüre olan proteinlerin agregasyonunu önler (Guzzo, 2012).

Skp ve FkpA şaperonlarının birlikte sentezlenmesinin, *E. coli*'de antikor fragmanlarının çözünürlüğünü arttırdığı gösterilmiştir (Ow ve ark., 2010). Tüm bu çalışmalar göz önünde

bulundurulduğunda *E. coli*'de rekombinant proteinlerin üretiminin iyileştirilmesi için, en etkili olanı belirlemek üzere farklı moleküler şaperon kombinasyonlarının analiz edilmesinin gerekliliği açıkça ortaya çıkmaktadır. HSP Research Institute tarafından geliştirilen beş farklı tipte plazmid (Çizelge 2.1) şaperon proteinlerin çeşitli kombinasyonlarını içermektedir.

Çizelge 2.1. Tez çalışmasında kullanılan şaperon proteinleri içeren plazmidler ve özellikleri

Plazmit	Antibiyotik Dirençliliği	İndükleyici Ajan	Şaperonlar	Molekül Ağırlıkları
pG-KJE8	Kloramfenikol (20 mg/ml)	L-arabinoz (0.5 mg/ml) tetrasiklin (5 ng/ml)	dnaK-dnaJ- grpE/groES- groEL	dnaK-70 kDa dnaJ-40 kDa grpE- 22 kDa groES-10 kDa groEL-60 kDa
pGro7	Kloramfenikol (20 mg/ml)	L-arabinoz (0.5 mg/ml)	groES-groEL	groES-10 kDa groEL-60 kDa
pKJE7	Kloramfenikol (20 mg/ml)	L-arabinoz (0.5 mg/ml)	dnaK-dnaJ- grpE	dnaK-70 kDa dnaJ-40 kDa grpE- 22 kDa
pG-Tf2	Kloramfenikol (20 mg/ml)	tetrasiklin (5ng/ml)	groES-groEL/tig	groES-10 kDa groEL-60 kDa tig- 56 kDa
pTf16	Kloramfenikol (20 mg/ml)	L-arabinoz (0.5 mg/ml)	Tig	Tig-56 kDa

Şaperon plazmid seti, her biri optimal protein ekspresyonunu ve katlanmasını sağlamak aynı zamanda proteinin yanlış katlanmasını azaltmak için bir ‘şaperon takımı’ olarak işlev gören çoklu moleküler şaperonları eksprese etmek üzere tasarlanmış beş farklı plazmidten oluşur. Bu beş şaperon plazmidinden (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) biri ile hedef proteinin birlikte ekspresyonu, çözünebilir proteinin geri kazanılmasını artırır ve çözünmeyen proteinin bir sonucu olarak ürün kaybını en aza indirir. Her plazmid pACYC’ den türetilmiş bir replikasyon kaynağı (orijin) ve ampisilin dirençli ColEl tipi plazmidler içeren *E. coli* ekspresyon sistemlerinin kullanılmasına izin veren bir kloramfenikol direnç genini taşır. Şaperon genleri *araB* veya *tet* gibi

destekleyiciler bulunur. Sonuç olarak, hedef gen farklı promotörlerin kontrolü altına alındığında hedef proteinlerin ve şaperonların ekspresyonu ayrı ayrı indüklenebilir. Bu plazmidler ayrıca her promotör için gerekli regülatörü (*ara C* veya *tet*) içerir (Anonim D, 2020).

Jhamb ve Sahoo (2012), yaptığı bu çalışmada sıcaklık, indükleyici konsantrasyonu, indüksiyon zamanı ve moleküler şaperonların (GroEL-GroES ve DnaKJE) birlikte ekspresyonu, model protein ksilanazların hücre büyümesi ve çözünmesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Çözünebilir ksilanazların verimi, ekim sıcaklığı ve indükleyici seviyesinin düşmesi ile artmıştır. Ek olarak, DnaKJE şaperonunun birlikte ekspresyonu çözünür ksilanazların artmasını sağlamıştır. Bir şaperon ile ekspresyon ve kısmi indüksiyonun bir kombinasyonu çözünür fraksiyonda toplam ksilanaz veriminin %40'ına (DnaKJE'de) ve (GroEL-GroES'te) %33'ünü arttırmıştır. Kullanım kolaylığı, çabuk büyüme koşulları ve ürünün hücre sitoplazmasında daha yüksek seviyelerde birikmesi bir organizmanın, ekspresyon konakçısı tarafından en çok aranan özellikleridir. Bununla birlikte tüm genler *E. coli*'de kolay bir şekilde eksprese edilmemektedir. *E. coli*'nin prokaryotik sisteminde doğal olmayan proteinlerin üretilmesi ile ilgili birkaç sınırlama vardır. Glikozilasyon veya disülfür bağ oluşumu meydana getirme kapasitesine sahip olmayan proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarında önemli problemler ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak rekombinant polipeptitlerin inklüzyon cisimcikleri olarak bilinen inaktif proteinin büyük agregatları içinde bulundurduğu gözlemlenmiştir (Jhamb ve Sahoo, 2012).

Biyolojik olarak aktif ürünlerin toplanmış durumdan geri kazanılması tipik olarak kaotropik maddelerle açıldıktan sonra seyreltme/diyalizin optimize edilmiş yeniden dondurma tamponları halinde gerçekleştirilmesi ile uygulanabilmektedir. Ancak yeniden katlama prosedürünün optimizasyonu zaman alıcı çabalar gerektirir ve yüksek ürün verimlerine elverişli değildir. Bu nedenle çözünür ve aktif bir formda rekombinant protein verimlerinin maksimuma çıkarılması in vitro katlanmayla alternatif olur. Proteinlerin inklüzyon cisimciklerini çözünür fraksiyona yeniden yönlendirilmesi için birtakım yaklaşımlar literatürde açıklanmaktadır. Yetiştirme koşullarının bir konakçı hücrenin

değiştirilmesi veya füzyon ortaklarının kullanılması yöntemlerden bazılarıdır. Moleküler şaperonların ve diğer katlama katalizörlerinin uzun zamandan beri protein katlamasına yardımcı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte şaperon ile birlikte üretiminin başarısı şaperon sisteminin katlama ara maddelerine nispi yakınlıklarına ve bu türlerin katlanma ve toplanma kinetiğine bağlıdır. Bu parametrelerin tahmin edilmesi zordur ve bu nedenle moleküler şaperonların uygulanması tekrarlama deneyimlerine dayanmaktadır. Dikkate alınması gereken diğer bir konu da herhangi bir şaperon kombinasyonunun uygunluğunun hedef proteine özgü olmasıdır. Bu nedenle hem çözünebilir protein miktarını arttırmak için hem hedef protein hem de şaperonların ekspresyonunun ince şekilde ayarlanması gerekmektedir (Jhamb ve Sahoo, 2012).

Şaperon ile ekspresyonunun ökaryotik hücrelerin yanı sıra bakterilerden geri kazanılan çözünebilir rekombinant protein verimi üzerindeki olumlu etkisi büyük ölçüde belgelenmiştir (Hanning ve Makrides, 1998). Birkaç farklı şaperon kombinasyonu başarıyla kullanılmıştır (Amrein ve ark., 1995; Kandror ve ark., 1997; Marco ve ark., 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazlar ve marka bilgileri

Kullanılan Cihaz	Markası
Buzdolabı	Vestel Gtp 455a
Çalkalayıcı İnkübatör	Biosan Es 20
Çalkalayıcı İnkübatör	Zhicheng - Zhwy111c
Dikey Soğutucu +4 ⁰ C	Uğur
Dondurucu (-80)	Hettich
Etüv	Memmert
Güç kaynağı (SDS ve agaroz jel elektroforezi için)	Biorad
Isıtıcı Magnetik Karıştırıcı	Velp Scientifica Are
Mikro 22R santrifüj	Hettich
MD ₅₀₀ mikrodalga fırın	Arçelik
Otoklav (50L)	Hmc Hirayama
SDS jel elektroforez seti	Biorad
Spin Cihaz	Biosan, Combi Spin Fvl 2400n
Sonikatör	Sonics (Vcx130)
Termostatlı Blok Isıtıcı	Biosan
UV/VIS Spektrofotometresi,	Varian Carry 50
UV Gösterici	Syngene Sytc/1422
Yüksek Hızlı Santrifüj	Vision vs 30 000i

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve markaları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasallar ve marka bilgileri

Kullanılan Kimyasal	Markası
Agar	BD Bacto™ Agar
Agaroz	Bioron
Akrilamid	Amresco
Ampisilin	Sigma Aldrich
APS	Biorad
Beta Merkaptotanol	Carlo Erba
Bezamidin	Merck
BSA	Promega
CaCl ₂ .2H ₂ O	Carlo Erba
DMSO	Merck
Etanol	Merck
Etidyum bromür	ICN
Gliserol	Euromedex
HCl	Merck
IPTG	Amresco
İmidazol	Merck
KCH ₃ COO	Merck
KCl	Sigma
Kloramfenikol	Sigma
LB Broth Base	İnvitrogen lennox L Broth Base

Çizelge 3.2. (Devam) Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Markası
Metanol	Merck
NaH ₂ PO ₄	Carlo Erba
Plazmid DNA saflaştırma kiti	Bio Basic
PMSF	Sigma Aldrich
SDS	Serva
TEMED	Biorad
Tetrasiklin	Sigma
Tripton	BD Bacto™
Tris	Sigma Aldrich
Triton X 100	Takara

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

PMSF Çözeltisi: 150 µg PMSF 1 ml mutlak etanolde çözülerek hazırlanmıştır.

Kloramfenikol Çözeltisi: Kloramfenikol 34 mg/ml olacak şekilde mutlak etanolde çözülüp 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

Tetrasiklin Çözeltisi: 12.5mg/ml olacak şekilde otoklavlanmış saf suda çözülmüş ve 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

FSB çözeltisi: 7.4 g KCl, 100 g gliserol, 7.5 g CaCl₂.2H₂O, 10 ml 1 M (pH:7.5) KCH₃COO alınarak pH:6 olacak şekilde ayarlanmıştır ve son hacim 1 000 ml'ye tamamlanarak otoklavlanmıştır.

