

***Tetrahymena thermophila*'ya Kodon Uyumu Yapılmış Superfolder GFP  
(sfGFP)'nin *T. thermophila*'da Rekombinant Protein Üretimi ve Flüoresan  
Özelliğinin Karakterizasyonu**

Gürkan YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Temmuz – 2013

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1109F147**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gürkan YILMAZ'ın “*Tetrahymena thermophila*'ya Kodon Uyumu Yapılmış Superfolder GFP (sfGFP)'nin *T. thermophila*'da Rekombinant Protein Üretimi ve Flüoresan Özelliğinin Karakterizasyonu” başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Bilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 04/07/2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

|                       | Adı-Soyadı                        | İmza  |
|-----------------------|-----------------------------------|-------|
| Üye (Tez Danışmanı) : | Yrd. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU | ..... |
| Üye :                 | Prof. Dr. Sezai TÜRKEK            | ..... |
| Üye :                 | Doc. Dr. Azmi Yerlikaya           | ..... |

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### ***Tetrahymena thermophila*'ya Kodon Uyumu Yapılmış Superfolder GFP (sfGFP)'nin *T. thermophila*'da Rekombinant Protein Üretimi ve Flüoresan Özelliğinin Karakterizasyonu**

**Gürkan YILMAZ**

**Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı  
Biyoteknoloji**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU  
2013, 76 sayfa**

*Tetrahymena thermophila*'da kullanılan, *Aequorea victoria* Yeşil Flüoresan Proteininin (Wild Type GFP) EGFP gibi değişik mutantları genellikle kodon uyumu yapılmaksızın gen lokalizasyonunda kullanıla gelmiştir. Bu tez çalışmasının amacı; GFP'nin güçlü ışıyan, hızlı katlanan, çözünürlüğü yüksek diğer bir mutant versiyonu olan Super Folder GFP (sfGFP) geninin *Tetrahymena*'ya kodon uyumu ve afinitik saflaştırmaya uygun hale getirilmesi, rekombinant protein üretimi ve EGFP ile deneysel kullanım açısından karşılaştırmalı karakterizasyonudur. sfGFP geninde % 21.3 sessiz mutasyon ile *Tetrahymena*'ya kodon uyumu sağlanmış ve N-Terminaline 6XHis takısı (6XHis-TtsfGFP) eklenmiştir. *Tetrahymena* ifade vektörü olan pVGF'nin PmeI-ApaI kısmına 6XHis-TtsfGFP geni klonlanarak, EGFP yerine yerleştirilmiş ve MTT1-6XHis-TtsfGFP-rpl29Ter kaseti oluşturulmuştur. Kontrol grubu olarak *Tetrahymena*'ya kodon uyumu yapılmamış sfGFP aynı şekilde yapılandırılmıştır. Vektörler elektroporasyon ile konjugatif hücrelere transform edilmiştir. Elde edilen TtsfGFP, sfGFP ve EGFP klonlarının CdCl<sub>2</sub> ile indüksiyonundan sonra ki 3. saatte yapılan in vivo spektroskopik flüoresan ölçümü, TtsfGFP'nin kontrollere göre ~2.2-4 kat fazla ışıma verdiğini göstermiştir. Flüoresan mikroskop analiz bulguları; TtsfGFP'li hücrelerin maksimum görsel ışımaya 100 dk gibi kısa bir sürede ulaşmasına rağmen EGFP ve sfGFP'li hücrelerin ~240 dk'da ulaştığını göstermiştir. pVTtsfGFP vektöründe yer alan 6XHis-TtsfGFP'nin C-terminaline *Tetrahymena*'nın bir hipotetik geni (H) XhoI-ApaI klonlaması ile yerleştirilmiş ve *Tetrahymena thermophila* hücresi içinde füzyon proteinin makronükleus ile mikronükleusta lokalize olduğu görülmüştür. TtsfGFP ile TtsfGFP-H'nin Ni-NTA ile afinitik saflaştırılabilirliği SDS PAGE ve Western blot analizi yapılarak teyit edilmiştir. Araştırma bulguları, 6XHis-TtsfGFP takısının, *Tetrahymena* proteinlerinin lokalizasyonu ve saflaştırılmasında affinitik flüoresan takı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

**Anahtar kelimeler:** Kodon uyumu, Super Folder GFP, *Tetrahymena*, Afinitik saflaştırma, Lokalizasyon.

## ABSTRACT

### Master of Sciences Thesis

#### **Recombinant Protein Production of Codon Adapted Superfolder GFP (sfGFP) in *Tetrahymena thermophila* and Its Fluorescence Characterization**

**Gürkan YILMAZ**

**Anadolu University  
Graduate School of Sciences  
Advance Technologies Program  
Biotechnology**

**Supervisor: Assist. Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU  
2013, 76 pages**

Different mutants of *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein (Wild Type GFP) such as EGFP have been used without a codon adaptation as a tag for gene localization in *Tetrahymena thermophila*. The aim of this study is to create a codon adaptive mutant version of Super Folder GFP (sfGFP) gene for *Tetrahymena* with an affinity purification feature, its recombinant protein production in *T.thermophila* and comparative characterization with EGFP for experimental use. sfGFP protein coding region was codon-adapted with 21.3 % silent mutations to *Tetrahymena* and 6XHis tag coding sequence was also added to its 5' end for affinity purification (6XHis-TtsfGFP). The EGFP gene in *Tetrahymena* pVGF expression vector was replaced into PmeI-ApaI restriction site with 6XHis-TtsfGFP gene to construct MTT1-6XHis-TtsfGFP-rpl29Term protein expression cassette. Non-codon adapted sfGFP was similarly cloned as a control group. All vectors were transformed to conjugant *Tetrahymena* cells with electroporation. Results of in vivo fluorescence analyses at 3<sup>rd</sup> hours after the CdCl<sub>2</sub> induction of TtsfGFP, sfGFP and EGFP carrying clones showed that TtsfGFP clones have ~2.2-4 fold more fluorescence emission against control groups. Fluorescent microscopic results also showed that TtsfGFP reach to max emission at 100 min, which is much earlier than EGFP and sfGFP clones at ~240 min. A *Tetrahymena* hypothetical gene (H) was cloned with XhoI-ApaI site to be in the C-Terminal of 6XHis-TtsfGFP of pVTtsfGFP vector and microscopic analysis revealed the fusion protein localizes in macronucleus and micronucleus in *Tetrahymena thermophila*. Affinitic purifiability of TtsfGFP and TtsfGFP-H with Ni-NTA was confirmed by SDS PAGE and Western blotting experiments. Findings of this study suggest that 6XHis-TtsfGFP tag can be use as a protein localization and affinity purification tag for recombinant protein expression in *Tetrahymena thermophila*.

**Keywords:** Codon adaptation, Super Folder GFP, *Tetrahymena*, Affinity purification, Localization

## TEŞEKKÜR

Ülkemde özgür bir şekilde yaşamamı mümkün kılan Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

Çalışmamda maddi ve manevi hertürlü desteği sağlayan, bir danışmanın ötesinde arkadaş gibi yaklaşımda bulunan, bakış açımı daha geniş tutmamı sağlayan değerli Hocam Yrd. Doç. Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na,

Zor anlarımda yanımda olan, gerek çalışmalarımda gerekse özel hayatımda hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen H. Açelya AKDAMAR KAPKAÇ, Ayça Fulya ÜSTÜNTANIR, Nurçin KÜÇÜKOĞLU, Erhan ASLAN, Emine DİNÇER ve ismini sayamadığım tüm can dostlarıma,

Yaşadığımız tüm sıkıntılara karşın desteklerini hiç esirgemeyen, kararlarıma saygı duyan ve her zaman yanımda olan annem Çiçek YILMAZ, babam Doğan YILMAZ ve kardeşim Deniz YILMAZ'a, teşekkür ederim.

Gürkan YILMAZ

Temmuz, 2013

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET.....                                                                                                                                | i         |
| ABSTRACT.....                                                                                                                            | ii        |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                                                            | iii       |
| İÇİNDEKİLER..                                                                                                                            | iv        |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                                                    | vi        |
| <br>                                                                                                                                     |           |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                                                                          | <b>1</b>  |
| 1.1. AMAÇ.....                                                                                                                           | 3         |
| <br>                                                                                                                                     |           |
| <b>2. MATERYAL VE YÖNTEM</b>                                                                                                             | <b>4</b>  |
| 2.1. Çalışmada Kullanılan Organizmalar ve Yetiştirme Koşulları .....                                                                     | 4         |
| 2.2. Vektör Yapılandırması ve Transformasyon .....                                                                                       | 4         |
| 2.3. Flüoresan Mikroskop ve Spektroskop Analizi.....                                                                                     | 7         |
| 2.4. Protein İzolasyonu, SDS PAGE ve Western Blot Analizi .....                                                                          | 7         |
| <br>                                                                                                                                     |           |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                                                       | <b>9</b>  |
| 3.1. Kodon Uyumu Yapılmış TtsfGFP’nin, EGFP ve sfGFP kontrollerine<br>Göre <i>T.thermophila</i> ’da Erken Üretimi ve Güçlü Işınması..... | 9         |
| 3.2. Tetrahymena 6XHis-TtsfGFP Takısının Afinitik Saflaştırabilirliği .....                                                              | 14        |
| 3.3. TtsfGFP-H Füzyon Proteininin Makroçekirdek ve Mikroçekirdek<br>Lokalizasyonu.....                                                   | 16        |
| <br>                                                                                                                                     |           |
| <b>4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER</b>                                                                                                    | <b>20</b> |
| <br>                                                                                                                                     |           |
| <b>KAYNAKLAR...</b>                                                                                                                      | <b>23</b> |
| <br>                                                                                                                                     |           |
| <b>Ek-1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler .....</b>                                                                         | <b>29</b> |
| <b>Ek-2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzimler .....</b>                                                                      | <b>33</b> |
| <b>EK-3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....</b>                                                                                        | <b>34</b> |

|                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Ek-4 Tetrahymena'ya Kodon Uyumu Yapılan Superfolder Yeşil</b>                       |           |
| <b>Flüoresan Protein (TtsfGFP).....</b>                                                | <b>36</b> |
| <b>Ek-5 Çalışmada Kullanılan Vektörler .....</b>                                       | <b>38</b> |
| <b>Ek-6 Çalışmada Uygulanan Deneysel Yöntemler .....</b>                               | <b>40</b> |
| <b>Ek-7 Sentetik Üretimi Yapılan TtsfGFP ve sfGFP Kasetleri .....</b>                  | <b>57</b> |
| <b>Ek-8 İfade Vektörlerinin Oluşturulması.....</b>                                     | <b>58</b> |
| <b>Ek-9 pVTtsfGFP, pVsfGFP ve pVTtsfGFP-H İfade Vektörlerinin</b>                      |           |
| <b>Dizi Analizi .....</b>                                                              | <b>62</b> |
| <b>Ek-10 Tetrahymena Klonlarının CdCl<sub>2</sub> ile İndüklenmesinin Ardından</b>     |           |
| <b>Zamana Bağlı Işımlarının Mikroskopik Karşılaştırılması .....</b>                    | <b>64</b> |
| <b>Ek-11 Tetrahymena Klonlarının CdCl<sub>2</sub> ile İndüklenmesinin Ardından</b>     |           |
| <b>Zamana Bağlı Işımlarının Spektroskopik Karşılaştırılması .....</b>                  | <b>67</b> |
| <b>Ek-12 TtsfGFP ve sfGFP Genlerinin <i>E. coli</i> Hücrelerinde İfade Edilmesi ..</b> | <b>69</b> |
| <b>Ek-13 Konuya Genel Giriş .....</b>                                                  | <b>73</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1. Sentetik ürettirilen TtsfGFP ve sfGFP üretim kaseti .....                                                                                                                                                                           | 5  |
| 3.1. 6XHis-TtsfGFP ve 6XHis-sfGFP gen dizileri ve farkları .....                                                                                                                                                                         | 9  |
| 3.2. Yapılandırılan ifade vektörleri .....                                                                                                                                                                                               | 11 |
| 3.3. Zamana bağlı flüoresan ışıma deneyinde, CdCl <sub>2</sub> ile indüklenen<br>Tetrahymena klonlarının 100. dk'daki flüoresan ışımlarının<br>mikroskopik analizi .....                                                                 | 12 |
| 3.4. TtsfGFP, sfGFP ve EGFP taşıyan Tetrahymena klonlarının zamana<br>bağlı flüoresan ışımlarının karşılaştırılması .....                                                                                                                | 13 |
| 3.5. CdCl <sub>2</sub> ile indüklenen Tetrahymena klonlarından 180 dk sonra elde<br>edilen peletlerden saflaştırılan toplam proteinlerin SDS<br>PAGE ve Western blot analizi .....                                                       | 14 |
| 3.6. pVTtsfGFP taşıyan Tetrahymena klonundan elde edilen toplam<br>proteinden Ni-NTA afinite saflaştırması ile saflaştırılan<br>TtsfGFP'nin SDS PAGE ve Western blot analizi .....                                                       | 15 |
| 3.7. pVTtsfGFP-H ifade vektörü .....                                                                                                                                                                                                     | 16 |
| 3.8. Tetrahymena pVTtsfGFP-H klonunun CdCl <sub>2</sub> ile indüklenmesinden<br>sonra flüoresan mikroskopta incelenmesi .....                                                                                                            | 17 |
| 3.9. pVTtsfGFP-H taşıyan Tetrahymena hücrelerinin 2 µg/ml CdCl <sub>2</sub> ile<br>18 saat indüklenmesinden sonra saflaştırılan toplam protein<br>ve toplam proteinden Ni-NTA afinite saflaştırması ile<br>saflaştırılan TtsfGFP-H ..... | 19 |

## 1. GİRİŞ

Ökaryotik, silli *Tetrahymena thermophila*'nın, sahip olduğu yaklaşık 4 saat gibi kısa bölünme süresi, ucuz ve steril kültürizasyonu gibi özellikleri ile günümüzde biyoloji ve biyoteknoloji alanında kullanımı yaygınlaşmıştır [1]. Elektroporasyon veya biyolistik silahla transform edilebilmesi, üretilen bazı proteinlerin disülfid bağlarını oluşturması ve glikolizasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonları yapabilmesi, heterolog protein üretiminde *T. thermophila*'yı alternatif bir rekombinant protein üretim konakçısı yapmıştır [2,3]. *Tetrahymena* kullanılarak yapılan araştırmalarda, heterolog veya homolog rekombinant protein saflaştırılmasında, homolog proteinlerin hücre içi lokalizasyonunu belirlemede, afinite ve lokalizasyon takılarına ihtiyaç bulunmasından dolayı, daha kullanışlı takı geliştirme çalışmaları sürdürülmektedir.

*T. thermophila* protein lokalizasyon araştırmalarında en yaygın kullanılan takı *Aequorea victoria* yeşil flüoresan proteininin (yabanıl -wild type- Green Fluorescent Protein; WT-GFP) enhance GFP (EGFP) mutant versiyonudur [4–13]. GFP'ler, belirli dalga boyunda ışınlarla uyarılabilen ve uyarıldıkları ışıdan daha yüksek dalga boyunda ışınım yapan proteinlerdir [14-16]. Yabanıl GFP; tek zincirden oluşan, yapısında 11  $\beta$ -plaka ile 4  $\alpha$ -sarmal katlanması bulunan 238 amino asit (a.a.) uzunluğunda bir proteindir. Yabanıl GFP'nin katlanmış 3B yapısı,  $\beta$ -katlanmalarıyla oluşan fıçı'ya benzer silindirik ( $\beta$ -fıçı) bir yapıdır [17,18]. Silindir yapının merkezindeki 65Ser -66Tyr -67Gly aminoasitlerinin oluşturduğu kromatofor yapı, uyarıldığında ışıma yapmak için bir substrata kullanmaz, fakat ortamda “**çözünmüş oksijen**” varlığına ihtiyaç duyar [15,16]. GFP proteininin amino asit dizisinde yapılan mutasyonel çalışmalar; yabanıl GFP'ye göre daha hızlı katlanan, daha parlak ışıma veren, değişik pH aralıklarına adapte GFP mutantları (EGFP, cycle3-GFP v.b.) ortaya çıkartmıştır. Ayrıca 65-66-67 pozisyonundaki aminoasitlerin oluşturduğu kromatofor yapı ile bu yapıyı çevreleyen aminoasitlerde yapılan bazı kritik değişiklikler ise farklı renkte ışıma yapan GFP varyantlarını (örneğin YFP, BFP, CFP) oluşturmuştur [15,19–21]. GFP'nin bu mutantlarından *Tetrahymena* protein lokalizasyon deneylerinde

genellikle ışıması güçlendirilmiş S65T-GFP mutandı olan EGFP ile dsRED flüoresan protein varyantı mCherry kullanılmıştır [4–11,22]. GFP'nin birçok mutantına göre ışıma gücü arttırılmış, agregasyonu minimize edilmiş, asit ve üre gibi denatürentlere karşı direnci yükseltilmiş, katlanma hızı ve çözünürlüğü arttırılmış yeni bir mutant “Superfolder GFP (sfGFP)” ismiyle Pe´delacq J.D ve ark. tarafından (2006) geliştirilmiştir [23–25]. Geliştirilen bu sfGFP'nin *T. thermophila*'da kullanımı henüz bildirilmemiştir.

sfGFP geliştirilirken, cycle-3 mutantında bulunan mutasyonların (F99S, M153T, V163A) eklenmesi ile proteinin katlanması geliştirilmiş, enhance GFP (F64L, S65T) mutasyonları ile ışıması arttırılmış ve sfGFP olmasını sağlayan S30R, Y39N, N105T,Y145F, I171V ve A206V mutasyonları ile katlanma kinetiği, çeşitli streslere karşı stabilizasyonu, ışıma etkinliği arttırılmıştır ve hücre içerisindeki dimerizasyonu azaltılmıştır [23]. sfGFP varyantı hem sitoplazmik pH'da hemde endoplazmik retikulum, bakteri periplazması gibi oksidatif ortamlarda da kullanılabilmektedir [23–25]. Ayrıca diğer GFP mutantlarında olduğu gibi sfGFP füzyon olarak üretildiği proteinin çözünürlüğünü arttırmaktadır. Bu özelliğinin yanında zayıf katlanma potansiyeli olan ve çözünürlüğü az olan proteinlerle, sfGFP füzyon olarak üretildiğinde; sfGFP'nin yanında üretildiği proteinin katlanmasına yardımcı olduğu ve böylelikle hedef proteinin çözünürlüğünü arttırdığı bildirilmiştir [23,26]. Bu avantajlı özelliklerine karşın GFP'ler doğal afinitik özellik taşımamaktadırlar. Flüoresan proteinlerin bu zayıf noktası, uygun ucuna 6XHistidin takısı eklenerek aşılabilmektedir [27–29].

Bazı türlerde flüoresan proteinlerin direk takı olarak kullanımı, kodon sözlüğü ve kodon kullanım frekans uyumsuzluğundan dolayı, protein translasyonunda problemlere neden olmaktadır. Bu nedenle flüoresan protein gen dizisinin kodon tercihi, sessiz mutasyonel düzeltmelerle hedeflenen konakçının kodon sözlüğü ve kullanım sıklığına uyumlu hale getirilmelidir [30–34]. Piyasada bulunan GFP ve GFP mutantları genellikle *Escherichia coli* ve insan kodon sözlüğüne uyumludur. Bu nedenle, sfGFP geni diğer bir konakçıda üretilmek istendiğinde, sfGFP'nin konakçı canlıya kodon uyumunun yapılması gerekebilir. Kataoka ve ark. (2010), EGFP ile mCherry flüoresan proteinlerini kodlayan gen dizilerinin, Tetrahymena'ya kodon uyumunu sessiz mutasyonlarla sağlamış ve

hedef proteinin C-terminaline takarak gen lokalizasyonunda kullanabilirliğini göstermiştir [5]. EGFP'den daha üstün özelliklere sahip olan sfGFP'nin benzer şekilde Tetrahymena'ya kodon uyumlu hale getirilmesi ve eşzamanlı kullanılabilir özellikler kazandırılması ihtiyaç olarak ortaya çıkmıştır.

## 1.1 AMAÇ

*Tetrahymena thermophila* için hem protein lokalizasyon çalışmalarında hem de rekombinant proteinin afinitik saflaştırılmasında eşzamanlı kullanılabilen, proteinlerin görsel takibini mümkün kılan, “protein lokalizasyon-affinite” çift kullanımlı flüoresan protein takısı geliştirmek çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.

## 2. MATERİYAL VE YÖNTEM

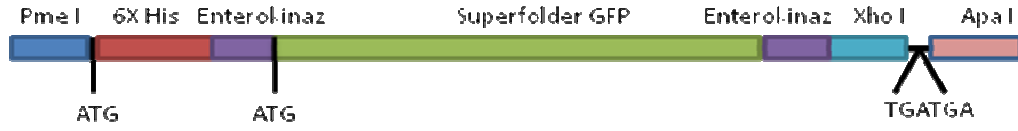
### 2.1. Çalışmada Kullanılan Organizmalar ve Yetiştirme Koşulları

**Klonlama konakçısı:** *Escherichia coli* DH10B'den türevlendirilmiş NEB-10-Beta (New England BioLabs Inc,C3019I) kimyasal kompetent hücreleri klonlamada kullanılmıştır.

**Protein İfade konakçısı:** *Tetrahymena thermophila* B2086 (Tip II) ve CU428 (Tip VII) hücreleri kullanılmıştır (Tetrahymena Stok Merkezinden temin edilmiştir, Cornell University/New York). Her iki hücrede B tip rDNA içerir ve ikisinde paramomisin duyarlılığına sahiptir. Hücreler PPY besiyerinde (100 unit/ml Pen-Strep içeren), 30°C'de 120 rpm'de geç logaritmik faza kadar büyütülmüştür.

### 2. 2. Vektör Yapılandırması ve Transformasyon

**sfGFP'nin kodon uyumu ve afitik takı eklenmesi:** sfGFP 717 nükleotid uzunluğunda (Accession no: HI069813.1) olup, *A. victoria* (deniz anası)'dan elde edilen Yeşil Flüresan Proteinnin bir mutant versiyonudur [23]. sfGFP'nin *T. thermophila*'da rekombinant protein üretimi esnasında karşılaşılabilecek kodon uyumsuzluğunu çözmeye yönelik, Hannah M.W ve ark. (2008)'nın *T. thermophila* tRNA genleri ile ilgili yaptığı çalışma verileri ile kodon kullanım sıklığı beraber değerlendirilerek; 239 kodonunun 126 tanesinin (%57,72) değiştirilmesi ön görülmüştür [35]. Dizisi değiştirilmemiş kontrol sfGFP ile *T. thermophila* kodon uyumlu sfGFP (TtsfGFP)'ye 6XHistidin takısı ve Enterokinaz kesim dizisi eklenerek “Shanghai ShineGene Molecular Bio-Technologies Inc (Shangha, China)” firmasına sentetik olarak ürettirilmiş, pUC57 vektörüne klonlatırılmış ve dizi analizi teyidi yaptırılmıştır (Şekil 2.1, EK 4, EK 7).



**Şekil 2.1.** Sentetik ürettirilen TtsfGFP ve sfGFP üretim kaseti. PmeI, XhoI ve ApaI kesim bölgeleri TtsfGFP ve sfGFP genlerinin pVGF vektörüne klonlanabilmesi için yerleştirilmiştir. Üretimi yapılacak olan flüoresan proteinlerin başına affinik saflaştırmaya uygun olması için 6XHis takısı eklenirken flüoresan proteinin hem N- hemde C- terminaline enterokinaz bölgesi eklenmiştir. Böylelikle flüoresan proteinler hem tek hem füzyon halinde üretildiklerinde, enterokinaz ile kesime alınarak 6XHis takısı ile füzyon proteinlerin birbirinden ayrılması hedeflenmiştir. Dizi 791 bc uzunluğundadır.

**6XHis-TtsfGFP takısının pVGF vektörüne yerleştirilmesi:** Kodon adaptasyonlu (TtsfGFP) ve adaptasyonsuz sfGFP genlerinin Tetrahymena’da ifadesi ve işlevinin değerlendirilmesi için pVGF vektörü kullanılmıştır. pVGF, rDNA orijini ve Mtt1 promotoru kontrolünde EGFP-Drp1 füzyonu içeren bir ifade vektörüdür. pVGF vektöründe bulunan orijin, sahip olduğu mutasyon ile paramomisin antibiyotiğine direnç sağlamaktadır [4,36,37]. Bu çalışma öncesi; pVGF içinde yer alan Drp1 geni silinerek, EGFP’nin sonuna kısa bir linkerin ligasyonu ile “dur” kodonu eklenmiş ve EGFP üreten kontrol grubu olan pEGFP vektörü geliştirilmiştir. pUC57’den PmeI-ApaI kesimi ile salınarak saflaştırılan TtsfGFP ve sfGFP dizileri, aynı enzimlerle kesilerek hazırlanmış pVGF’ye ligasyon ile yerleştirilmiş, oluşturulan vektörler pVTtsfGFP ve pVsfGFP olarak isimlendirilmiştir. Gen lokalizasyon deneyi için ise bir Tetrahymena hipotetik proteini (H) kodlayan genin (NCBI Ulaşım Numarası: XM\_001011861.1) cDNA’sı, pVTtsfGFP vektörünün XhoI-ApaI kısmına klonlanmış ve pVTtsfGFP-H ismi verilmiştir. 6XHis-TtsfGFP-H füzyon proteini hem gen lokalizasyonu hem de Ni-NTA affinitik saflaştırma deneylerinde kullanılmıştır.

Tüm klonlamalar NEB-10-Beta kimyasal kompatent hücrelerine yapılmış ve pozitif transformantların taranmasında koloni PZR metodu kullanılmıştır [38]. Belirlenen pozitif transformantlardan Thermo GeneJet Plasmid miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılmış ve restriksiyon enzimleri ile kesilerek teyit edilmiştir.

Klonlanan diziler, Beckman CEQ800 cihazı kullanılarak yapılan dizi analizleri ile teyit edilmiştir [38], (Ek-6 a-h).