Ampisilin: 1.5 gram ampisilin 15 ml saf suda çözülmüştür. Steril 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilip mikrotüplere bölünmüş ve -20°C' de saklanmıştır.

IPTG: 1.5 gram IPTG, 15 ml steril suda çözülmüş ve 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek mikrotüplere bölünmüş ve -20 °C'ye kaldırılmıştır.

LB çözeltisi: 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1 000 ml suda çözülmüştür. 1 000 ml'lik çözeltiden iki yüz elliser ml' lik stoklar hazırlanmıştır. Hazırlanan stok şişelere 3.75 g agar eklenip karıştırılmış ve otoklavlanmıştır.

Diyaliz çözeltisi: 10 mM Tris-HCl, 300 mM KCl, 0.1 mM EDTA pH:7.5 olacak şekilde 3 litre distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

SDS Elektroforez Jeli Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar

Alt Tampon: 4 g SDS (%0.4) ve 182 g Tris (1.5 M) 1000 ml saf suda çözülüp pH:8.8'e ayarlanmıştır.

Üst Tampon: 4 g SDS (%0.4) ve 60.5 g Tris (1.5 M) 1000 ml saf suda çözülüp pH:6.6 ayarlanmıştır.

Yükleme Jeli: 1 ml üst tampon, 2.55 ml su, 0.35 ml %40 akrilamid, 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED' den oluşmaktadır. Tüm kimyasallar eklenip son olarak APS ve TEMED eklenerek kasete dökülmüş ve yürütme jeli polimerleşene kadar beklenilmiştir. Daha sonra üzerine yükleme jeli dökülmüş ve polimerleşene kadar beklenilmiştir.

Elektroforez Tamponu (1X): 14.4 g Glisin, 1 g SDS ve 3 g Tris bileşikleri 1 000 ml saf suda çözülüp hazırlanmıştır.

SDS Örnek Yükleme Tamponu (5X): 5 ml gliserol (%50), 0.6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.5 ml β-ME (β- Merkaptotanol), 2 ml%10'luk SDS, 1 000 µl %1'lik Bromfenol mavisi ve 0.9 ml saf su karışımı ile hazırlanmıştır.

SDS Jel Boyama (Staining) Çözeltisi: 0.5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası, 450 ml metanolde çözülmüştür. Çözelti filtre kâğıdı ile filtre edildikten sonra, üzerine 450 ml saf su ve 100 ml asetik asit eklenmiştir.

Destaining Çözeltisi: 100 ml asetik asit ile 100 ml metanol karıştırılıp 800 ml saf su ile hazırlanmıştır.

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

Protein Safıaştırmaa Kullaılan Çözeltiler

NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu: 65 ml, 0.2 M NaH₂PO₄ ve 0.2 M, 435 ml Na₂HPO₄ karıştırılarak pH:7.6'a ayarlanmış ve toplam hacim saf su ile 1 000 ml'ye tamamlanmıştır.

Yükleme tamponu (Loading Buffer):2.92 g NaCl, 500 ml NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄ tamponunda (pH:7.6) çözülmüştür.

Yıkama tamponu (Wash Buffer): (25 mM imidazol, 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄, pH:7.6): 0.85 g imidazol, 2.92 g NaCl, 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH:7.6) tamponunda çözülmüştür.

Elüsyon tamponu (Elution Buffer): (300 mM imidazol, 100 mM NaCl-100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH:7.6.0): 10.2 g imidazol, 2.92 g NaCl, 500 ml NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponu içerisinde (pH:7.6) çözülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Prolil Endopeptidaz Enzimini Kodlayan Genin Optimizasyonu ve Sentezi

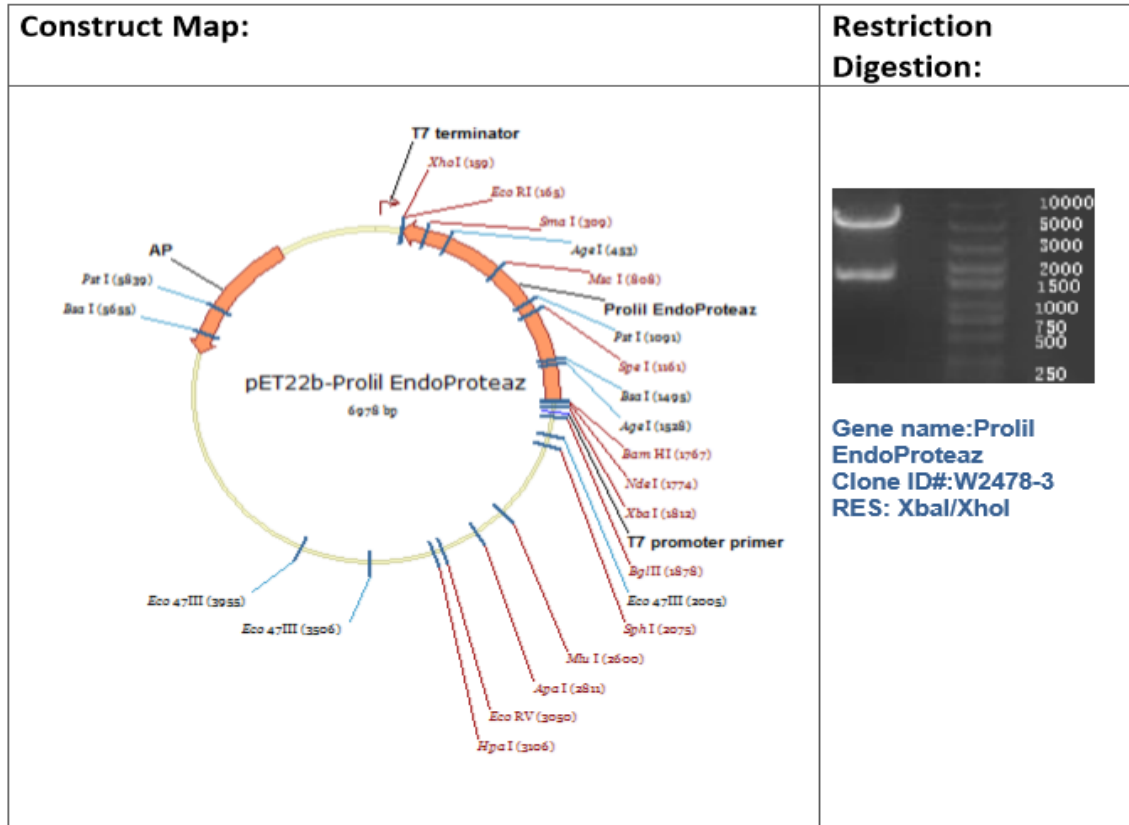
3.2.1.1. *A. niger*'e ait PEP proteinine ait optimize edilmiş nükleotid dizisi ve kodladığı aminoasid dizisi

Burada *Aspergillus niger* organizmasının PEP enziminin optimize edilmiş nükleotid dizisi ve bu nükleotidlerin kodladığı aminoasid dizisinin analizi yapılmıştır (Şekil 3.1.). Prolil endoproteazın klonlandığı pET22b vektörü gösterilmiştir (Şekil 3.2.).

Atg	gga	tcc	cgt	gcc	ttc	tcc	gct	gtc	gct	gct	gcg	gcc	ctg	gcg	ctc	tct	tgg
M	G	S	R	A	F	S	A	V	A	A	A	A	L	A	L	S	W
gcg	tct	ctg	gct	cag	gct	gct	cgc	ccc	cgt	ctt	gtg	ccc	aag	cct	gtc	tct	cgg
A	S	L	A	Q	A	A	R	P	R	L	V	P	K	P	V	S	R
tct	agt	aaa	tcg	gct	gcg	acc	acg	ggc	gag	gct	tac	ttt	gag	cag	ctg	ctg	gac
S	S	K	S	A	A	T	T	G	E	A	Y	F	E	Q	L	L	D
aat	ccg	gag	aag	ggc	acc	ttt	tcc	cag	agg	tac	tgg	tgg	agt	act	gaa	tac	tgg
N	P	E	K	G	T	F	S	Q	R	Y	W	W	S	T	E	Y	W
cct	ggg	tca	ccg	gtc	gtc	ctc	ttt	act	cct	gga	gag	gtc	tct	gcg	gat	ggc	tat
P	G	S	P	V	V	L	F	T	P	G	E	V	S	A	D	G	Y
tat	ctc	acc	aat	ggg	act	ctc	act	ggg	gtc	tat	gcg	cag	gag	atc	cag	ggg	gcc
Y	L	T	N	G	T	L	T	G	V	Y	A	Q	E	I	Q	G	A
ctc	att	gag	cac	cgc	tac	tgg	ggg	gat	tct	tct	cct	tat	gag	gtg	ctc	aat	gcc
L	I	E	H	R	Y	W	G	D	S	S	P	Y	E	V	L	N	A
ctt	cag	tac	ctc	aca	ctg	gac	caa	gcc	att	ctg	gac	atg	acc	tac	ttc	gcg	gag
L	Q	Y	L	T	L	D	Q	A	I	L	D	M	T	Y	F	A	E
aag	ctg	caa	ttc	gat	aac	agc	acc	cgc	agc	aat	gcg	cag	aat	gct	ccc	tgg	gtc
K	L	Q	F	D	N	S	T	R	S	N	A	Q	N	A	P	W	V
ggg	gga	tca	tac	agt	ggg	gcc	ttg	acg	gct	tgg	acc	gaa	tct	gtc	gcg	cct	gga
G	G	S	Y	S	G	A	L	T	A	W	T	E	S	V	A	P	G
tgg	gct	tac	cat	gcg	act	agt	gct	cct	gtg	gag	gct	atc	tac	gac	tat	tgg	caa
W	A	Y	H	A	T	S	A	P	V	E	A	I	Y	D	Y	W	Q
tac	ccc	atc	cag	caa	ggg	atg	gca	cag	aac	tgc	agc	aag	gac	gtg	tct	ctg	gta

Y	P	I	Q	Q	G	M	A	Q	N	C	S	K	D	V	S	L	V	A	E
tat	gtc	gat	aaa	att	gga	aag	aac	gga	act	gcc	aag	gag	cag	cag	gca	ctc	aag	gaa	ttg
Y	V	D	K	I	G	K	N	G	T	A	K	E	Q	Q	A	L	K	E	L
ttt	ggt	ctg	gga	gct	gtt	gag	cat	ttt	gat	gac	ttt	gcc	gct	gtc	ctc	ccc	aac	gga	ccg
F	G	L	G	A	V	E	H	F	D	D	F	A	A	V	L	P	N	G	P
tac	ctc	tgg	caa	gac	aac	gac	ttt	gcc	acg	gga	tac	tct	tcc	ttc	ttc	cag	ttc	tgt	gac
Y	L	W	Q	D	N	D	F	A	T	G	Y	S	S	F	F	Q	F	C	D
gcc	gtc	gag	ggt	gtc	gaa	gcg	ggc	gcg	gca	gta	acc	ccc	ggc	ccc	gag	ggt	gtc	ggc	ctc
A	V	E	G	V	E	A	G	A	A	V	T	P	G	P	E	G	V	G	L
gaa	aag	gcc	ctg	gcc	aac	tac	gca	aac	tgg	ttc	aat	tca	acc	att	ctc	cct	gat	tac	tgc
E	K	A	L	A	N	Y	A	N	W	F	N	S	T	I	L	P	D	Y	C
gca	agc	tac	ggc	tac	tgg	acc	gac	gaa	tgg	agc	gtc	gcc	tgc	ttc	gac	agc	tac	aac	gcc
A	S	Y	G	Y	W	T	D	E	W	S	V	A	C	F	D	S	Y	N	A
tct	agc	ccc	atc	tac	acc	gat	acc	tcc	gta	ggc	aat	gcg	gtc	gat	cgc	caa	tgg	gaa	tgg
S	S	P	I	Y	T	D	T	S	V	G	N	A	V	D	R	Q	W	E	W
ttc	ctc	tgc	aac	gag	cct	ttc	ttc	tac	tgg	cag	gac	ggt	gct	ccc	gag	ggc	acc	tcc	acc
F	L	C	N	E	P	F	F	Y	W	Q	D	G	A	P	E	G	T	S	T
att	gtg	ccc	cga	ctc	gtc	agc	gcg	tcc	tac	tgg	caa	cgg	caa	tgt	ccg	ctc	tac	ttc	ccc
I	V	P	R	L	V	S	A	S	Y	W	Q	R	Q	C	P	L	Y	F	P
gaa	acg	aac	ggc	tac	acg	tac	ggc	agc	gcg	aag	ggt	aag	aac	gcc	gcg	acg	gtg	aac	agc
E	T	N	G	Y	T	Y	G	S	A	K	G	K	N	A	A	T	V	N	S
tgg	acc	ggt	gga	tgg	gat	atg	acc	cgc	aac	acg	acg	cgg	ttg	atc	tgg	acg	aac	ggg	caa
W	T	G	G	W	D	M	T	R	N	T	T	R	L	I	W	T	N	G	Q
tat	gac	ccc	tgg	cgg	gac	tcc	ggt	gtg	tct	agc	act	ttc	cgg	ccc	ggt	gga	ccg	ctg	gcg
Y	D	P	W	R	D	S	G	V	S	S	T	F	R	P	G	G	P	L	A
agc	acg	gcg	aat	gaa	ccc	gtg	cag	att	atc	ccg	ggc	gga	ttc	cat	tgc	tcg	gat	ttg	tat
S	T	A	N	E	P	V	Q	I	I	P	G	G	F	H	C	S	D	L	Y
atg	gcg	gat	tat	tat	gcg	aat	gag	ggg	gtt	aaa	aag	gtg	gtg	gat	aat	gag	gtg	aag	cag
M	A	D	Y	Y	A	N	E	G	V	K	K	V	V	D	N	E	V	K	Q
atc	aaa	gag	tgg	gtg	gag	gag	tat	tat	gcc	cac	cac	cac	cac	cac	cac	cac	tga		
I	K	E	W	V	E	E	Y	Y	A	H	H	H	H	H	H	H	-		

Şekil 3.1. *A.niger*'e ait PEP proteinine optimize edilmiş nükleotid dizisi ve kodladığı aminoasid dizisi



Şekil 3.2. pET22b-Prolil endoproteaz vektörü ve *XbaI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleri ile kesimi

3.2.2. Prolil Endopeptidaz Enzimini Kodlayan Genin Çoğaltılması

Sentez ettirilen PEP genini taşıyan pET22b-PEP plazmidin çoğaltılma işlemi gerçekleştirilmiştir. *E. coli* DH5α hücreleri pET22b-PEP plazmidini ile ısı şoku uygulanarak transforme edilmiştir. pET22b-PEP plazmidini taşıyan *E. coli* DH5α hücreleri LB katı besiyerine ekim yapılarak 37°C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bir gece sonunda büyüyen hücrelerden 4 ml’lik LB sıvı besiyerlerine inoküle edilip 37°C’de bir gece büyütülmüştür (Sambrook ve ark., 1989). Büyüyen kültürlerden Biobasic Plazmid DNA saflaştırma kiti kullanılarak plazmid DNA saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Plazmid DNA Saflaştırılması

Transformasyon sonunda büyüyen hücrelerden 4 ml'lik LB sıvı besiyerlerine inoküle edilip 37°C'de bir gece büyütülmüştür (Sambrook ve ark., 1989). Büyüyen kültürlerden Biobasic Plazmid DNA saflaştırma kiti kullanılarak plazmid DNA saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Büyüyen hücreleri içeren kültürden 1.5 ml'lik tüplere aktararak, 2 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edilip sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
- 100 ul Solution 1 eklenerek vortekslenip 1 dakika bekletilmiştir.
- Karışım üzerine 200 ul Solution 2 eklenmiştir. Nazik bir şekilde 4-6 defa alt üst edilip, 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Karışıma 350 ul Solution 3 eklenerek nazikçe bir şekilde alt üst edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika boyunca bekletilmiştir.
- Daha sonra 12 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Sıvı kısım EZ-10 spin kolona aktararak 2 dakika 10 000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
- Alt kısımda toplanan sıvı atılmıştır. Kolona üzerine 750 ul 'Wash Solution, yıkama çözeltisi' eklenerek 2 dakika 10 000 rpm'de santrifüjlenmiş ve altta biriken sıvı atılıp, kolon aynı tüpe tekrar yerleştirilmiştir.
- Kolona 750 ul 'Wash Solution' eklenip, 2 dakika 10 000 rpm'de santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Tüpün alt kısmında biriken sıvı atılıp, Wash Solution'ın kolonda kalan miktarını uzaklaştırmak için 1 dakika daha santrifüj işlemi yapılmıştır.
- Kolon yeni 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip, kolonunu merkezine 50 ul saf su eklenmiş, 50°C'de 2 dakika bekletilmiştir.
- 10 000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj uygulanmış ve plazmid DNA saflaştırma işlemi tamamlanmıştır.

3.2.4. Şaperon Proteinlerin Gen Dizisini İçeren Plazmidlerin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması

Tez çalışmasında kullanılması planlanan şaperon proteinleri ifade eden genleri içeren plazmid sistemleri ticari olarak elde edilmiştir. Plazmidler kompetent *E. coli* DH5 α hücrelerine transfer edilmiştir. Transformasyon için kullanılacak hücreler pipes'li kompetent hücre hazırlama prosedürüne göre hazırlanarak kompetent hale getirilmiştir. Transformasyon işleminden sonra antibiyotikli seçici katı besiyerinde büyüyen koloniler antibiyotik içeren 4 ml'lik sıvı besiyerine inoküle edilip bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında 4 ml besiyerinde çoğalan hücrelerden plazmidler plazmid DNA izolasyon kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

FSB'li kompetent hücre hazırlama

- 50 ml steril LB (Luria Bertani) besiyeri bulunan erlenlere bir gece bekletilen kültürden birer ml eklenip 37°C, 250 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Optik dansite 600 nm 'de absorbans yaklaşık 0.6 olduğunda erlenler inkübatörden alınıp +4°C 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine 50 ml soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisi eklenmiştir. Pelet tamamen çözünene kadar vortekslenmiştir. Sonrasında 1 saat buz banyosunda bekletilmiştir.
- 1 saat sonra +4°C 4 000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine 8 ml FSB çözeltisi eklenip tüpe vurularak çözünmesi sağlanmıştır.
- Pelet tamamen çözününce üzerine 560 ul DMSO eklenip 3 saat buza gömülmüştür. 3 saatin ardından kompetent hücre hazır hale gelmiştir.

3.2.5. Transformasyon

- Kompetent hücreden 200 µl alınıp üzerine 2 µl pET22b-PEP plazmidi eklenmiştir.

Karışım 1 saat buzun içinde bekletilmiştir.

- 2 dakika süre ile 42°C’de ısı şoku uygulanmıştır.
- Isı şokunun ardından karışım tekrar buz içinde 5 dakika bekletilmiştir.
- Her bir mikrotüp antibiyotikli besiyerlerine yayma ekim ile ekilerek 37°C’de bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.6. Şaperon Proteinlerin Gen Dizisini İçeren Plazmidlerin *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Transferi

Şaperon proteinlerin gen dizisini içeren plazmidler (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) ve PEP enzimine ait geni taşıyan pET22b plazmidi kullanılarak kompetent *E. coli* BL21(DE3) hücreleri ısı şoku ile transforme edilmiştir.

3.2.7. PEP Enziminin Şaperon Plazmid Sistemleriyle Birlikte Ekspresyonu

Transformasyon işleminden sonra antibiyotikli katı besiyerinde büyüyen koloniler antibiyotik içeren 4 ml’lik sıvı besiyerine inoküle edilip bir gece 37°C’de inkübe edilmiştir. Ardından 50 ml’lik antibiyotikli besiyerine L-arabinoz ve tetrasiklin eklenip kültürler 37°C 240 rpm’de inkübe edilmiştir. Sonrasında belirli aralıklarla kültürden örnekler alınarak spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçümler yapıp OD₆₀₀:0.6 olduğunda IPTG ile indüklenip kültürler 3-4 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. İndüksiyon öncesi ve sonrası kültürden örnekler alınıp SDS-PAGE’de enzimin üretilip üretilmediğinin analizi yapılmıştır.