**Vektörlerin elektroporasyonla konjugant Tetrahymena hücrelerine transformasyonu:** Sıvı azottan taze uyandırılarak hazırlanmış konjugatif Tetrahymena B2086 - CU428 hücrelerine, BioRad Gene Pulser aleti ile vektörler transform edilmiştir [39-41]. Geç logaritmik faza kadar büyütülen Tetrahymena hücreleri 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) ile yıkandıktan sonra 18-24 saat açlığa alınmış ve hücre sayıları ml'de  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra her iki hücre tipinde eşit hacimde alınarak geniş tabanlı bir erlende birleştirilmiş ve konjugasyonun başlaması için çalkalamasız bir biçimde 30 °C'de konjugasyona alınmıştır. Konjugasyonun ~3. saatinde konjugasyon verimliliği ışık mikroskopunda kontrol edilmiş ve verimliliğin %80'nin üzerinde olduğu durumlarda deneye devam edilmiştir. Konjugasyonun "Makronükleer Gelişim 1" evresindeki konjugantlar, 10 mM HEPES'le yıkanmış ve peletlenerek en son  $1.7 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde 10 mM HEPES ile çözünmüştür. Alınan 230 µl hücre, 10-40 µg plazmit içeren 20 µl 10 mM HEPES ile 250 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım bekletilmeden 4 mm aralıklı Gene Pulser (Bio-Rad) elektroporasyon küvetine aktarılmış ve ateşleme (440 Volt, 25-µF Capacitor, 200 Ω) yapılmıştır. Ateşlemeden sonra hücreler 5 ml 250 µg/ml Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) içeren SPP besiyerine alınmıştır. Transformant hücreler 12-24 saat çalkalamasız inkübasyondan sonra 100 µg/ml paramomisin baskısına alınmıştır. İlk antibiyotik baskısı 3 gün takip edilmiş ve 3 günün ardından canlı kalan klonların paramomisin baskısı kademeli olarak 800 µg/ml'ye kadar çıkartılmıştır (Ek-6, i). Antibiyotik baskısına direnç gösteren klonlar, 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenerek flüoresan ışıma yapıp yapmadıkları flüoresan mikroskopta kontrol edilmiştir [41,42]. Paramomisine karşı dirençli ve yeşil flüoresan ışıma gösteren Tetrahymena hücrelerinden sıvı nitrojen stoğu yapılmıştır [3].

### 2. 3. Flüoresan Mikroskop ve Spektroskop Analizi

Flüoresan ışıma analizleri mikroskopik ve spektroskopik olmak üzere iki şekilde yapılmıştır. Tetrahymena klonları gece boyu PPY besiyerinde (100 µg/ml paramomisin) büyütüldükten sonra 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmiştir [41,42]. İndükleme yapıldıktan sonra sıfır zamanından başlanarak her 20 dk'da bir flüoresan mikroskopta hücrelerin flüoresan ışıması fotoğraflanmıştır (Leica DM6000/ GFP filtresi, 11532366 Filter Cube GFP HP, 20X objektif ) (Ek-6, j). pVTtsfGFP, pVsfGFP ve pEGFP taşıyan Tetrahymena hücreleri %20'lik formaldehit (500 µl hücreye, 0.5µl %20 formaldehit eklenmiştir) ile öldürülerek, preparat haline getirilmiş ve her klon için hücresel flüoresan üretim zamanı ve ışıma gücü fotoğraflanmıştır.

Tetrahymena hipotetik geninin gen lokalizasyon deneyinde ise pVTtsfGFP-H taşıyan klon, 0.25 µg/ml ve 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile ayrı ayrı indüklenmiş ve belirli aralıklarla flüoresan mikroskopta görüntülenerek fotoğraflanmıştır.

pVTtsfGFP, pVsfGFP ve pEGFP taşıyan Tetrahymena klonları flüoresan ışımalarının spektroskopik analizi için büyütülmüş ve hücrelerin sayıları 300.000 hücre/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Hücreler 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile oda sıcaklığında 3 saat orbital çalkalayıcı da, 50 rpm'de indüklenmiştir. İndükleme başlangıcı dâhil, her 30 dk'da bir tüm klonlardan 200'er µl alınarak, UV geçirgen 96 kuyulu microplate (Falcon, katalog no: 353915) aktarılmış ve Molecular Devices Spektramax M2 flüoresans cihazında ölçüm yapılmıştır. Flüoresan okuma 488 nm eksitasyon, 510 nm emisyonunda yapılmıştır [15,23].

### 2.4. Protein İzolasyonu, SDS PAGE ve Western Blot Analizi

Zamana bağlı spektroskopik ışıma deneyinin (Bölüm 2.3) 180. dk'sında pVTtsfGFP, pVsfGFP ve pGFP içeren Tetrahymena hücreleri ile 18 saat 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenen pVTtsfGFP ve pVTtsfGFP-H taşıyan Tetrahymena hücreleri peletlenmiş; Zhang ve Thompson [43] yöntemine göre toplam protein izolasyonu

yapılmıştır. Toplam proteinlerin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenerek, eşit miktar gram protein deneylerde kullanılmıştır.

pVTtsfGFP ve pVTtsfGFP-H vektörleri, 6XHis-TtsfGFP protein lokalizasyon-affinite kaseti bulundurmaktadır. Takı içinde yer alan 6XHis afinitik takısı ile TtsfGFP'nin birlikte üretildiklerinde, afinitik bağlanma ve saflaştırma kolonunda ışıma görevlerini yapabildiğini kontrol etmek için 18. saatten elde edilen toplam proteinlerden Ni-NTA (Qiagen) ile TtsfGFP ve TtsfGFP-H affinitik saflaştırılmıştır (Qiagen, katalog no:30230; QIAexpressionist 2003 manueline göre) (Ek-6, k).

Spektroskopik ışıma deneyi toplam proteinleri ile affinitik saflaştırılan TtsfGFP ve TtsfGFP-H proteinlerinden SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Ek-6, l). Western blot analizi birincil monoklonal mouse anti-GFP (Roche, katalog no:11814460001) ve ikincil anti-mouse (Sigma, Kat.no: A5225) antikorları kullanılarak gerçekleştirilmiştir [38]. SDS PAGE ve Western blot analizlerinde pozitif kontrol olarak, laboratuvarımızda *E. coli*'de üretilmiş 6XHis-TtsfGFP (teorik~26 kDa, jel büyüklüğü ~31 kDa) kullanılırken (Ek 12); negatif kontrol olarak ise transform olmamış Tetrahymena B2086 ve CU428 karışımının CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmiş ve saflaştırılmış toplam proteini kullanılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Kodon Uyumu Yapılmış TtsfGFP'nin, EGFP ve sfGFP Kontrollerine Göre *T.thermophila*'da Erken Üretimi ve Güçlü Işması

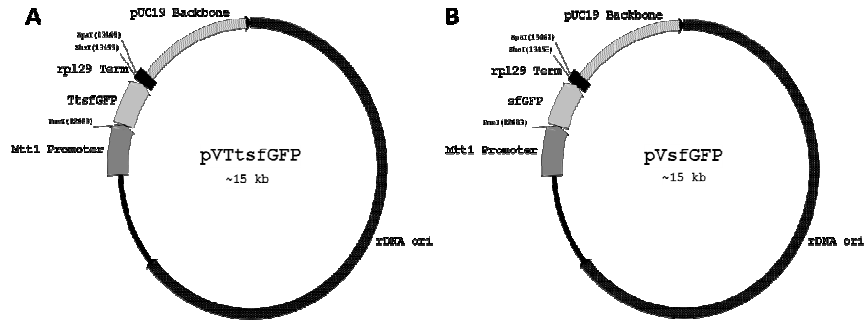
İnsan ve *E.coli*'ye kodon uyumlu sfGFP'nin *T. thermophila*'da rekombinant protein olarak üretimi, Tetrahymena'nın AT zengini kodon tercihi ve tRNA havuzundan dolayı translasyonunun yavaş olmasına neden olabilir [5,44]. Hannah M.W ve ark. (2008)'nin *T. thermophila* tRNA gen kopya sayısı, kodon kullanım sıklığı ve Woble hipotezi dikkate alınarak sfGFP'nin *T.thermophila*'ya kodon uyumu yapılmıştır [35]. Takip edilen karar verme adımları iki şekildedir. İlki, aynı amino asiti taşıyıcı tRNA'ları kodlayan genlerin kopya sayılarının birbirine yakın olması durumunda kodon kullanım frekansı yüksek olan kullanılmış ve ikincisi, tRNA genlerinin kopya sayıları arasında farkın yüksek olması durumunda ise kopya sayısı yüksek olan kodon tercih edilmiştir. Buna göre yapılan sessiz mutasyonların konumu TtsfGFP ile sfGFP arasında Şekil 3.1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. sfGFP'nin 239 kodonunun 126 tanesi yani % 57,72'si değiştirilmiştir. sfGFP'nin % 57.8'lik AT oranı, yapılan bu mutasyonlarla % 63.9'a çıkmıştır.

|         |                                                               |     |
|---------|---------------------------------------------------------------|-----|
| TtsfGFP | GTTTAAACATGCACCACCACCACCACCACGACGACGACGACAAAATGCTCTAAAGGTGAAG | 60  |
| sfGFP   | GTTTAAACATGCACCACCACCACCACCACGACGACGACGACAAAATGAGCAAAGGAGAAG  | 60  |
|         | *****                                                         |     |
| TtsfGFP | AATTATTCACTGGTGTGTTCTATTITAGTTGAATTAGACGGTGACGTTAAGGTCACA     | 120 |
| sfGFP   | AACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACA   | 120 |
|         | ** * *****                                                    |     |
| TtsfGFP | AATTCTCTGTTAGAGGTGAAGGTGAAGGTGACGCTACTAACGGTAAATTAACCTTTAAAT  | 180 |
| sfGFP   | AATTTTCTGTCCGTGGAGAGGTGAAGGTGATGCTACAAACGGAAACTCACCTTTAAAT    | 180 |
|         | **** * * * * *                                                |     |
| TtsfGFP | TCATTTGCACTACTGGTAAATTACCTGTTCTTGCCCTACTTTAGTTACTACTTTAACTT   | 240 |
| sfGFP   | TTATTTGCACTACTGGAAAACTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTCTGACCT  | 240 |
|         | * *****                                                       |     |
| TtsfGFP | ACGGTGTTCAATGCTTCTCTAGATACCTGACCACATGAAAAGACACGACTTTTCAAT     | 300 |
| sfGFP   | ATGGTGTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCACATGAAACGGCATGACTTTTCAAGA   | 300 |
|         | * *****                                                       |     |
| TtsfGFP | CTGCTATGCCTGAAGGTTACGTTCAAGAAAGAACTATTTCTTTCAAAGACGACGGTACTT  | 360 |
| sfGFP   | GTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGACCT  | 360 |
|         | *** *****                                                     |     |
| TtsfGFP | ACAAAACCTAGAGCTGAAGTTAAATTCGAAGGTGACACTTTAGTTAACAGAATTGAATTAA | 420 |
| sfGFP   | ACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAA  | 420 |
|         | **** * * * * *                                                |     |

|         |                                                                   |     |
|---------|-------------------------------------------------------------------|-----|
| TtsfGFP | AAGGTATTGACTTCAAAGAAGACGGTAACATTTTAGGTCACAAATTAGAATACAACCTCA      | 480 |
| sfGFP   | AAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAACCTTA       | 480 |
|         | ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * |     |
| TtsfGFP | ACTCTCACAACTTTACATTACTGCTGACAAACAAAAAACGGTATTAAAGCTAACTTCA        | 540 |
| sfGFP   | ACTCACAACTGTATACATCACGGCAGACAAACAAAAAGATGGAATCAAAGCTAACTTCA       | 540 |
|         | **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *  |     |
| TtsfGFP | AAATTAGACACAACGTTGAAGACGGTTCGTTCATTAGCTGACCACTACCAACAAAA          | 600 |
| sfGFP   | AAATTCGCACAACTGTTGAAGATGGTTCCGTTCAACTAGCAGACCACTTATCAACAAAA       | 600 |
|         | ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *   |     |
| TtsfGFP | CTCCTATTGGTGACGGTCCTGTTTTATTACCTGACAACCACTACTTATCTACTCAATCTG      | 660 |
| sfGFP   | CTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCACTTACCTGTGACACCAATCTG      | 660 |
|         | **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *  |     |
| TtsfGFP | TTTTATCTAAAGACCTTAACGAAAAAGAGACCACATGGTTTTATTAGAATTCTGTA          | 720 |
| sfGFP   | TCCTTCGAAAGATCCCAACGAAAAAGCGTGACCACATGGTCTCTTCTGAGTTTGTA          | 720 |
|         | * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *     |     |
| TtsfGFP | CTGCTGGTATTACTCACGGTATGGACGAATTATACAAA                            |     |
| sfGFP   | CTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTTACAAA                             |     |
|         | ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *   |     |
| TtsfGFP | GATGAGGGCCC                                                       | 791 |
| sfGFP   | GATGAGGGCCC                                                       | 791 |
|         | *****                                                             |     |

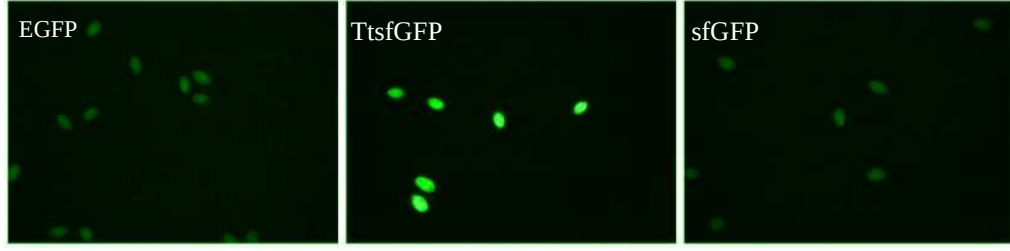
**Şekil 3.1:** 6XHis-TtsfGFP ve 6XHis-sfGFP gen dizileri ve farkları. Gri renkli nükleotidler tarafımızca değiştirilmiş nükleotidler olup, toplamda 153 adettir (toplam dizinin %21.3'ü). Değiştirilen kodon sayısı ise 126'dır. Açık yeşil gölgeli dizi PmeI, koyu yeşil gölgeli dizi XhoI, sarı gölgeli dizi ise ApaI kesim tanıma bölgesidir. Turkuaz gölgeli dizi 6X Histidin kodlayan bölgedir. Pembe gölgeli dizi Enterokinaz tanıma bölgesi kodlayan dizidir.