3.2.8. *E. coli* BL21 (DE3) Hücrelerinin Parçalanması

Üretici olduğu tespit edilen hücreler 600 ml'lik besiyerinde kültüre edilip indüklenmenin ardından 3-4 saat sonra santrifüj işlemi ile toplanmıştır. İndükleme sonrası -20°C'de stoklanan hücreler parçalama işleminden önce çıkarılarak bir süre buzda bekletilmiştir. Yükleme tamponu (pH:8) eklenerek hücreler süspanse hale getirilmiştir. Süspanse haldeki hücrelerin üzerine 100 mM, 50 µl PMSF ve benzamidin ilave edilmiştir. Lizozim eklendikten sonra hücreler buz üzerine yerleştirilmiştir. Hücrelerin soğuk kalmasına özen gösterilerek 1 saat süre ile sonikasyon işlemi yapılmıştır. Parçalama işleminden sonra parçalanmayan hücreler 6 000 rpm' de 10 dakika santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant kısım 30 000 rpm, +4°C değerlerinde 1 saat santrifüjlenmiştir. Böylece hidrofobik diğer proteinler ve çözünmeyen hidrofobik hücre materyalleri ortamdan uzaklaştırılmıştır.

3.2.9. PEP Enziminin Saflaştırılması

PEP enziminin saflaştırılmasında afinite kromatografisi yöntemi uygulanmıştır. Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi olarak Ni-NTA agaroz rezin kullanılmıştır. Kolondan elüsyon elde etmek için ise imidazol içeren elüsyon tamponu kullanılmıştır. Kolona 500 µl Ni-NTA agaroz rezin eklenip kolon yükleme tamponuyla yıkanmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kolona yüklenmiş ve kolondan gelen fraksiyonlar toplanmıştır. Protein yüklenmiş olan kolon yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Böylece kolonda tutunmuş olan diğer proteinler uzaklaştırılıp olup ardından kolon elüsyon tamponu ile tekrar yıkanmıştır. Kolona tutunmuş olan protein üç fraksiyon şeklinde elüe edilmiştir (Laemmli, 1970).

3.2.10. SDS-PAGE Analizi

Kolondan elüe edilen her fraksiyondan yüzer µl'lik örnekler alınıp üzerine yüzer µl SDS sample buffer eklenmiştir. Elüsyonlar 100°C'de 5 dakika kaynatılıp önceden hazırlanan SDS-PAGE jeline yirmişer µl yüklenmiştir. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra jel boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.11. Diyaliz

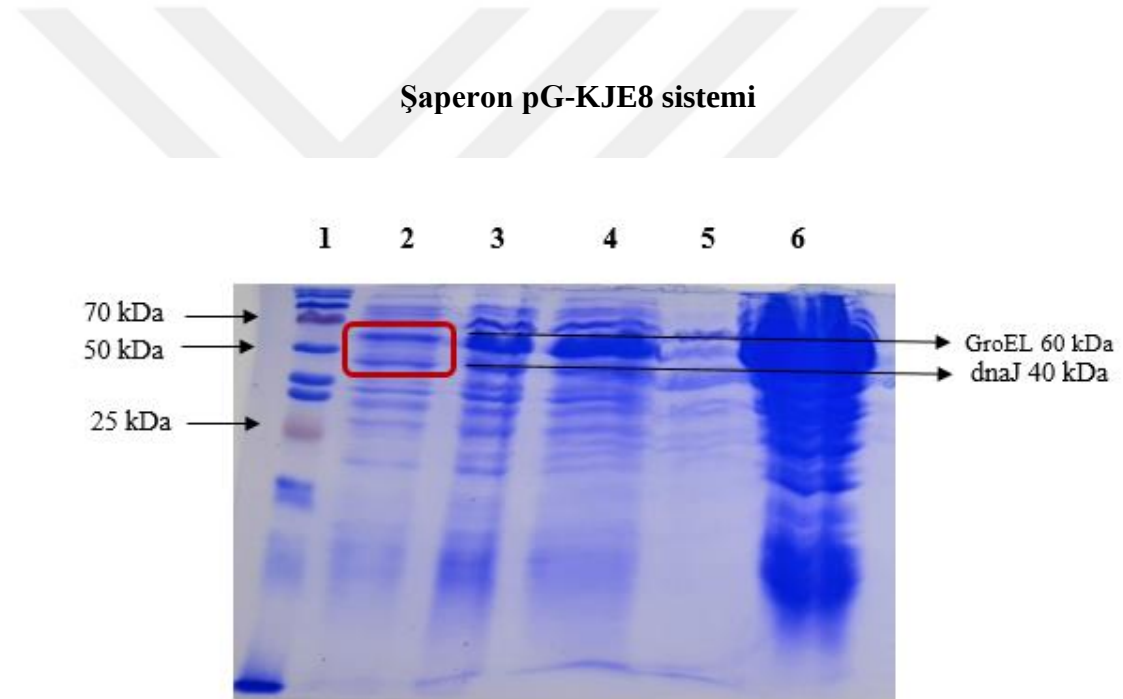
Diyaliz hedef proteinin afinite kromatografisi aşamasında kullanılan tampon çözeltiler içerisinde bulunan küçük moleküllerin (imidazol ve tuz gibi) uzaklaştırılması için uygulanan bir yöntemdir. Tuz ve diğer küçük moleküller yarı geçirgen bir zar aracılığıyla hedef proteinin bulunduğu çözeltiden uzaklaştırılmaktadır. Elüe edilen protein çözeltisi diyaliz torbasına konur ve hazırlanan diyaliz tamponu içerisine koyulur. Diyaliz torbasının porlarından daha küçük yapıda olan moleküller difüzyon esasına göre diyaliz çözeltisine diyaliz çözeltisine geçerken daha büyük yapıdaki moleküller torba içerisinde kalmaktadır (Hessa ve ark., 2012).

Diyaliz çözeltisi, 100 mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, 300 mM, NaCl pH: 7.6 olacak şekilde 1 litre distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Afinite kromatografisinden elde edilen saf Prolil endopeptidaz elüsyonlarından 1 ml diyaliz torbasına eklenmiş ve 16 saat diyalize bırakılmıştır.

4. BULGULAR

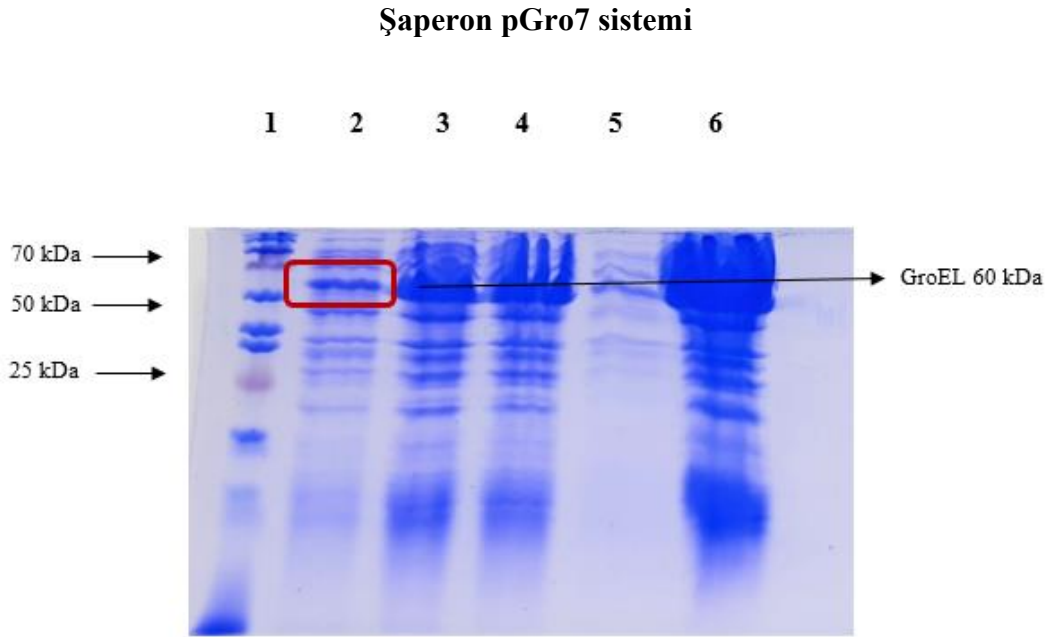
4.1.Rekombinant PEP Enziminin Şaperon Sistemleri ile Birlikte Üretilip Üretilmediklerinin SDS-PAGE Analizi ile Belirlenmesi

Şaperon sistemlerinin 50 ml’lik küçük ölçekli üretim sonucunda elde edilen örneklerinin SDS-PAGE analizi aşağıda gösterilmiştir. Şekil 4.1’de şaperon sistemlerinden biri olan pG-KJE8 sisteminin 50 ml’lik küçük ölçekli üretim sonucunda dnaJ ve GroEL şaperonlarını ürettiği gözlenmiştir. Şaperon pG-KJE8 sisteminde PEP enziminin var olduğu ancak çözünür formda üretilmediği ve pelette kaldığı görülmüştür.



Şekil 4.1. PEP proteinin pG-KJE8 şaperon plazmidlerle koekspresyonunun %12’lik SDS-PAGE’de analizi. 1. Protein marker (Dual- Color prestained protein ladder), 2. 3. 4. 5. 6. Kuyucuklar sırasıyla pG-KJE8 ve pET22b-PEP plazmidini taşıyan *E. coli BL21 (DE3)* hücrelerinin 2. IPTG ile indüklemeye öncesi hücre lizatı, 3. IPTG ile indüklemeye sonrası hücre lizatı, 4. Sonikasyon işlemi sonrası hücre lizatı, 5. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği 6. Santrifüj işlemi sonrası pelet örneği

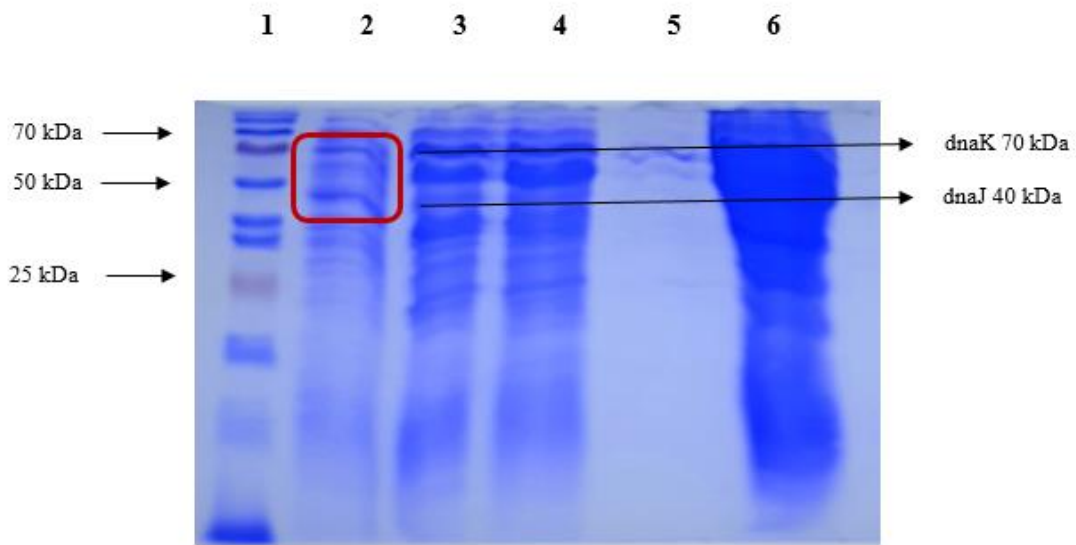
Şaperon pGro7 sisteminin 50 ml'lik küçük ölçekli üretimi sonucunda 60 kDa büyüklüğündeki GroEL şaperonunu ürettiği ancak PEP enziminin pelette kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. PEP proteinin pGro7 şaperon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. Protein marker (Dual- Color prestained protein ladder), 2. 3. 4. 5. 6. Kuyucuklar sırasıyla pGro7 ve pET22b-PEP plazmidini taşıyan *E. coli BL21 (DE3)* hücrelerinin 2. IPTG ile indükleme öncesi hücre lizatı, 3. IPTG ile indükleme sonrası hücre lizatı, 4. Sonikasyon işlemi sonrası hücre lizatı, 5. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği 6. Santrifüj işlemi sonrası pelet örneği

Plazmid sistemlerinden biri olan şaperon pKJE7 sisteminin 50 ml’lik küçük ölçekli üretimi gerçekleştirildikten sonra alınan örnekler SDS-PAGE görüntüsünde analiz edilmiştir. Analiz sonucunda görülen bantlar dnaJ, dnaK şaperonlarının üretildiğini göstermiştir. Ancak bantlar incelendiğinde PEP enziminin çözünür formda üretilmediği ve pelette var olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.).

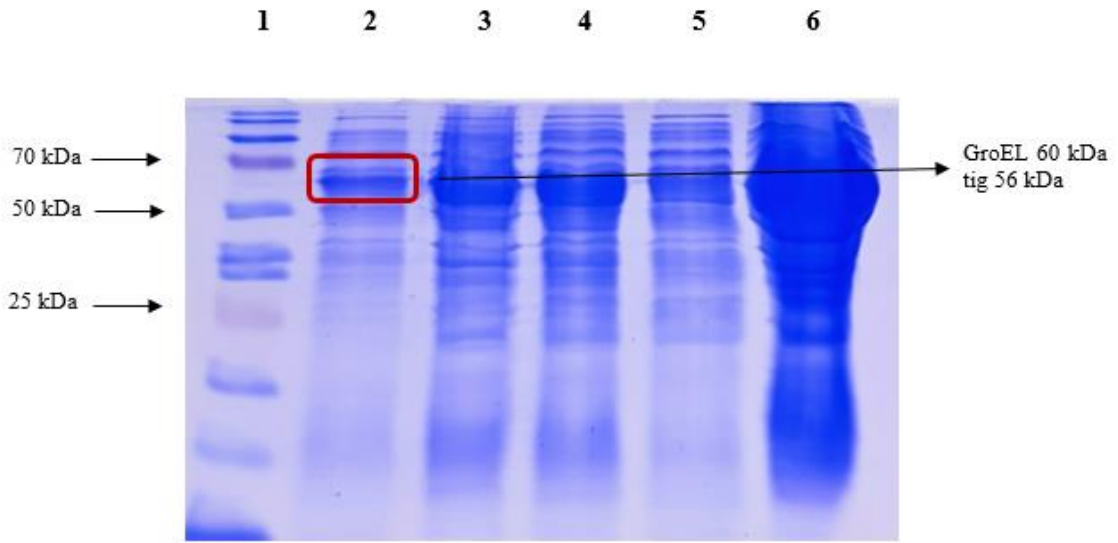
Şaperon pKJE7 sistemi



Şekil 4.3. PEP proteinin pKJE7 şaperon plazmidlerle koekspresyonunun %12’lik SDS-PAGE’de analizi. 1. Protein marker (Dual- Color prestained protein ladder), 2. 3. 4. 5. 6. Kuyucuklar sırasıyla pKJE7 ve pET22b-PEP plazmidini taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin 2. IPTG ile indükleme öncesi hücre lizatı, 3. IPTG ile indükleme sonrası hücre lizatı, 4. Sonikasyon işlemi sonrası hücre lizatı, 5. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği 6. Santrifüj işlemi sonrası pelet örneği

Şaperon pG-Tf2 sisteminin SDS-PAGE görüntüsü incelendiğinde GroEL ve tig şaperonunu içerdiği gözlenmiştir. PEP enziminin pelette kaldığı ve çözünür formda olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.4.).

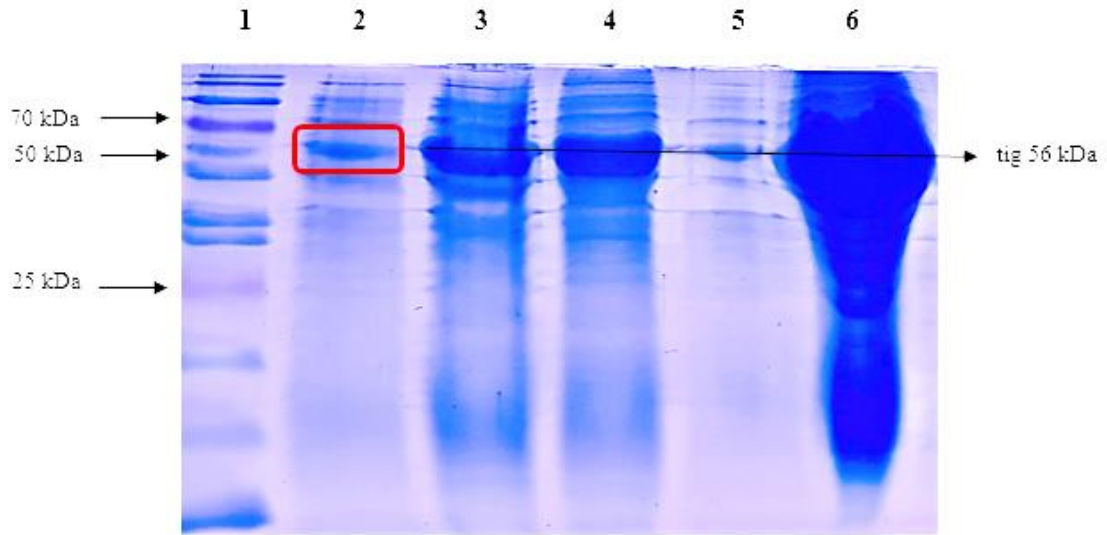
Şaperon pG-Tf2 sistemi



Şekil 4.4. PEP proteinin pG-Tf2 şaperon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. Protein marker (Dual- Color prestained protein ladder), 2. 3. 4. 5. 6. Kuyucuklar sırasıyla pG-Tf2 ve pET22b-PEP plazmidini taşıyan *E. coli BL21 (DE3)* hücrelerinin 2. IPTG ile indüklemeye öncesi hücre lizatı, 3. IPTG ile indüklemeye sonrası hücre lizatı, 4. Sonikasyon işlemi sonrası hücre lizatı, 5. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği 6. Santrifüj işlemi sonrası pelet örneği

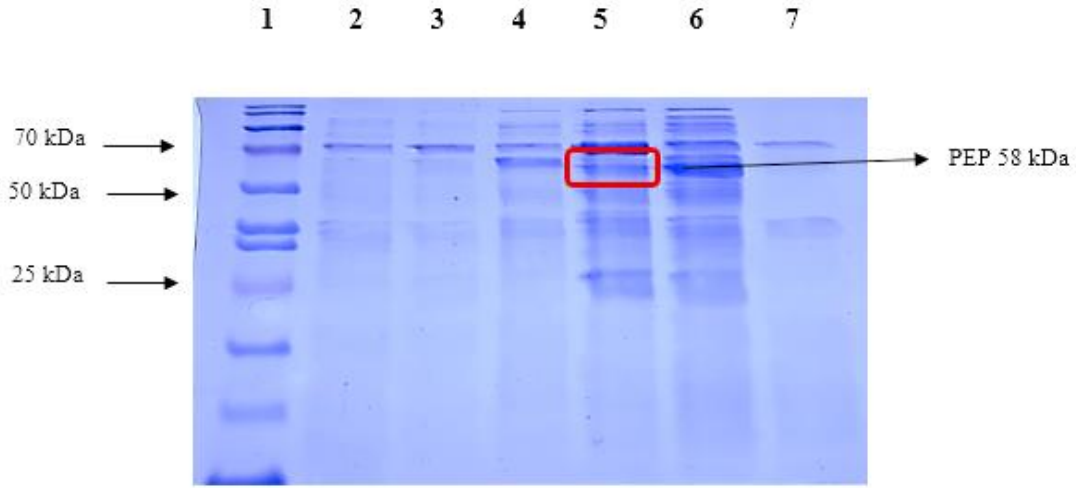
Şekil 4.5’de şaperon pTf16 sisteminin 50 ml’lik küçük ölçekli üretimi sonucunda SDS-PAGE görüntüsünde oluşan bantlarda sadece tig şaperonunu ürettiği sonucuna varılmıştır. Üretilmek istenen PEP enzimine ait proteininin ise pelette olduğu gözlenmiştir.