Kodon uyumlu TtsfGFP ve kodon uyumsuz sfGFP genleri, pUC57'den Şekil 3.1'de verilen 6XHis dizisi ve enterokinaz kesim bölgeleri eklenmiş olarak PmeI-ApaI ile kesilerek saflaştırılmış ve aynı enzimlerle hazırlanmış pVGF vektöründeki EGFP-Drp1 füzyon proteini yerine yerleştirilmiştir. Yapılandırılan bu vektörlerin yapısı Şekil 3.2'de görülmektedir (Ek 6, g-h; Ek-8, Ek-9).



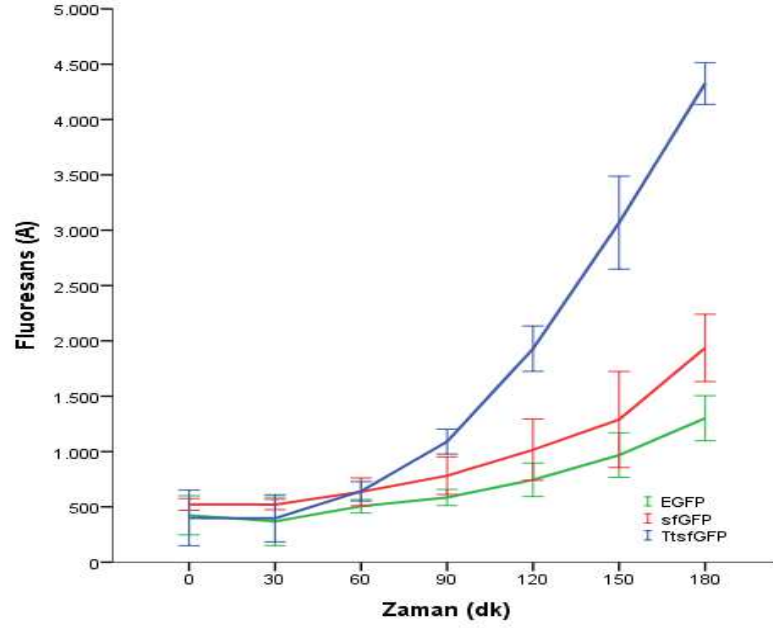
**Şekil 3.2.** Yapılandırılan ifade vektörleri. **A.** İçerisine PmeI-ApaI klonlaması ile Tetrahymena kodon uyumuna sahip TtsfGFP klonlanmış pVTtsfGFP ifade vektörü. **B.** İçerisine PmeI-ApaI klonlaması ile sfGFP klonlanmış pVsfgFP ifade vektörü.

*T.thermophila* hücrelerinde kodon uyumlu TtsfGFP'nin kodon uyumsuz sfGFP ve EGFP genlerine göre daha erken transkripsiyon ve translasyonunun yapıldığı ve flüoresan ışımaya verdiği ilk olarak mikroskopik olarak analiz edilmiştir. Tetrahymena hücrelerine elektroporasyon yöntemi ile transform edilerek üretilen pVTtsfGFP, pVsfgFP ve pEGFP vektörleri taşıyan klonlar, PPY besiyerinde (100 µg paramomisin/ml) büyütüldükten sonra 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmiş ve sıfıncı zamandan başlanarak 20 dk'da bir Leica DM6000 flüoresan mikroskopta, GFP filtresinde görüntülenmiştir. Sitoplazmik TtsfGFP (pVTtsfGFP), sfGFP (pVsfgFP) ve EGFP (pEGFP) üreten klonlar karşılaştırıldığında, TtsfGFP 20. dk'da ışımaya başlarken, EGFP 40. dk, sfGFP ise 60. dk'da ışımaya başlamıştır (EK 10). Tüm ölçümlerde TtsfGFP klonu en parlak ışımayı verirken, sfGFP klonu daha az, EGFP klonu ise en az ışımayı vermiştir. TtsfGFP klonu flüoresan mikroskopta algılanabilir ışımaya 100. dk'da doygunluğa ulaşırken, sfGFP ve EGFP klonlarının deneysel süre olan 240. dk'da bile bu doygunluğa ulaşamadığı gözlenmiştir (Şekil 3.3) (EK 10).



**Şekil 3.3.** Zamana bağlı flüoresan ışıma deneyinde,  $\text{CdCl}_2$  ile indüklenen Tetrahymena klonlarının 100. dk'daki flüoresan ışımalarının mikroskobik analizi. EGFP ile sfGFP klonları az miktarda ışıma gösterirken, TtsfGFP klonu görsel ışıma olarak doygunluğa ulaşmıştır. Tetrahymena klonları yeşil ışıma yapmaktadırlar, fakat Leica DM6000 flüoresan mikroskobunun kamera kalitesi düşük olduğundan, yeşil flüoresan ışımayı turkuaz renginde algılamaktadır. Bu sebeple elde edilen fotoğraflar “PhotoScape 3.6.3” programı ile flüoresan mikroskop okülerinde görülen görüntünün aslına göre renklendirilmiştir. Görüntüleme 20X objektifle yapılmıştır.

Flüoresan mikroskopunda elde edilen görsel bulguların ölçülebilir karşılaştırması, spektral analizler ile gerçekleştirilmiştir. Tetrahymena TtsfGFP, sfGFP ve EGFP klonları PPY (100  $\mu\text{g/ml}$  paramomisin) besiyerinde büyütülmüş, hücre konsantrasyonları 300.000 hücre/ml'ye ayarlandıktan sonra klonlar 2  $\mu\text{g/ml}$   $\text{CdCl}_2$  ile indüklenmiştir. İndüklemeye birlikte sıfırıncı zamanda dâhil her 30 dk'da bir Molecular Devices Spektramax M2 cihazında 488 nm ekisitasyon / 510 nm emisyonunda flüoresan okuma değerleri toplanmıştır (Ek-11). Üç tekrarlı gerçekleştirilen deneyin flüoresan değerlerinin ortalama çizgi grafiği Şekil 3.4'de verilmiştir.

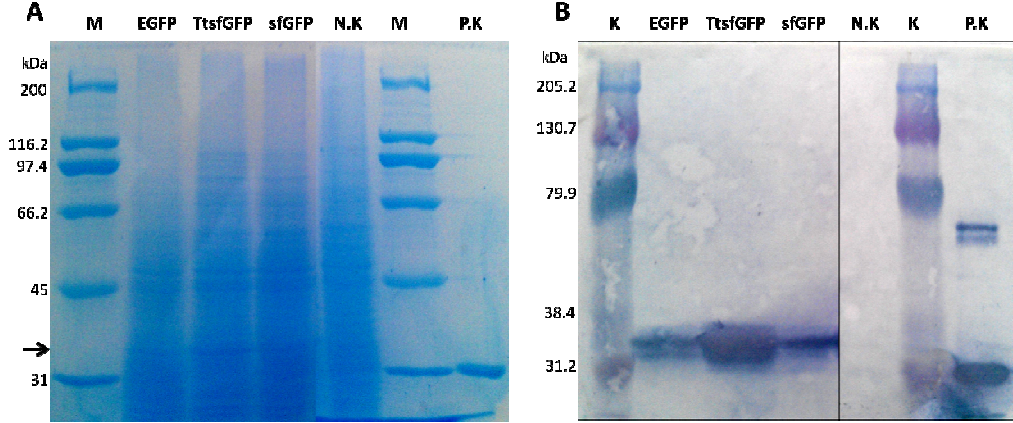


**Şekil 3.4.** TtsfGFP, sfGFP ve EGFP taşıyan Tetrahymena klonlarının zamana bağlı flüoresan ışımalarının karşılaştırılması.  $3 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonundaki hücre kültürleri 2  $\mu\text{g/ml}$   $\text{CdCl}_2$  ile indüklenmiş ve her 30 dk'da bir 488 nm ekisitasyon / 510 nm emisyonunda flüoresan ışımaları ölçülmüştür. Flüoresan ölçümlerin ortalamasının hata barları grafikte çubuk olarak görülmektedir.

Şekil 3.4'de görüldüğü gibi tüm klonlar sıfır zamanında benzer (~500) otoflüoresan veya sızıntılı üretime sahiptir. Klonlar arasında flüoresan ışımaya bakımından en erken ivmelenme gösteren TtsfGFP klonudur. 30. dk'dan itibaren flüoresan ışımada artış başlayan TtsfGFP klonu, 60. dk'dan itibaren bu ışımaya ivmesini artırarak devam etmiştir. sfGFP ve EGFP klonları ise düşük ivmelenme ile flüoresan ışımalarını arttırmışlardır. sfGFP klonunun flüoresan ışımaya artışı 150. dk'dan itibaren daha da yükselen bir grafik çizmektedir. Klonlar arasında en fazla ışımaya sahip olan TtsfGFP 180. dk'da, sfGFP'ye göre ~2.2 kattan daha fazla ışımaya gösterirken, EGFP'ye göre bu fark ~4 kattır.

Tetrahymena klonlarının flüoresan ışımalarının zamana bağlı spektroskopik analizinde elde edilen 180. dk toplam proteinleri, paralel yapılan poliakrilamid SDS jel Comassie boyaması (Şekil 3.5.A) ile Western blot analizine (Şekil 3.5.B) alınmıştır. Şekil 3.5.A'da EGFP, TtsfGFP ve sfGFP üreten Tetrahymena klonlarından izole edilen toplam proteinlerden eşit miktarda poliakrilamid yüklenerek commassie ile boyanmış ve rekombinant GFP'lerin olası

konumu ~34 kDa olarak, ok ile işaretlenmiştir (teorik olarak ~29 kDa büyüklüğündedirler).



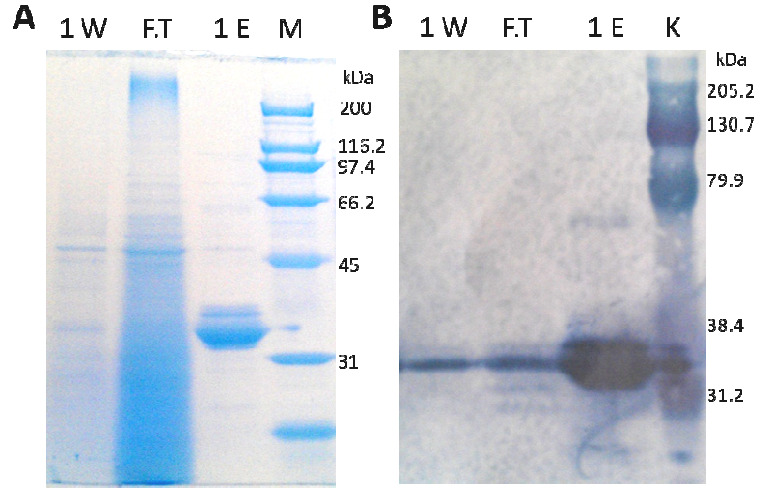
**Şekil 3.5:** CdCl<sub>2</sub> ile indüklenen Tetrahymena klonlarından 180 dk sonra elde edilen pelletlerden saflaştırılan toplam proteinlerin SDS PAGE ve Westen blot analizi. **A. SDS PAGE analizi.** **M:** BioRad standart protein marker. **N.K:** transforme olmamış Tetrahymena (B2086+CU428) hücrelerinin CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesinden sonra izole edilen toplam protein. **P.K:** *E.coli* hücrelerinde üretilmiş, N-terminalinde 6XHis bulunan sfGFP'dir (Teorik olarak ~26 kDa, poliakrilamid jeldeki büyüklüğü ~31 kDa'dur, Ek-12). **B. Western blot analizi.** **K:** BioRad Kaleideskop Western marker. Proteinler eşit miktarda (30 µg) poliakrilamid jelle yüklenmiştir. Poliakrilamid jel %5 paketleme, %10 ayırma şeklinde hazırlanmıştır.