Şaperon pTf16 sistemi



Şekil 4.5. PEP proteinin pTf16 şaperon plazmidlerle koekspresyonunun %12’lik SDS-PAGE’de analizi. 1. Protein marker (Dual- Color prestained protein ladder), 2. 3. 4. 5. 6. Kuyucuklar sırasıyla pTf16 ve pET22b-PEP plazmidini taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin 2. IPTG ile indükleme öncesi hücre lizatı, 3. IPTG ile indükleme sonrası hücre lizatı, 4. Sonikasyon işlemi sonrası hücre lizatı, 5. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği 6. Santrifüj işlemi sonrası pelet örneği

Şaperon sistemlerinin 50 ml’lik küçük ölçekli üretim sonucunda elde edilen süpernatant örneklerinin SDS-PAGE analizi aşağıda gösterilmiştir. Bu jel görüntüsünde şaperon pKJE7 sisteminin PEP enziminin büyüklüğünde bantları oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. PEP proteinin şaperon plazmidlerle koekspresyonunun %12’lik SDS-PAGE’de analizi. 1. Protein marker (Dual- Color prestained protein ladder), 2. 3. 4. 5. 6. 7. Kuyucuklar sırasıyla şaperon plazmidleri ve pET22b-PEP plazmidini taşıyan *E. coli* BL21 (*DE3*) hücrelerinin 2. PEP enzimi santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği, 3. pG-KJE8 plazmidini santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği, 4. pGro7 plazmidini santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği, 5. pKJE7 plazmidini santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği, 6. pG-Tf2 plazmidini santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği, 7. pTf16 plazmidini santrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği

4.2. Rekombinant Üretimi Gözlenen Şaperon pKJE7 Sisteminin Üretilmesi

Yapılan SDS PAGE analizi sonucunda tez çalışmasında kullanılan beş şaperon plazmid sistemi içerisinde şaperon pKJE7 sisteminin PEP enzimini ürettiği gözlemlenmiştir. Üretici olduğu tespit edilen şaperon pKJE7 plazmidini 4 ml’lik LB antibiyotikli tüplere inoküle edilip 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Büyüyen hücrelerden 6 ml alınmış ve 600 ul L-arabinoz 600 ml’lik besiyerine aktarılmıştır. OD₆₀₀: 0.6 olduğunda IPTG ilave edilip indüklenmiştir. İndükleme işlemi yaklaşık 3 saat boyunca devam

etmiştir. İndükleme sonrası hücreler santrifüj edilerek toplanmış ve -20°C 'de saklanmıştır.

4.3. Şaperon pKJE7 Sisteminin Saflaştırılması

İndükleme sonrası -20°C'de saklanan hücreler çıkarılıp buz içerisinde soğuk olması sağlanarak sonikatör cihazı ile parçalama işlemine tabi tutulmuştur. Parçalanmış hücreler 30 000 rpm'de +4°C'de 1 saat santrifüjlenerek hidrofobik hücre materyallerinin çöktürülmesi sağlanmıştır. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant ve pelet kısımlarından örnekler alınıp SDS-PAGE analizi için başlık 3.2.10'de anlatıldığı gibi örnekler hazırlanmıştır. Süpernatanta afinite kromatografisi yöntemi uygulanmıştır. Afinite kromatografisinde kolon dolgu maddesi Ni-NTA agaroz rezindir. Şaperon pKJE7 plazmidi kolondan imidazollü elüsyon tamponu kullanılarak alınmıştır. Elde edilen elüsyon örneklerin SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda elde edilen 9 ve 10 numaralı elüsyon örneklerinin PEP enziminin büyüklüğünde bantlar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7.).

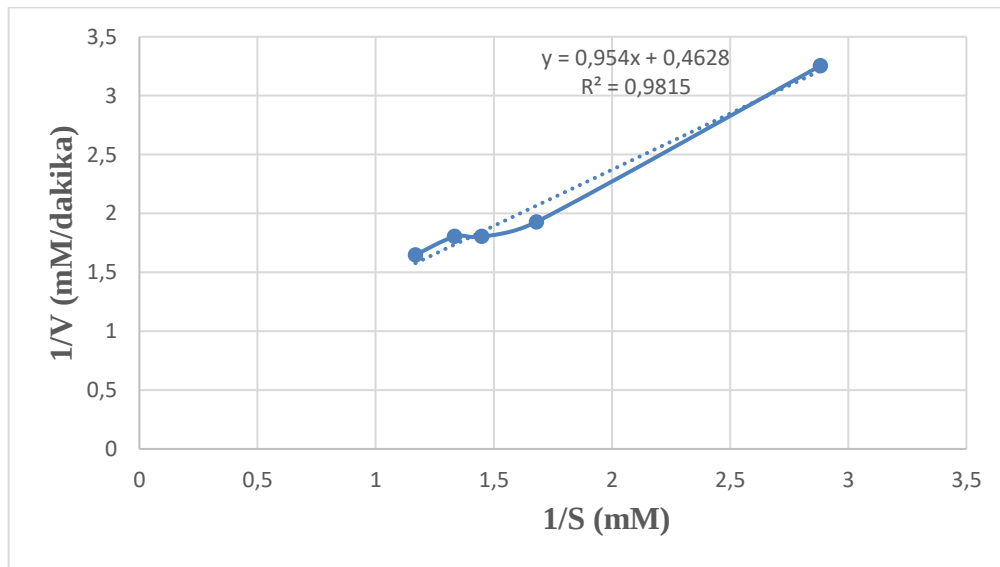


Şekil 4.7. PEP proteinin şaperon plazmidlerle koekspresyonunun %12'lik SDS-PAGE'de analizi. 1. Protein marker (Dual- Color prestained protein ladder), 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9.10. Kuyucuklar sırasıyla pKJE7 ve pET22b-PEP plazmidini taşıyan *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinin 2. IPTG ile indükleme öncesi hücre lizatı, 3. IPTG ile indükleme sonrası hücre lizatı, 4. Sonikasyon işlemi sonrası hücre lizatı, 5. Ultrasantrifüj işlemi sonrası süpernatant örneği 6. Ultrasantrifüj işlemi sonrası pelet örneği, 7. Load örneği, 8. Wash örneği, 9,10. Elüsyon örnekleri

4.4. Prolil Endopeptidaz Enziminin Aktivite Tayini

4.4.1. Spektrofotometrik Analiz

Protein miktarı spektrofotometrik olarak 410 nm’de tespit edilebilen nitroanilini serbest bırakılan sentetik kromojenik peptit substrat (Z-Gly-Pro-pNA) kullanılmıştır. Z-Gly-Pro-pNA substratı 5 mM’lik bir çözelti hazırlamak için 60°C’de 1,4-dioksan (% 40) içerisinde çözündürülmüştür. Standart reaksiyon karışımı için 1000 µl 0.1 M sitrat / disodyum fosfat tamponu (pH:6), 100 µl saflaştırılmış enzim ve 250 µl 5 mM Z-Gly- Pro-pNA kullanılmıştır (Edens ve ark., 2005). Km ve Vmax değerlerinin bulunması için Michaelis- Menten grafikleri kullanılmıştır. Bu amaçla substrat konsantrasyonları (20 ul, 25 ul, 30 ul, 35 ul, 40 ul) kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Daha sonra 1/V ye karşı ve 1/S grafikleri çizilip bu grafiklerden Km ve Vmax değerleri bulunmuştur (Şekil 4.8.). Bütün kinetik çalışmalar 30°C ve pH:6 tamponu kullanılarak yapılmıştır (Şenol, 2020). Yapılan hesaplamalar sonucu saniye cinsinden sırasıyla Vmax ve Km değerleri 0.0359 mM/s ve 2.06 mM bulunmuştur. Dakika cinsinden hesaplandığında Vmax ve Km değerleri sırasıyla 2.16 U/mg ve 2,06 mM bulunmuştur. Bu aktivite testi sonucunda 1 litre bakteriyel kültürden 0.5 mg/ml konsantrasyonunda toplamda 2.68 mg protein üretilmiş ve prolil endoproteaz enziminin aktif olduğu gözlenmiştir (Shetty ve ark., 2017).



Şekil 4.8. Farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak PEP enzimi için çizilen Michaelis-Menten grafiği

Prolil endopeptidaz enzim aktiviteleri Edens ve arkadaşlarının (2005), yaptığı çalışmada 410 nm’de tespit edilebilen nitroanilini serbest bırakılan sentetik kromojenik peptit substrat (Z-Gly-Pro-pNA) kullanılmıştır. Z-Gly-Pro-pNA substratı 5 mM’lik bir çözelti hazırlamak için 60°C’de 1,4-dioksan (%40) içerisinde çözündürülmüştür. Standart reaksiyon karışımı için 1000 µl 0.1 M sitrat/disodyum fosfat tamponu (pH:6), 100 µl saflaştırılmış enzim ve 250 µl 5 mM Z-Gly-Pro-pNA bulunmuştur. Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi için Z-Gly-Pro-pNA konsantrasyonu 1 ila 10 Mm arasında değişmesi dışında standart reaksiyon karışımı ve koşulları kullanılmıştır. Bir prolil endopeptidaz aktivitesi tahlil koşulları altında dakikada 1 umol p-nitroanilidin salınımı olarak tanımlanmıştır (Shetty ve ark., 2017).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

E. coli'de rekombinant protein ekspresyonu sıklıkla inklüzyon cisimcikleri olarak adlandırılan çözünmeyen agregat oluşumuna neden olmaktadır. Rekombinant proteini geri kazanmak için yeniden katlama teknikleri uygulanabilir ancak hedefin biyolojik aktivitesi bu işlem sırasında sıklıkla kaybolabilmektedir. Bu sorunu çözmek için birkaç yaklaşım olsa da şaperon ile birlikte ekspresyon iyi bir seçenek olabilmektedir. Şaperonlar yeni sentezlenmiş proteinlerin kendi doğal hallerine katlanmasına yardımcı olurken doğal olmayan proteinlerin açığa çıkmasını önlemek için meydana gelen hidrofobik oluşumlardan da koruyabilmektedir (Anonim C, 2019).