Monoklonal mouse anti-GFP antikoru ile yapılan Western blot analiz (Şekil 3.5.B) bulguları; GFP'lerin ~34 kDa civarında bulunduğunu, TtsfGFP'nin sfGFP ve EGFP'ye göre tahminen 5-10 kat fazla protein olarak üretildiğini göstermiştir. EGFP ve kodon uyumu bulunmayan sfGFP'de ise rekombinant protein miktarı yaklaşık eşit görülmüştür. Pozitif kontrolde antikorların düzgün çalıştığı görülürken, pozitif kontroldeki ~60 kDa civarında koşan bant dimer yapısında bulunan sfGFP proteinine aittir.

### 3.2. Tetrahymena 6XHis-TtsfGFP Takısının Afinitik Saflaştırabilirliği

*T.thermophila*'da rekombinant protein olarak üretildiği, flüoresan mikroskopik, spektroskopik ve toplam protein seviyesinde teyit edilen 6XHis-

TtsfGFP'nin afinitik saflaştırılabilirliği, Ni-NTA afinite saflaştırması SDS-PAGE (Şekil 3.6-A) ve Western blot analizi (Şekil 3.6-B) ile kontrol edilmiştir (Şekil 3.6).

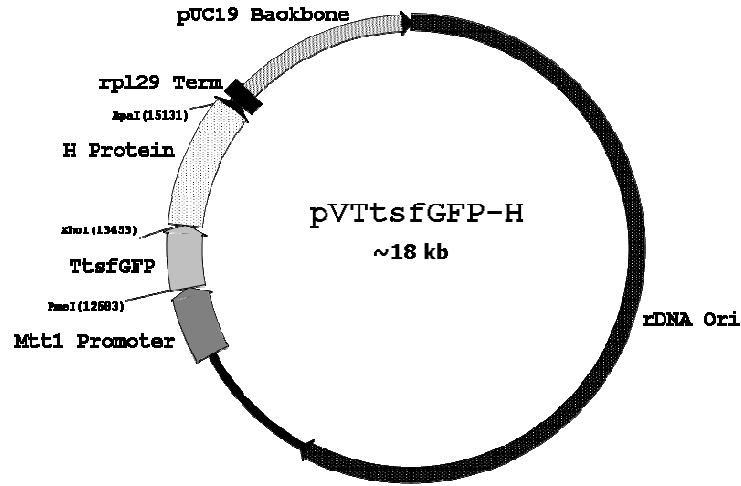


**Şekil 3.6:** pVTtsfGFP taşıyan Tetrahymena klonundan elde edilen toplam proteinden Ni-NTA afinite saflaştırması ile saflaştırılan TtsfGFP'nin SDS PAGE (A) ve Western blot (B) analizi. **1 E:** Ni-NTA afinite saflaştırmasında elde edilen birinci elüsyon. **F.T:** Ni-NTA boncukları ile muamele edilen ve kolona yüklenen toplam proteinlerden ayrılan sıvı kısım. **1 W:** Ni-NTA afinite saflaştırmasında elde edilen birinci yıkama. **M:** BioRad standart protein marker **K:** BioRad Kaleideskop, Western blot marker **A. SDS PAGE analizi. B. Western blot analizi.** Poliakrilamid jel %12'lidir.

Saflaştırma adımlarında toplanan proteinler poliakrilamid jele yüklenerek SDS PAGE (Şekil 3.6 A) ve Western blot (Şekil 3.6 B) analizine alınmıştır. SDS-PAGE'in comassie ile boyanması, yaklaşık olarak ~34 kDa'luk ana bir bandın afinitik olarak saflaştırılabildiğini göstermektedir. Şekil 3.6-A'nın 1E kuyusuna dikkatlice bakıldığında zayıfta olsa 4-5 farklı protein bandının kontaminant olarak bulunduğu görülmektedir. Western blot analizi, Şekil 3.6-A'de görülen ~34 kDa proteinin, monoklonal mouse anti-GFP antikoru ile TtsfGFP olduğu belirlenmiştir. Şekil 3.6 B'de TtsfGFP saflaştırmasında beklenen büyüklükteki bant ~34 kDa elde edilmiştir. TtsfGFP 1 E'de görülen ~68 kDa büyüklüğündeki silik bant ise dimerize olmuş TtsfGFP'dir.

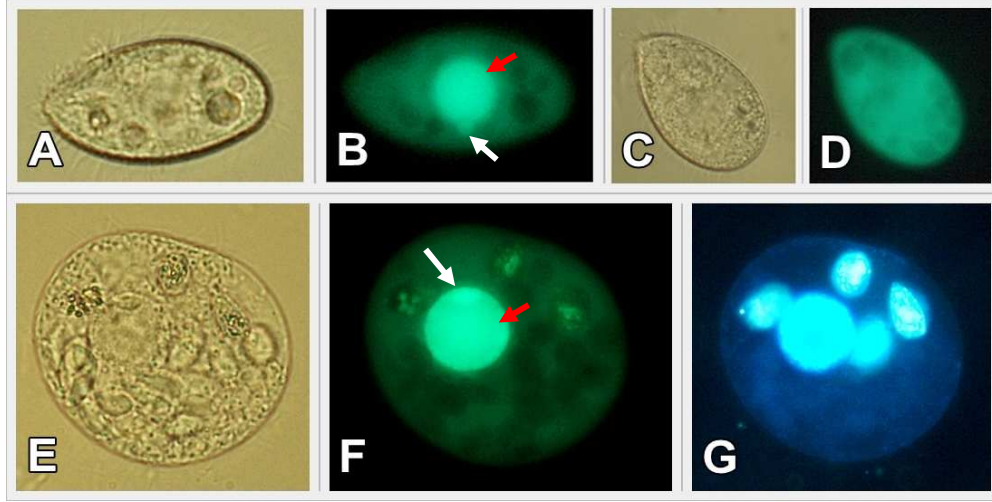
### 3.3. TtsfGFP-H Füzyon Proteininin Makroçekirdek ve Mikroçekirdek Lokalizasyonu

Gen lokalizasyonu ile afinitik saflaştırmada eşzamanlı kullanımı hedeflenen, aynı zamanda proteinlerin saflaştırma adımlarında görsel olarak takip edilebilmesi için tasarlanan 6XHis-TtsfGFP takısının deneysel testi hipotetik bir Tetrahymena proteini (H) (NCBI Ulaşım Numarası: XM\_001011861.1) ile yapılmıştır. Tetrahymena hipotetik proteini (H) kodlayan genin 1668 bç'lik cDNA'sı pVTtsfGFP vektörünün XhoI-ApaI kısmına klonlanmış ve pVTtsfGFP-H ismi verilmiştir (Şekil 3.7). 6XHis-TtsfGFP-H füzyon proteini hem gen lokalizasyonu deneylerinde hemde Ni-NTA affinitik saflaştırma deneylerinde kullanılmıştır.



**Şekil 3.7.** pVTtsfGFP-H ifade vektörü. pVTtsfGFP vektörüne, Tetrahymena hipotetik proteini kodlayan H geninin XhoI-ApaI klonlaması sonucunda yerleştirilmesi ile oluşturulmuştur.

Tetrahymena pVTtsfGFP-H klonu büyütüldükten sonra gen lokalizasyonu amacıyla bir kısmı yavaş transkripsiyon için 0.25 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile diğer kısmı ise hızlı transkripsiyon için 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile 1 saat indüklenmiştir [37].

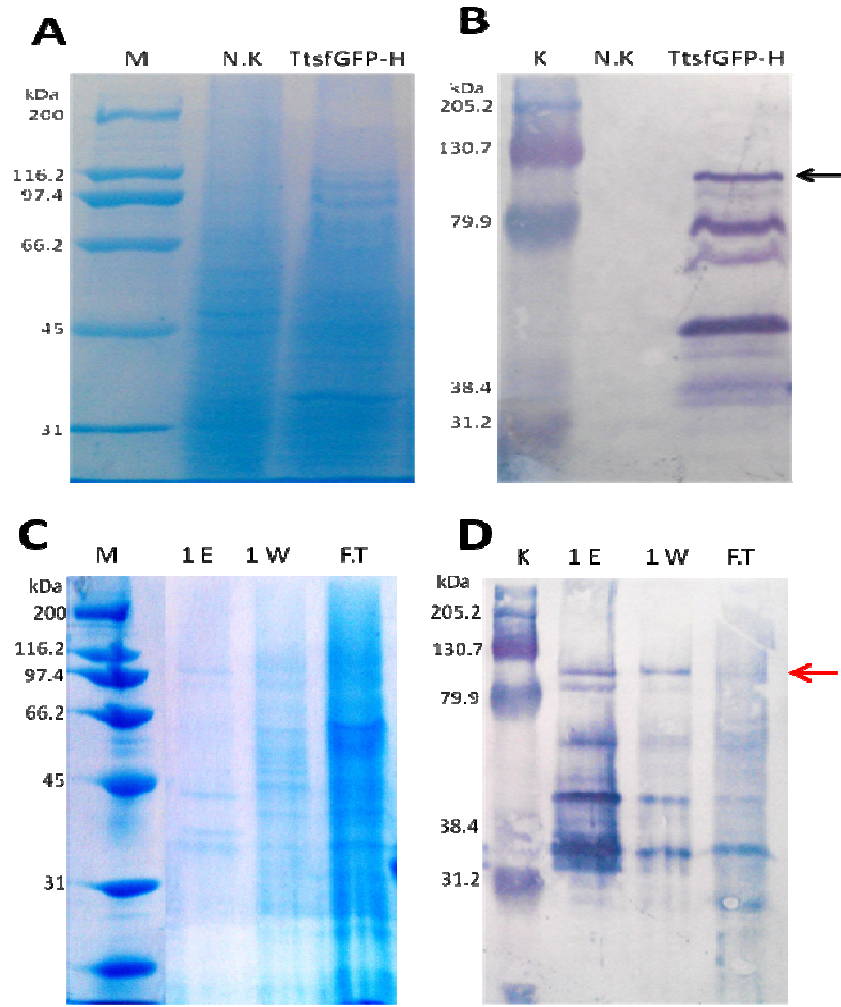


**Şekil 3.8.** Tetrahymena pVTsfGFP-H klonunun CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesinden sonra flüoresan mikroskopta incelenmesi. **A, E.** 0.25 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile yarım saat indüklenmiş Tetrahymena pVTsfGFP-H klonunun ışık mikroskopundaki görünümü ile flüoresan mikroskopundaki (GFP filtresinde) görünümü (**B, F**). **C.** 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile 1 saat indüklenmiş pVTsfGFP-H klonunun ışık mikroskopundaki görünümü ile flüoresan mikroskop GFP filtresindeki görünümü (**D**). **G.** 0.25 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmiş klonun Hoechst33250 boyası ile boyandıktan sonra flüoresan mikroskoptaki (A filtresi) görünümü. Görüntülemeler 40X objektifte yapılmıştır.

Şekil 3.8-B ve -F’de Tetrahymena hipotetik proteininin (6XHis-TtsfGFP-H), hücrenin makro (kırmızı ok) ve mikro (beyaz ok) çekirdeğine lokalize olduğu, 0.25 µg/ml CdCl<sub>2</sub> düşük indüksiyonu ile görülmüştür. Makro çekirdek dışındaki parlamalar, ışık mikroskopunda da (E) görülen besin kofulu içerisinde yeralan maddelerden geldiği düşünülmektedir (Şekil 3.8-F). TtsfGFP-H’nin makro ve mikro çekirdekte lokalize olduğunun teyidi çekirdeklerin içinde yeralan genomik DNA’nın Hoechst33250 boyası ile boyanmasından anlaşılmaktadır. Bunun yanında Şekil 3.8-D’de görüldüğü üzere, 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> indüklemesiyle yüksek transkripsiyon sonucunda fazla TtsfGFP-H protein üretimi yapıldığı, dolayısıyla tüm hücrenin parladığı ve lokalizasyon sinyalininde baskılandığı görülmektedir.

Gen lokalizasyonu makroçekirdek ile mikroçekirdekte olduğu gösterilen 6XHis-TtsfGFP-H füzyon proteinin beklenen büyüklüğü ~95 kDa’dur. pVTtSfGFP-H klonundan saflaştırılan toplam protein ile yapılan Western blot analizi, beklenen büyüklük olan ~95 kDa’da bant bulunduğunu göstermiştir (Şekil

3.9.B, siyak ok). Bunun yanında daha küçük büyüklüklerde yaklaşık 6 adet bantta monoklonal mouse anti-GFP antikoru ile belirlenmiştir. Bu daha küçük büyüklüklerdeki protein bantları, kırılmış veya üretimi yarım kalmış 6XHis-TtsfGFP-H füzyon protein kalıntılarıdır. Aynı zamanda bu toplam proteinden Ni-NTA saflaştırması yapılarak gerçekleştirilen SDS-PAGE ve Western blot analizleri, azda olsa ~95 kDa'luk 6XHis-TtsfGFP-H füzyon proteininin saflaştırılabildiğini göstermiştir (Şekil 3.9.D, kırmızı ok). SDS PAGE ve Western blot analizi sonuçlarına bakıldığında, 6XHis-TtsfGFP-H füzyon proteininin lokalizasyonu ile eşzamanlı Ni-NTA affinite saflaştırılmasının başarılı olduğu görülmüştür.



**Şekil 3.9:** pVTtsfGFP-H taşıyan Tetrahymena hücrelerinin 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile 18 saat indüklenmesinden sonra saflaştırılan toplam protein ve toplam proteinden Ni-NTA afinite saflaştırması ile saflaştırılan TtsfGFP-H. **A,B** toplam protein SDS PAGE ve Western blot analizi. **C,D** Ni-NTA afinite saflaştırması SDS PAGE ve Western blot analizi. **M:** BioRad standart protein marker. **N.K:** transforme olmamış Tetrahymena (B2086+CU428) hücrelerinin CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmesinden sonra izole edilen toplam protein. **1 E:** Ni-NTA affinite saflaştırmasında elde edilen birinci elüsyon. **F.T:** Ni-NTA boncukları ile muamele edilen ve kolona yüklenen toplam proteinlerden ayrılan sıvı kısım. **1 W:** Ni-NTA affinite saflaştırmasında elde edilen birinci yıkama. **K:** BioRad Kaleideskop, Western blot marker. Poliakrilamid jel %12’lidir.

#### 4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Tetrahymena’da yapılan gen lokalizasyon çalışmalarında genellikle EGFP flüoresan takısı kullanılmakta olup, son yıllarda EGFP, Tetrahymena’ya kodon uyumu yapılmış ve C-terminal takısı olarak geliştirilmiştir [4–13]. Kataoka ve ark. (2010) çalışmalarında EGFP’nin Tetrahymena’ya kodon uyumunu gerçekleştirmiş ve sadece gen lokalizasyonunda kullanımını araştırmışlardır. Fakat kodon uyumlu EGFP’nin translasyon verimliliği ile flüoresan ışımasında artış olup olmadığı hakkında bir çalışmada bulunmamışlardır. sfGFP, EGFP mutantına göre daha hızlı ve güçlü ışıması, yüksek çözünürlüğü ile füzyon olarak üretildiği bazı zayıf katlanan, çözünürlüğü düşük proteinlerin üretimini kolaylaştırması ve proteinlerin depolanabilirliğini arttırarak, işlevselliğini koruma ile raf ömrünü uzatması gibi üstün özelliklere sahiptir [23,26]. Bu özelliklere sahip sfGFP temelinde, *T.thermophila*’da gen lokalizasyonu ile afinitik saflaştırmada eşzamanlı kullanılabilen ve saflaştırma esnasında, füzyon proteininin görsel olarak takibini kolaylaştıracak şekilde tasarlanmış, 6XHis-TsfGFP takısının geliştirilmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Çalışmamızın flüoresan mikroskopi ve flüoresans ölçüm bulguları, Tetrahymena kodon uyumlu 6XHis-TsfGFP genini içeren klonun, EGFP ve kodon uyumsuz sfGFP kontrol klonlarına göre daha erken (20-30 dk arasında) ve çok daha güçlü (~2-4 kat) ışıma yaptığını göstermiştir. Yeni geliştirilen bu takı, ATP bağımlı DNA ligaz domaini içeren hipotetik bir Tetrahymena proteininin N-terminaline eklenmiş ve 6XHis-TsfGFP-H füzyon proteininin Tetrahymena hücrelerinde, makro ve mikroçekirdeğe lokalize olduğunu ortaya koyulmuştur. Eşzamanlı olarak, gen lokalizasyonu yapılan 6XHis-TsfGFP-H füzyon proteininin Ni-NTA ile affinitik saflaştırılabildiği Western blot ile teyit edilmiş; bu takının iki amaçlı kullanımının mümkün olduğunu gösterilmiştir.

Rekombinant proteini kodlayan genin, üretim yapılacak konakçıya kodon uyumu, üretim verimliliği açısından önemlidir [32,33,45]. Tetrahymena’da, heterolog proteinlerden insan DNase-I ile neomisin direnç (Neo4) geninin kodon uyumu yapılarak üretilmesi, bu genlerin translasyon verimliliğini arttırarak, üretilen protein miktarında artış sağlamıştır [44,46]. Kodon uyum çalışmaları,

*T.thermophila*'da üretilecek veya kullanılacak heterolog proteinlerin kodon uyumuna ihtiyaç olduğunu işaret etmektedir. Çalışmamızda, *T.thermophila*'da heterolog sfGFP'nin kodon uyumlu versiyonunun (6XHis-TtsfGFP) kontrole göre çok daha etkin üretildiği gösterilerek, bu durum desteklenmiştir (Şekil 3.5). Zolotukhin ve ark. (1996)'nın insan kodon uyumuyla ürettikleri GFP'nin, kodon uyumsuz kontrole göre 22-45 kat fazla alıgılanabilir olduğunu bildirmesi ile Leroy ve ark. (2011) fungus *Botrytis cinerea*'da kodon optimize edilmiş EGFP'nin ışımada artış göstermesi, çalışmamızın flüoresan mikroskopik ve spektral okuma bulgularına paralellik göstermektedir [47,48].

GFP'lerin protein lokalizasyon takısı olarak yaygın kullanımına karşın, füzyon proteinleri saflaştırmada kullanılabilecek afinitik özellikleri bulunmamaktadır. Buna karşılık anti-GFP antikoları ile çöktürülerek, doğru katlanmış GFP'li füzyon proteinler saflaştırılabilmektedir [8,49]. GFP'lerin afinite eksikliği, uygun uçlarına 6XHis gibi afinitik takılar takılarak aşılabilmektedir. Bu yaklaşım insan ve *E. coli* gibi canlılarda kullanılırken, *Tetrahymena*'da kullanımı henüz bilinmemektedir. *E. coli*'de hedef proteine N-terminal veya C-terminal olarak eklenen afinitik-flüoresan poliHis-GFP takısı, füzyon proteinin afinitik saflaştırılmasında görsel takibini sağlamıştır [27–29,50]. *E. coli*'de yapılan bir çalışmada ise çözünürlüğü düşük olan TEV proteazın, sfGFP-linker-TEV-6XHis şeklindeki tasarımı ile üretimi yapılarak, hem üretimi ~%22 arttırılmış hemde afinitik olarak saflaştırabilmiştir [26]. Çalışmamızda yapılandırdığımız pVTsfGFP-H vektörü ile ürettirilen 6XHis-TtsfGFP-H füzyon proteininin hem hücre içi lokalizasyonu belirlenmiş hemde Ni-NTA saflaştırması ile saflaştırılabildiği gösterilmiştir (Şekil 3.9 C-D). N- veya C-terminaline afinite takısı eklenerek afinitik özellik kazandırılan GFP'lerin yanında, farklı bir tasarım olarak GFP'nin  $\beta$ -tabakalarını birbirine bağlayan bir ilmek (loop) dizisinin içine, entegre edilen affinite protein dizileri vasıtasıyla, GFP'ler affinitik saflaştırmaya uygun hale de getirilmiştir. Örneğin; EGFP  $\beta$ -tabakaları arasında yer alan Asp173 ile Gly174 aminoasitleri arasına yerleştirilen “8XHis-SBP (streptavidin bağlama protein)-cMyc takısı” ile EGFP'ye afinitik özellik kazandırılmış, fakat kısmende olsa emisyon kaybı olduğu bildirilmiştir [51]. *Tetrahymena* için yapılandırdığımız 6XHis-TtsfGFP afinitik takısının, hedef proteinin N-terminaline füzyon

olmasından dolayı, saflaştırmada istenilmeyen translasyonu yarım kalmış veya kırılmış proteinler de afinitik olarak saflaştırılmaktadır (Şekil 3.9). Bu durum, TtsfGFP'nin C-ucuna 6XHis takısının takılması ve yeni TtsfGFP-6XHis lokalizasyon-afinite takısında hedef proteinin C-ucuna eklenmesi gerektiğini önermektedir. Bu yönde takı geliştirme çalışmaları tarafımızca sürdürülmektedir. 6XHis-TtsfGFP-H proteinin Ni-NTA afinite saflaştırmasında, hedef protein nispeten az miktarda elde edilmiştir. Bunun nedenlerinden biri daha küçük boyutlu kontaminant bantların Ni-NTA boncuklarını meşgul etmesi ve asıl hedef proteinin bağlanmasını azaltması ile yıkama adımında hedef proteinin kaybı iken, diğer bir nedeni de toplam protein izolasyonunda kullanılan T100B lizis tamponunun Tetrahymena hücrelerinden ilk seferde ~%80 toplam protein saflaştırmasıdır. Dolayısı ile tek seferde yapılan izolasyonda daha çok sitoplazmik proteinler elde edilirken organellerde bulunan proteinler ile zar proteinleri daha düşük seviyede izole edilmektedir. Tetrahymena hücrelerinde makro ve mikro çekirdeğe lokalize olan Tetrahymena H hipotetik proteininin düşük, kontaminant proteinlerin yüksek seviyede elde edilmesinin sebebinin yukarıda sayılan nedenler olduğu düşünülmektedir. Dolayısı ile bu veriler, protein izolasyon yönteminin füzyon olarak üretilen proteinlerin hücrede bulunduğu bölgeye göre uyarlanması gerektiğini göstermektedir.

Sonuç olarak; hedef proteinin Tetrahymena'da hücre içi lokalizasyonu ve görsel afinitik saflaştırılmasında eş zamanlı kullanılabilecek, *T.thermophila* 6XHis-TtsfGFP takısı geliştirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] E. Orias, E. P. Hamilton, and J. D. Orias, "Tetrahymena as a laboratory organism: useful strains, cell culture, and cell line maintenance.," *Methods in cell biology*, vol. 62, no. 179, pp. 189–211, Jan. 2000.
- [2] D. L. Nanney and E. M. Simon, "Laboratory and evolutionary history of Tetrahymena thermophila.," *Methods in cell biology*, vol. 62, pp. 3–25, Jan. 2000.
- [3] D. M. Cassidy-hanley, *Tetrahymena in the Laboratory: Strain Resources, Methods for Culture, Maintenance, and Storage*, no. 607. 2012.
- [4] N. C. Elde, G. Morgan, M. Winey, L. Sperling, and A. P. Turkewitz, "Elucidation of clathrin-mediated endocytosis in tetrahymena reveals an evolutionarily convergent recruitment of dynamin.," *PLoS genetics*, vol. 1, no. 5, p. e52, Nov. 2005.
- [5] K. Kataoka, U. E. Schoeberl, and K. Mochizuki, "Modules for C-terminal epitope tagging of Tetrahymena genes.," *Journal of microbiological methods*, vol. 82, no. 3, pp. 342–6, Sep. 2010.
- [6] C. D. Malone, K. a Falkowska, A. Y. Li, S. E. Galanti, R. C. Kanuru, E. G. LaMont, K. C. Mazarella, A. J. Micev, M. M. Osman, N. K. Piotrowski, J. W. Suszko, A. C. Timm, M.-M. Xu, L. Liu, and D. L. Chalker, "Nucleus-specific importin alpha proteins and nucleoporins regulate protein import and nuclear division in the binucleate Tetrahymena thermophila.," *Eukaryotic cell*, vol. 7, no. 9, pp. 1487–99, Sep. 2008.
- [7] B. Cui, Y. Liu, and M. a Gorovsky, "Deposition and function of histone H3 variants in Tetrahymena thermophila.," *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 20, pp. 7719–30, Oct. 2006.
- [8] R. a Howard-Till, A. Lukaszewicz, M. Novatchkova, and J. Loidl, "A single cohesin complex performs mitotic and meiotic functions in the protist tetrahymena.," *PLoS genetics*, vol. 9, no. 3, p. e1003418, Mar. 2013.
- [9] C. L. Kilburn, C. G. Pearson, E. P. Romijn, J. B. Meehl, T. H. Giddings, B. P. Culver, J. R. Yates, and M. Winey, "New Tetrahymena basal body protein components identify basal body domain structure.," *The Journal of cell biology*, vol. 178, no. 6, pp. 905–12, Sep. 2007.
- [10] C. J.-L. Busch, A. Vogt, and K. Mochizuki, "Establishment of a Cre/loxP recombination system for N-terminal epitope tagging of genes in Tetrahymena.," *BMC microbiology*, vol. 10, p. 191, Jan. 2010.