Şaperonlar, protein katlanmasına yardımcı olmak ve hücrel proteinleri, protein agregasyonunu baskılayarak farklı çevresel stres türlerinden korumak için kilit rol oynayan bir grup proteindir. Örneğin, *E. coli* şaperon GroEL normal büyüme koşullarında ve % 30'unun stres koşullarında yeni sentezlenen proteinlerin in vivo katlanmasında rol oynamaktadır. GroEL, toplanmaya eğilimli katlama ara maddelerinin ilk yakalama basamağıyla protein katlanmasına yardımcı olmaktadır. Doğal şaperonlar çeşitli proteinleri yeniden katlamak için başarıyla uygulanmıştır (Vallejo ve Rinas, 2004). Bu çalışmada pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16 olmak üzere toplam beş şaperon plazmid sistemi kullanılmıştır. Bu sistemler PEP enzimi ile birlikte üretildiğinde şaperon pKJE7 sisteminin beklenen büyüklükte PEP enziminin üretilmesini sağladığı sonucuna varılmıştır.

Son zamanlarda, şaperonların katlama sırasında oluşan agregatlardan yeniden katlanarak rekombinant proteinlerin verimini artırabildiği bildirilmiştir. Sonuçlar şaperonların hedef proteinlerden sonra eksprese edildiğinde de faydalı olabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar verim için en uygun zamanı seçerek şaperon etkisini en üst seviyeye çıkarma konusunda araştırmalara yöneltmiştir. Tasarlanmış *E. coli* suşları ve burada sunulan iki aşamalı prosedür, çeşitli rekombinant proteinlerin çözünürlüğünde kayda değer bir artışa yol açmıştır ve biyoteknolojide üretilen çok çeşitli hedef proteinlere uygulanmalıdır. Bu sonuçlar şaperonların aşırı üretilmesinin sadece test edilen rekombinant proteinlerin

çözünürlüğünün artırılmasıyla sınırlanmadığını ayrıca doğal durumun kazanımını da arttırdığını göstermektedir (Marco ve ark., 2007).

Jhamb ve Sahoo (2012), yapılan bu çalışmada GroEL / GroES veya DnaK'nın birlikte aşırı üretilmesinin istenilen proteinin de in vivo katlanmasını teşvik ederek rekombinant proteinlerin çözünürlüğünü çeşitli şekillerde arttırdığını göstermiştir (Şekil 2.5.). Bu nedenle ksilanazın katlama işlemini bir model protein olarak optimize etmek için moleküler şaperonları kullanmak iyi bir strateji olmuştur (Jhamb ve Sahoo, 2012). Yapılan çalışmaların sonucunda PEP enziminin rekombinant üretimi sırasında meydana gelen inklüzyon cisimciklerinin oluşumunu olabildiğince azaltmak ve enzimin verimini yükseltmek için şaperon plazmid sistemlerini kullanmanın iyi bir tercih olduğu görülmüştür.

Shetty ve arkadaşları (2017), yapılan bu çalışmada proline özgü PEP aktivitesine sahip bir geni kodlayan *Sphaerobacter termofiller*'den 2064 bp'den oluşan açık bir okuma sekansını ortaya koymuştur. *Escherichia coli*'de eksprese edildiğinde geniş bir pH stabilitesi ve yüksek sıcaklık aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Enzim test ettiğimiz çölyak aktif peptitleri dahil prolin atıklarını da parçalar. Böyle bir aktiviteye sahip olduğu onaylanan birkaç PEP enziminden biridir

Çölyak hastalığına, buğday gluteninin sindirim ürünlerine karşı bağışıklık tepkisi neden olmaktadır. Gluten yüksek prolin içeriği nedeniyle tam olarak sindirilemez. Duyarlı kişilerde bazı gluten peptidleri bir T hücresi tepkisini tetikleyerek ince bağırsakta iltihaplanmaya neden olmaktadır. Hollanda'daki araştırma grubu çölyak hastalığı için potansiyel bir tedavi olarak *Aspergillus niger*'den (AN-PEP) yeni keşfedilen bir prolil endoproteazı değerlendirmişlerdir. AN-PEP'in pepsin direnci, yüksek katalitik oran bozulmamış glutene karşı aktivite ve immün uyarıcı peptidlere karşı etkinliği onu çölyak hastalığının tedavisinde oral AN-PEP desteğini değerlendirmek için klinik deneyler adına umut verici bir aday haline gelmiştir (Stepniak, 2006).

Çoğu proteinaz ve peptidaz prolin atıklarında proteinleri parçalama yeteneğine sahip değildir (Walter ve ark., 1980). Daha önce diğer mikrobiyal veya memeli kaynaklarında rapor edilen PEP aktivitelerinin aksine, AN-PEP büyük protein moleküllerini hidroliz etme yeteneğine sahiptir (Edens ve ark., 2005). Bu nedenle PEP başka bir geniş spesifisite proteinaz aktivitesine sahip bir ön hidroliz aşamasına gerek olmadan sağlam proteinleri hidroliz etmek için kullanılabilirken AN-PEP'in geniş bir pH aralığında (pH 2-8) aktif olduğu, 4.3-4.5'lik bir optimal pH'a ve 50-55°C'lik bir optimum sıcaklığa sahip olduğu bildirilmiştir (Edens ve ark., 2009). Bir PEP'in temel olarak parçaladığı kısım prolin ve hidroksi prolinin C-terminal tarafındadır ancak Ala kalıntılarını da parçaladığı ifade edilmiştir (Edens ve ark., 2005).

Yaptığımız bu çalışmada ekspresyon sistemi olarak prokaryot *E. coli* ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Prokaryotik rekombinant ekspresyon sistemleri, kolaylıkla kültür edilebilir, hızlı hücre üremesi sağlar ve basit saflaştırma yöntemlerine uygundur. Bu gibi avantajlarından dolayı tercih edilmektedirler (Chen, 2012). Fakat bu sistemler translasyon sonrası bazı modifikasyonları gerçekleştirmede yetersizdir. Bazen de üretilen proteinlerin birçoğu çözünmeyen inklüzyon cisimciği haline gelmektedir. Sonuç olarak bu şekilde işlevsel aktif bir protein elde etmek zorlaşmaktadır (Miroux ve ark., 1996). Bu inklüzyon cisimciklerinin oluşumunu azaltıp daha verimli ve çözünür formda ürün elde etmek için günümüzde şaperon plazmid sistemleri tercih edilmektedir (Aydın, 2017).

Yapılan bu tez çalışmasında şaperon plazmid sistemlerinden beş tanesi kullanılarak PEP enziminin rekombinant üretimi sırasında istenilen verimin elde edilmesi için bazı deneyler yapılmıştır. Bu şaperon sistemlerinin öncelikle 50 ml'lik küçük ölçekli üretimi yapılarak hangisinin PEP enzimini ürettiği anlaşılmaya çalışılmıştır. Üretim sonucunda kullanılan bu beş şaperon sistemlerinden (pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pG-Tf2, pTf16) yalnızca pKJE7 sisteminin PEP enziminin büyüklüğünde bantlar oluşturduğu gözlenmiştir. Bundan yola çıkılarak daha büyük ölçekli üretim yapılarak aktivite tayini için testler uygulanmıştır. PEP enziminin aktivite çalışmaları spektrofotometrik analiz tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aktivite testi için değişen substrat konsantrasyonlarında ve pH:6 tamponu kullanılarak yapılmıştır (Şenol, 2020). Substrat

miktarları; 5 mM Z-Gly-Pro-pNA substrat tan 20 μ l, 25 μ l, 30 μ l, 35 μ l ve 40 μ l olacak şekilde değişen substrat miktarları kullanılmıştır. Km ve Vmax değerlerinin bulunması için Michaelis-Menten grafikleri kullanılmıştır. Daha sonra 1/V ye karşı ve 1/S grafikleri çizilip bu grafiklerden Km ve Vmax değerleri bulunmuştur (Şekil 4.8.). Yapılan hesaplamalar sonucu saniye cinsinden sırasıyla Vmax ve Km değerleri 0.0359 mM/s ve 2.06 mM bulunmuştur. Dakika cinsinden hesaplandığında Vmax ve Km değerleri sırasıyla 2.16 U/mg ve 2.06 mM bulunmuştur.

Yapılan spektrofotometrik analiz çalışmaları sonucunda üretilen PEP enziminin öngörüldüğü şekilde tez çalışmasında kullanılan şaperon plazmid sistemlerinden biri olan pKJE7 sisteminde 1 litre bakteriyal kültürden 0.5 mg/ml konsantrasyonunda toplamda 2.68 mg protein elde edilmiş ve proteinin aktif olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlardan rekombinant protein saflaştırma sürecinde meydana gelen aktif olmayan proteinlerin oluşumuna neden olan inklüzyon cisimciklerin oluşumunu azaltıp daha verimli protein elde etmek amacıyla şaperon plazmid sistemleri avantajlı bir seçenek olarak görülebilir.