- [11] R. E. Hosein, S. A. Williams, K. Haye, and R. H. Gavin, "Expression of GFP-actin leads to failure of nuclear elongation and cytokinesis in *Tetrahymena thermophila*," *The Journal of eukaryotic microbiology*, vol. 50, no. 6, pp. 403–8, 2007.
- [12] R. Heim, A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien, "Improved green fluorescence.," *Nature*, vol. 373, no. 6516, pp. 663–4, Feb. 1995.
- [13] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, and S. Falkow, "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).," *Gene*, vol. 173, no. 1 Spec No, pp. 33–8, Jan. 1996.
- [14] H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, and J. Winant, "Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*," *Biochemistry*, vol. 13, no. 12, pp. 2656–62, Jun. 1974.
- [15] R. Y. Tsien, "THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN," 1998.
- [16] M. Zimmer, "Green Fluorescent Protein ( GFP ): Applications , Structure , and Related Photophysical Behavior," 2002.
- [17] F. Yang, L. G. Moss, and G. N. Phillips, "The molecular structure of green fluorescent protein.," *Nature biotechnology*, vol. 14, no. 10, pp. 1246–51, Oct. 1996.
- [18] M. Orm, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington, "Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein," *Science*, vol. 273, no. 5280, pp. 1392–1395, Sep. 1996.
- [19] R. Heim, D. C. Prasher, and R. Y. Tsien, "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 26, pp. 12501–4, Dec. 1994.
- [20] A. B. Cubitt, L. A. Woollenweber, and R. Heim, "Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.," *Methods in cell biology*, vol. 58, no. November, pp. 19–30, Jan. 1999.
- [21] G. H. Patterson, S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain, and D. W. Piston, "Use of the Green Fluorescent Protein and Its Mutants in Quantitative Fluorescence Microscopy," vol. 73, no. November, pp. 2782–2790, 1997.
- [22] N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. a Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, and R. Y. Tsien, "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein.," *Nature biotechnology*, vol. 22, no. 12, pp. 1567–72, Dec. 2004.

- [23] J.-D. Pédelacq, S. Cabantous, T. Tran, T. C. Terwilliger, and G. S. Waldo, "Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein.," *Nature biotechnology*, vol. 24, no. 1, pp. 79–88, Jan. 2006.
- [24] B. T. Andrews, A. R. Schoenfish, M. Roy, G. Waldo, and P. a Jennings, "The rough energy landscape of superfolder GFP is linked to the chromophore.," *Journal of molecular biology*, vol. 373, no. 2, pp. 476–90, Oct. 2007.
- [25] A. C. Fisher and M. P. DeLisa, "Laboratory evolution of fast-folding green fluorescent protein using secretory pathway quality control.," *PloS one*, vol. 3, no. 6, p. e2351, Jan. 2008.
- [26] X. Wu, D. Wu, Z. Lu, W. Chen, X. Hu, and Y. Ding, "A novel method for high-level production of TEV protease by superfolder GFP tag.," *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol. 2009, p. 591923, Jan. 2009.
- [27] H. Liu and J. H. Naismith, "A simple and efficient expression and purification system using two newly constructed vectors.," *Protein expression and purification*, vol. 63, no. 2, pp. 102–11, Feb. 2009.
- [28] L. Al-homsi, J. M. Assaad, M. Kweider, S. Al-okla, and Q. A. Abbady, "Construction of pRSET-sfGFP Plasmid for Fusion-Protein Expression," vol. 5, no. 4, pp. 279–288, 2012.
- [29] C.-H. Lee, "Recombinant Green Fluorescent Protein Derivatives as a Fusion Tag for in vitro Experiments," *Interdisciplinary Bio Central*, vol. 1, no. 1, pp. 1–15, Mar. 2009.
- [30] C. a Scorer, M. J. Carrier, and R. F. Rosenberger, "Amino acid misincorporation during high-level expression of mouse epidermal growth factor in Escherichia coli.," *Nucleic acids research*, vol. 19, no. 13, pp. 3511–6, Jul. 1991.
- [31] K. Zahn, "Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth.," *Journal of bacteriology*, vol. 178, no. 10, pp. 2926–33, May 1996.
- [32] J. F. Kane, "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli.," *Current opinion in biotechnology*, vol. 6, no. 5, pp. 494–500, Oct. 1995.
- [33] A. M. Baca and W. G. Hol, "Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of Plasmodium and other AT-rich parasite genes in Escherichia coli.," *International journal for parasitology*, vol. 30, no. 2, pp. 113–8, Feb. 2000.

- [34] R. Kim, S. J. Sandler, S. Goldman, H. Yokota, J. Clark, and S. Kim, "Overexpression of archaeal proteins in *Escherichia coli*," vol. 20, no. 3, pp. 207–210, 1998.
- [35] H. M. W. Salim, K. L. Ring, and A. R. O. Cavalcanti, "Patterns of codon usage in two ciliates that reassign the genetic code: *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*," *Protist*, vol. 159, no. 2, pp. 283–98, Apr. 2008.
- [36] J. Gaertig, L. Gu, B. Hai, and M. a Gorovsky, "High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*," *Nucleic acids research*, vol. 22, no. 24, pp. 5391–8, Dec. 1994.
- [37] F. Boldrin, G. Santovito, J. Gaertig, D. Wloga, D. Cassidy-hanley, T. G. Clark, and E. Piccinni, "Metallothionein Gene from *Tetrahymena thermophila* with a Copper-Inducible-Repressible Promoter Metallothionein Gene from *Tetrahymena thermophila* with a Copper-Inducible-Repressible Promoter," *Eukaryotic cell*, vol. 5, pp. 422–425, 2006.
- [38] T. Maniatis, E. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [39] J. Gaertig and M. a Gorovsky, "Efficient mass transformation of *Tetrahymena thermophila* by electroporation of conjugants," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 19, pp. 9196–200, Oct. 1992.
- [40] S. Barchetta, A. La Terza, P. Ballarini, S. Pucciarelli, and C. Miceli, "Combination of two regulatory elements in the *Tetrahymena thermophila* HSP70-1 gene controls heat shock activation," *Eukaryotic cell*, vol. 7, no. 2, pp. 379–86, Feb. 2008.
- [41] G. Jacek and K. Geoffrey, *Methods in cell biology*, vol. 62. Academic Press, 1999, pp. 486–498.
- [42] Y. Shang, X. Song, J. Bowen, R. Corstanje, Y. Gao, J. Gaertig, and M. a Gorovsky, "A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 6, pp. 3734–9, Mar. 2002.
- [43] Z. Xiaoqing and T. G. A. Jr., "An apparent association between glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and a sphingolipid in *Tetrahymena mimbres*," *Biochemistry Journal*, vol. 323, pp. 197–206, 1997.

- [44] T. Weide, L. Herrmann, U. Bockau, N. Niebur, I. Aldag, W. Laroy, R. Contreras, A. Tiedtke, and M. W. W. Hartmann, "Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*," *BMC biotechnology*, vol. 6, p. 19, Jan. 2006.
- [45] E. Angov, C. J. Hillier, R. L. Kincaid, and J. a Lyon, "Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host.," *PloS one*, vol. 3, no. 5, p. e2189, Jan. 2008.
- [46] K. Mochizuki, "High efficiency transformation of *Tetrahymena* using a codon-optimized neomycin resistance gene.," *Gene*, vol. 425, no. 1–2, pp. 79–83, Dec. 2008.
- [47] S. Zolotukhin, M. Potter, W. W. Hauswirth, J. Guy, and N. Muzyczka, "A 'humanized' green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells.," *Journal of virology*, vol. 70, no. 7, pp. 4646–54, Jul. 1996.
- [48] M. Leroch, D. Mernke, D. Koppenhoefer, P. Schneider, A. Mosbach, G. Doehlemann, and M. Hahn, "Living colors in the gray mold pathogen *Botrytis cinerea*: codon-optimized genes encoding green fluorescent protein and mCherry, which exhibit bright fluorescence.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 77, no. 9, pp. 2887–97, May 2011.
- [49] "A genius for quantitative immunoprecipitation of GFP fusion proteins.," 2013. [Online]. Available: <http://www.allelebiotech.com/content/pdf/GFP-Trap.pdf>.
- [50] S. Cabantous, T. C. Terwilliger, and G. S. Waldo, "Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein.," *Nature biotechnology*, vol. 23, no. 1, pp. 102–7, Jan. 2005.
- [51] T. Kobayashi, N. Morone, T. Kashiya, H. Oyamada, N. Kurebayashi, and T. Murayama, "Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for a wide variety of protein research.," *PloS one*, vol. 3, no. 12, p. e3822, Jan. 2008.
- [52] G. Bertani, "Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems.," *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, vol. 186, no. 3, 2004.
- [53] G. Bertani, "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*.,," *Journal of bacteriology*, vol. 62, no. 3, pp. 293–300, Sep. 1951.

- [54] P. Guerry, D. J. LeBlanc, and S. Falkow, "General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid.," *Journal of bacteriology*, vol. 116, no. 2, pp. 1064–6, Nov. 1973.
- [55] J. E. Mertz and R. W. Davis, "Cleavage of DNA by R 1 restriction endonuclease generates cohesive ends.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 69, no. 11, pp. 3370–4, Nov. 1972.
- [56] M. J. Engler and C. C. Richardson, "DNA Ligases," in *The enzymes*, 3rd ed., P. D. Boyer, Ed. New York: ACADEMIC PRESS, 1982, pp. 1–29.
- [57] New England Biolabs, "T4 DNA Ligase," 2001. [Online]. Available: <https://www.neb.com/products/m0202-t4-dna-ligase>.
- [58] S. Ymer, "Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency.," *Nucleic acids research*, vol. 19, no. 24, p. 6960, Dec. 1991.
- [59] G. Detlef and T. Clackson, "Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction," *Nucleic acids research*, vol. 17, no. 10, p. 4000, 1989.
- [60] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Analytical biochemistry*, vol. 72, pp. 248–54, May 1976.
- [61] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasherf, "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression," no. 1988, 1992.
- [62] O. Hobert and P. M. Lorient, *GREEN FLUORESCENT PROTEIN Properties, Applications, and Protocols*, Second. New Jersey: A JOHN WILEY & SONS, INC, 2005.
- [63] Q. J. Wang, D. Bhattacharyya, S. Garfield, K. Nacro, V. E. Marquez, and P. M. Blumberg, "Differential localization of protein kinase C delta by phorbol esters and related compounds using a fusion protein with green fluorescent protein.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 52, pp. 37233–9, Dec. 1999.
- [64] C. Kurland and J. Gallant, "Errors of heterologous protein expression.," *Current opinion in biotechnology*, vol. 7, no. 5, pp. 489–93, Oct. 1996.

## Ek-1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- Trizma Base (Applichem A2264).
- Tris-Hcl (Sigma, 05432).

Hem plazmit DNA izolasyonunda hem de Tetrahymena'ları açlığa almada kullanılmıştır. Plazmit izolasyonunda 500 mM pH 8.0 de hazırlanırken; Tetrahymena açlık tamponunda 10 mM pH 7.5 hazırlanmıştır. Çözücü olarak dH<sub>2</sub>O kullanılmıştır. Ayrıca SDS-PAGE deneyinde, poliakrilamid jelin hazırlanmasında 500 mM konsantrasyonda pH 6.8 ve 8.8'de kullanılmıştır.

- Borik Asit (Bio Basic BB0044)
- Sodyum Asetat (NaOAc) (Sigma, 241245)

Plazmit DNA izolasyonunda 0.3 M konsantrasyonda kullanılmıştır.

- Amonyum Asetat (NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) (Reidel de Haen, S170594)

Plazmit DNA izolasyonunda 7.5 M pH 5.5 de kullanılmıştır.

- Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma, E8751)

Çözücü olarak dH<sub>2</sub>O kullanılırken, konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan çözelti +4 °C'de muhafaza edilmelidir. Agaroz jel elektroforezinde, jel içerisinde bulunan DNA'lara bağlanarak en iyi 285 nm UV eksitasyonda ışıma yaparak DNA'ların görünür olmasını sağlamaktadır. Agaroz jel içerisinde 0.5 µg/ml EtBr olacak şekilde hazırlanmalıdır.

- EDTA (Sigma,E6758)

EDTA 0.5 M konsantrasyonda hazırlanmıştır. EDTA düşük pH'larda çözünür olmadığından, gerekli miktarda tartılan EDTA hazırlanmak istenen hacmin yarısı dH<sub>2</sub>O ile karıştırılır. Karışımın pH'sı NaOH tabletleri ile 8.0 a ayarlanır ve karışımındaki EDTA'nın çözünmesi sağlanır. Çözelti berrak hale geldiğinde toplam hacim istenilen seviyeye dH<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

- Agaroz (Biomax, IB70073)

Agaroz jel elektroforezinde kullanılmıştır. PZR, plazmit izolasyonu, restriksiyon kesim reaksiyonları gibi deneylerin ardından DNA ürünlerinin

büyükliklerine göre ayrılması için kullanılan porlu yapıdaki matriksdir. %0.8-%1'lik gibi değişen yoğunluklarda kullanılmıştır. Çözücü tampon olarak 1X'lik TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) kullanılmıştır.