6. KAYNAKLAR

- Altıntaş, L., Enver, H., Tutun, H., 2017. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Veteriner İlaç Geliştirme Kullanımı. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Dergisi, 5(2): 193-204.
- Alonso, M., Fruitós, E., Miralles, N., Rinas, U., Villaverde, A., 2010. Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein Production. Martínez-Alonso et al. Microbial Cell Factories 2010, 9:64.
- Amrein, K.E., Takacsi, B., Stiegeri, M., Molnos, J., Flint, N.A., Burn, P., 1995. Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 92, pp. 1048-1052.
- AnonimA, 2019. https://proteopedia.org/wiki/index.php/Prolyl_Endopeptidase, (10.11.2019).
- AnonimB, 2019. <https://info.gbiosciences.com/blog/use-of-chaperones-in-recombinant-protein-expression>, (10.11.2019).
- AnonimC, 2019. <https://www.genscript.com/protein-production.html>, (10.11.2019).
- AnonimD, 2020. <https://www.takarabio.com/products/protein-research/expression-vectors-and-systems/protein-folding-kits/chaperone-plasmid-set>, (20.05.2020).
- AnonimE, 2020. <https://www.uniprot.org/uniprot/P48147>, (28.11.2020).
- AnonimF, 2020. Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 2014, (28.11.2020).
- Arya, R., Sabir, J.S.M., Bora, R.S., Saini, K.S., 2015. Optimization of culture parameters and novel strategies to improve protein solubility. Methods in Molecular Biology series, Vol. 1258, Chapter 3. Pages 45-63.
- Aydın, H., 2017. Tth Polimeraz Enziminin TİBbi Moleküler Tanı Kitlerinde Kullanım Amaçlı Rekombinant Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü/ Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- Betiku, E., 2006. Molecular chaperones involved in heterologous protein folding in *Escherichia coli*. Biotechnol. Mol. Biol., 1: 66-75.
- Carrio, M.M., Villaverde, A., 2002. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. Journal of Biotechnology, 96 (2002) 3–12.
- Chen, R., 2012. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. Biotechnology Advances, Volume 30, 1102-1107.

- Cui, S.S., Lin, X.Z., Shen, J.H., 2011. Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948. *Protein Expr. Purif.*, 77: 166-172.
- de Marco, A., 2007. Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat. Protoc.*, 2: 2632-2639.
- Dumitru, G.L., Groemping, Y., Klostermeier, D., Restle, T., Deuerling, E., Reinstein, J., 2004. DnaK cycles between the DnaK chaperone system and translational machinery. *J. Mol. Biol.*, (2004) 339,1179-1189.
- Edens, L., Dekker, P., Van Der Hoeven, R., Deen, F., De Roos, A., Floris, R., 2005. Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, (2005) 53:7950-7957.
- Folwarczna, J., Moravec, T., Plchova, H., Hoffmeisterova, H., Cerovska, N., 2012. Efficient expression of human papillomavirus 16 E7 oncoprotein fused to C-terminus of tobacco mosaic virus (TMV) coat protein using molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 85: 152-157.
- Gass, J., Khosla, C., 2006. Prolyl endopeptidases, *Cell. Mol. Life Sci.*, 64 (2007) 345–355.
- Guzzo, J., 2012. Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 44: 1698-1705.
- Hannig, G., Makrides, S.C., 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *TIBtech* February, 1998 Vol 16.
- Hartl, F.U., Hartl, H., Manajit., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science*; Washington Vol:295, 1852-8.
- Hessa, T., Sharma, A., Mariappan, M., Eshleman, H.D., Gutierrez, E., Hedge, R.S., 2012. Protein Targeting and Degradation are Coupled for Elimination of Mislocalized Proteins. *Nature*, 475(7356): 394–397.
- Hu, X., O'Hara, L., White, S., Magner, E., Kane, M., Wall, J.G., 2007. Optimisation of production of adomoic acid- binding scFv antiBody fragment in *Escherichia coli* using molecular chaperones and functional immobilisation on a mesoporous silicate support. *Protein expression and purification*, 52 (2007) 194-201.
- Jhamb, K., Sahoo, D., 2012. Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: Effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase. *Bioresource Technology* Volume 123 (2012), Pages 135-143.
- Kang, C., Yu, X., Xu, Y., 2014. Cloning and expression of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus oryzae* and its application in beer stabilization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, (2015) 42:263–272.
- Kolaj, O., Spada, S., Robin, S., Wall, J.G., 2009. Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.*, 8: 9.

- Kubota, K., Tanokura, M., Takahashi, K., 2005. Purification and characterization of a novel prolyl endopeptidase from *Aspergillus niger*. Proceedings of the Japan Academy Ser B Physical and Biological Sciences, 81(10):447-453.
- Kuk, S., Erensoy, A., 2008. Gene Clonning, Selection of Plasmids and Application of Fasciola hepatica Cathepsin L1 Gene. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32 (1), 16 22.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 (5259), 680–685.
- Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B.L., Georgiou, G., 2001. Production of correctly folded Fab antiBody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* trxB gor mutants via the coexpression of molecular chaperones. Protein Expr. Purif., 23: 338-347.
- Maeng, B.H., Nam, D.H., Kim, Y.H., 2011. Coexpression of molecular chaperones to enhance functional expression of anti-BNPscFv in the cytoplasm of *Escherichia coli* for the detection of B-type natriuretic peptide. World J. Microbiol. Biotechnol., 27: 1391-1398.
- Makhoba, X., Pooe, O., Mthembu, M., 2015. Molecular Chaperone Assisted Expression Systems: Obtaining Pure Soluble and Active Recombinant Proteins for Structural and Therapeutic Purposes. Makhoba et al., J Proteomics Bioinform 2015, 8:9.
- Marco, A., Deuerling, E., Mogk, A., Tomoyasu, T., and Bukau, B., 2007. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. Coli*. BMC Biotechnology 2007, 7:32.
- Marco, A., Marco, V., 2003. Bacteria co-transformed with recombinant proteins and chaperones cloned in independent plasmids are suitable for expression tuning. Journal of Biotechnology, 109 (2004) 45–52.
- Middelberg, A., 2000. Large-Scale Recovery of Protein Inclusion Bodies by Continuous Centrifugation. Methods In Biotechnology, volume 9.
- Miroux, B., Walker, E.J., 1996. Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. J. Mol. Biol., 260, 289–298.
- Montserrat, V., Bruins, M., Edens, L., Koning, F., 2014. Influence of dietary components on *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation. Food Chemistry, 174 (2015) 440-445.
- Nausch, H., Huckauf, J., Koslowski, R., Meyer, U., Broer, I., Mikschofsky, H., 2013. Recombinant production of human interleukin 6 in *Escherichia coli*. PLoS One, 8:54933.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., Yura, T., 2000. Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. Applied And Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 3 p. 884–88.

- Norri, R., Poyarkov, A., B. O'Keeffe, M., J. FitzGerald, R., 2014. Characterisation of the hydrolytic specificity of *Aspergillus niger* derived prolyl endoprotease on bovine β -casein and determination of ACE inhibitory activity. *Gıda Kimyası Cilt* 156, 29-36.
- Ow, D.S.W., Lim, D.Y.X., Nissom, P.M., Camattari, A., Wong, V.V.T., 2010. Co-expression of Skp and FkpA chaperones improves cell viability and alters the global expression of stress response genes during scFv. Production. *Microb. Cell Fact.*, 9: 22.
- Polgar, L., 2001. The prolyl oligopeptidase family. Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Sciences, P. O. Box 7.
- Ronez, F., Arbault, P., Guzzo, J., 2012. Co-expression of the small heat shock protein, Lo18, with β -glucosidase in *Escherichia coli* improves solubilization and reveals various associations with overproduced heterologous protein, GroEL/ ES. *Biotechnol. Lett.*, 34: 935-939.
- Sachsenhauser, V., Bardwell, J.C.A., 2018. Directed evolution to improve protein folding in vivo. *Current opinion in structural biology* 2018, 48:117-123.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 1.86.
- Shan, L., Mart'i, T., Sollid, L., Gray, G., Khosla, C., 2004. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem. J.* 2004, 383,311–318.
- Shettya, R., Vestergaarda, M., Jessena, F., Hägglundb, P., Knorr, P., Koehlerc, V., Prakashd, H., Hobleya, T., 2017. Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*. *Enzyme and Microbial Technology* 2017, 57-63.
- Shomburg, I., Chang, A., Shomburg, D., 2002. Brenda enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acid Research*, 30, 47-49.
- Singh, S.M., Panda, A.K., 2005. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, Vol. 99, No. 4, 303–310. 2005.
- Sorensen, H.P., Mortensen, K.K., 2005. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115(2005) 113-128.
- Stepniak, D., 2006. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291: G621–G629.

- Şenol, B., 2020. Glutensiz gıda üretimi amaçlı, prolil endopeptidaz (PEP) enziminin üretilmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, Lisansüstü Eğitim Bilimleri Enstitüsü/ Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.
- Topal, A., 2020. Biyoteknoloji I Enzim Teknolojisi.
- Upadhyay, A., Murmu, A., Singh, A., Panda, A., 2012. Kinetics of Inclusion Body Formation and Its Correlation with the Characteristics of Protein Aggregates in *Escherichia coli*. Plos One 2012, 7(3).
- Vallejo, L., Rinas, U., 2004. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. Microbial Cell Factories 2004, 3:11.
- Villaverde, A., Carrio, M.M., 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. Biotechnology Letters, 25: 1385–1395.
- Voulgaridou, G.P., Mantso, T., Chlichlia, K., Panayiotidis, M.I., Pappa, A., 2013. Efficient *E. coli* expression strategies for production of soluble human crystallin ALDH3A1. Plos One, 8: e56582.
- Yan, X., Hu, S., Guan, Y.X., Yao, S.J., 2012. Coexpression of chaperonin GroEL/GroES markedly enhanced soluble and functional expression of recombinant human interferongamma in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 93: 1065-1074.
- Ying, B., Taguchi, H., Ueda, H., Ueda, T., 2004. Chaperone-assisted folding of a single-chain antibody in a reconstituted translation system. Biochemical and biophysical research communications, 320 (2004) 1359-1364.
- Walter, R., Simmons, W. H., 1980. Proline Specific Endo- And Exopeptidases. Molecular & Cellular Biochemistry, Volume 30, number 2.
- Whitford, D., 2005. Proteins Structure and Function. John Wiley&Sons, 9-37, England.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nejla BAKIR
Doğum Tarihi : 01.06.1994
Doğum Yeri : AĞRI / Diyadin
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0544 368 0204
E-mail : nbjlbak04@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü	-
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü	28.05.2018

Görev Aldığı Projeler

- “İnsan Tümör Nekroz Faktörünün (TNF- α) Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” (TÜBİTAK 2209-B-Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destekleme Programıyla; Proje yürütücüsü, Tamamlandı,2019)