- 10X TBE (Tris- Borik Asit- EDTA)  
10X TBE tamponu hazırlamak için 108 gr Trizma base ve 55 gr borik asit tartılarak 600 ml dH<sub>2</sub>O' da çözülür. Daha sonra karışımın üzerine 40 ml 0.5 M pH 8.0 EDTA eklenir ve çözünmesi için karıştırılır. EDTA çözündükten sonra toplam hacim 1 lt'ye tamamlanır.
- Kalsiyum Klorür (CaCl<sub>2</sub>) (Sigma, C1016)  
Kimyasal kompatent *E. coli* hazırlığında 50 mM konsantrasyonda kullanılmıştır.
- Fenol-Kloroform-İzoamil alkol (24:23:1) (Sigma P2069)  
Plazmit DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Fenol-Kloroform-İzoamil alkol'ün pH dengelemesi "Equilibration Buffer" ile sağlanmıştır. Çünkü plazmit DNA izolasyonunda fenolik fazın pH 8 civarında olması gerekmektedir. pH dengelemesi için Fenol-Kloroform-İzoamil alkolün üzerine, ürünün yanında verilen Equilibration Bufferın tamamı eklenerek karıştırılır ve en az 2-4 saat arası beklenir. Böylelikle pH 6.7± 0.2'den 8.0 ± 0.2 ye yükselecektir.
- Sodyum Klorür, NaCl (Merck, 1.06400).
- İzopropanol (Riedel de Haen, 24137).
- Etanol (Riedel, 071029)
- Metanol (Reidel de Haen, 24229)
- Amfisilin (Sigma, A0104)  
Stok 1000X amfisilin hazırlığı için 100 mg amfisilin 1 ml steril dH<sub>2</sub>O'da çözülür. Hazırlanan stoğun sterilizasyonu 0.45 µm por çaplı membran filtre ile yapılır. Steril edilen stok -20 °C'de muhafaza edilir.
- Paramomisin (Sigma, P9297)
- Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (Sigma, P4333)
- Gliserol (Sigma G2289)

Gliserol *E. coli* hücrelerinin -80 °C stok yapılmasında kullanılmıştır. Steril dH<sub>2</sub>O ile %80 lik hazırlanan gliserol otoklav edildikten sonra +4 °C’de muhafaza edilir.

- HEPES (Bio Basic Canada, HB024)  
Zwitterion yapıda kimyasal organik çözücüdür. Konjugatif Tetrahymena’ların elektroporasyon ile transformasyonunda, hücrelerin yıkanması ve çözülmesinde kullanılmıştır. HEPES 10 mM pH 7.5’e ayarlandıktan sonra 0.45 µm por çaplı membran filtre ile steril edilerek +4 °C’de muhafaza edilir.
- Kadmiyum Klorür (CdCl<sub>2</sub>) (Sigma, 439800)  
Suda oldukça çözünür bir yapıya sahip olan CdCl<sub>2</sub>, Mtt1 promotörü içeren vektörler ile transform olmuş Tetrahymena klonlarının indüklenmesinde kullanılmıştır. CdCl<sub>2</sub>, Mtt1 promotörüne bağlanarak aktif hale geçmesini ve bu promotor kontrolündeki genin kontrollü bir şekilde ifade edilmesini sağlar. Stok 1 mg/ml olarak hazırlanan CdCl<sub>2</sub>, indükleme deneylerinde 2 µg/ml olacak şekilde kullanılmıştır.
- Ni-NTA agaroz (QIAGEN, 30230)  
6X Histidin takılı proteinlerin affinitik saflaştırılmasında kullanılmıştır. Nikel (Ni) tanecikleri ile yüklenmiş olan agaroz, Nikele afinite gösteren 6X Histidin takılı proteinler bağlanırken, diğer proteinler ve istenmeyen yapıların ayrılmasını sağlar.
- Hoechst 33258 (Sigma, 861405)
- Paraformaldehit (Sigma, P6148)
- Sodium dodecyl sulfate, SDS (AppliChem, A2263)
- Glisin (Bio Basic, DR0235)
- TEMED (Fisher Scientific, BP150)
- APS (Ammonium persulfate) (Sigma, A3678)
- Akrilamid/Bisakrilamid (Sigma, A3574)
- Bromophenol Blue (Sigma, B0126)
- β-merkapto etanol (Sigma, M7522)
- Western Blocker (Sigma, W0138)
- TWEEN-20 (AppliChem, A4974)

- TBS (Tris-Buffered Saline)  
Western blotlama deneyinde kullanılmıştır. İçerisinde 50 mM Tris, 150 mM NaCl bulunurken pH'sı 7.6'dır.
- TBS-T  
Western blotlama deneyinde membranın yıkanmasında kullanılır. İçeriği TBS tamponu ile aynı olmakla birlikte %0.05 TWEEN 20 içermektedir.
- Western Transfer Tamponu  
3 gr Tris-HCl (pH8.3), 14.4 gr glisin, 200 ml Metanol karıştırılır ve hacmi 1lt'ye tamamlanarak hazırlanır.
- Tripton (Sigma, 95039)
- Maya ekstratı (Sigma, Y1625)
- Proteaz Pepton (Sigma, 82450)

## **Ek-2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kitler ve Enzimler**

- **Kullanılan Cihazlar**

Etüv (Genhart, Thermo Shaker THO 220), Santrifüj (Thermo IEC Micromax, Beckman Coulter Microfuge 22R, ve Beckman Coulter Allegra 25R), Otoklav (Eastern Medical, Vertical Autoclave), PZR Cihazı (Biorad, iCycler thermal; Applied Biosystem, Veriti Thermal Cycler), Agaroz Jel Elektroforez Aparatı (Thermo EC Mini Cell EC320, Thermo EC Midi Cell Ec 330 ve BioRad Mini SubCell GT), Güç Kaynağı (Thermo Electrocorporation EC250-90), UV Jel Görüntüleme Kabini (Uvitec M02 4611), pH Metre (Crison, Basic 20), Vorteks (IKA MS2), Su banyosu (Mettler D-91126), Isı bloğu (Thermoblock Clifton B11), Nanodrop (Metek ND-100), Spektrofotometre (UV- 2101 PC Shimadzu), Terazî (Ohaus pro AV812), Gene Pulser Xcell (BioRad, 165-2666), Manyetik Karıştırıcı (Schott, SLK6), Dizi Analizi Cihazı (Beckman Coulter, CEQ8000), SDS-PAGE elektroforez cihazı (BioRad, Mini Protean Tetra Cell System), Western blot Cihazı (BIOMETRA Fast-Blot Semi Dry), Flüoresans okuyucu (Molecular Devices, Spektramax M2), Leica DM6000 Flüoresan Mikroskop, Ultra dondurucu (Thermo, Model 906 UltraFreezer).

- **Kullanılan Kitler**

Thermo GeneJet Plasmid MiniPrep kit (Thermo, K0502), QIAGEN plazmid mini kit (Qiagen, 12123), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagene, 28706), Dizi Analizi Kiti (Beckman Coulter, GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit, 608120)

- **Kullanılan Enzimler**

Taq DNA Polymerase (Fermantas, EP0401), PmeI (Thermo, ER1341), ApaI(TAKARA, 1005B), XhoI (Thermo, ER0695), T4 DNA Ligaz (NEB, M0202S), Lizozim (Sigma, 62970).

### **EK-3 Çalışmada Kullanılan Besiyerleri**

- **LB Broth besiyeri (Lizojen Broth)**

*E. coli* hücrelerinin büyütülmesinde kullanılan sıvı besiyeridir [52,53]. İçeriğinde NaCl (Merck, katalog no 567441), Tripton (Fluka, katalog no T9410) ve Maya ekstratı (Sigma,katalog no Y1625) bulunmaktadır. 10'ar gr NaCl ile Tripton ve 5 gr maya ekstratının 1 lt dH<sub>2</sub>O'da çözülmesi ve pH'sının 8.0'e ayarlanması ile hazırlanır. Hazırlanan karışım 121 °C'de 15 dk. otoklav edilerek steril edilir.

- **LB Agar Besiyeri**

*E. coli* hücrelerinin büyütülmesinde kullanılan katı besiyeridir. Üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlanan besiyeri (37 gr. LB agar 1 lt dH<sub>2</sub>O'da çözülüp 121 °C'de 15 dk steril edilir), otoklavdan çıkarıldıktan sonra 55°C'deki su banyosuna alınır. Petri tabaklarına dökülmeden önce LB agar içersine 1000X amfisilinden 1X olacak şekilde ekleme yapılır (1 lt besiyeri için 1 ml amfisilin eklenir). Petri tabaklarına besiyerinin dökümü steril kabinde yapılır ve besiyeri donduktan sonra +4 °C'de muhafaza edilir.

- **PPY Besiyeri**

Tetrahymena hücrelerinin büyütülmesinde kullanılan sıvı besiyeridir. Besiyerinde enzimatik olarak parçalanmış etten oluşan proteaz pepton, maya ekstraktı ve bölünme hızının 2.5 saatin altına inmesini sağlayan demir iyonu kullanılır. Proteaz pepton oranı toplam besiyeri hacminde %2 oranında olmalıdır, bu oran uzun süre %1'in altında kalırsa bireyler infertil duruma geldiğinden konjugasyon ve çaprazlama çalışmalarında kullanılamazlar [41]. 10 gr Proteose pepton, 1.5 gr Maya ekstraktı 900 mL dH<sub>2</sub>O içinde çözülür ve üzerine, 1 mL 10 mM FeCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O eklenir. Toplam hacim mezürle ölçülerek dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlanır ve küçük hacimlere bölünen besiyeri 121 °C'de 15 dk otoklav edildikten sonra kullanılır.

- **SPP besiyeri**

Tetrahymena hücrelerinin büyütülmesinde kullanılan zenginleştirilmiş besiyeridir [41]. İçeriği PPY besiyerine benzerdir, farklı olarak glikoz içermektedir. İçeriğinde %2 proteaz pepton, %0.1 maya ekstratı, %0.2 glikoz ve %0.0003 FeCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (finalde 33 µM olacak şekilde) bulunmaktadır. Hazırlanan besiyerinin steril edilmesi PPY besiyeri ile aynıdır.

#### **Ek-4 Tetrahymena'ya Kodon Uyumu Yapılan Superfolder Yeşil Flüoresan Protein (TtsfGFP)**

Superfolder GFP (sfGFP) 717 nükleotid uzunluğunda (Accession no: HI069813.1) olup, *Aequore victoria* (deniz anası)'dan elde edilen Yeşil Flüresan Proteinin (Green Fluorescent protein, GFP) bir mutantıdır [23]. sfGFP'de bulunan mutasyonlar ve görevleri şöyledir; cycle-3 mutantında bulunan mutasyonlarla (F99S, M153T, V163A) proteinin katlanması geliştirilmiş, enhance GFP (F64L, S65T) mutasyonları ile ışması arttırılmış ve sfGFP olmasını sağlayan S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V ve A206V mutasyonları ile katlanma kinetiği, çeşitli streslere karşı stabilizasyonu, ışma etkinliği arttırılmıştır ve hücre içerisindeki dimerizasyonu minimize edilmiştir. sfGFP'nin *T. thermophila*'da rekombinant üretiminde karşılaşılabilecek kodon uyumsuzluğu nedeniyle, sfGFP'nin kodonları, Hannah M.W ve ark. (2008)'nın *T. thermophila*'nın tRNA genleri ile ilgili yaptığı çalışmanın verileri ve *T. thermophila*'nın kodon kullanım sıklığı beraber değerlendirilerek analiz edilmiştir [35]. Yapılan analiz sonucunda sfGFP'nin 239 kodonunun 126 tanesinin (%57,72) *T. thermophila*'nın kodon kullanım tercihiyle tam uyum göstermediği görülmüştür. sfGFP'nin gen nükleotit dizisi sessiz mutasyonlarla değiştirilerek, *T. thermophila*'ya kodon uyumu yapılmış gen dizisi Şekil'de verilmiştir.

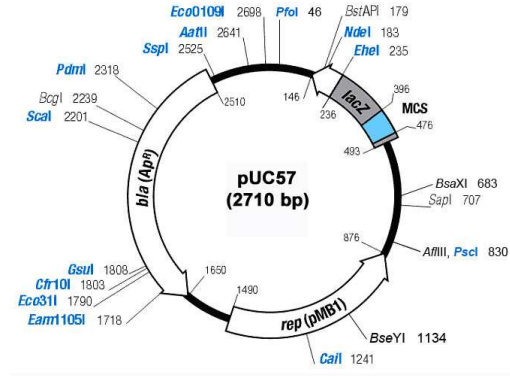
|     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | M   | S   | K   | G   | E    | E   | L   | F   | T   | G   | V   | V   | P   | 13  |
| 1   | atg | tct | aaa | ggt | gaa  | gaa | tta | ttc | act | ggt | gtt | gtt | cct |     |
|     | I   | L   | V   | E   | L    | D   | G   | D   | V   | N   | G   | H   | K   | 26  |
| 40  | att | tta | gtt | gaa | tta  | gac | ggt | gac | gtt | aac | ggt | cac | aaa |     |
|     | F   | S   | V   | R   | G    | E   | G   | E   | G   | D   | A   | T   | N   | 39  |
| 79  | ttc | tct | gtt | aga | ggt  | gaa | ggt | gaa | ggt | gac | gct | act | aac |     |
|     | G   | K   | L   | T   | L    | K   | F   | I   | C   | T   | T   | G   | K   | 52  |
| 118 | ggt | aaa | tta | act | tta  | aaa | ttc | att | tgc | act | act | ggt | aaa |     |
|     | L   | P   | V   | P   | W    | P   | T   | L   | V   | T   | T   | L   | T   | 65  |
| 157 | tta | cct | gtt | cct | tggt | cct | act | tta | gtt | act | act | tta | act |     |
|     | Y   | G   | V   | Q   | C    | F   | S   | R   | Y   | P   | D   | H   | M   | 78  |
| 196 | tac | ggt | gtt | caa | tgc  | ttc | tct | aga | tac | cct | gac | cac | atg |     |
|     | K   | R   | H   | D   | F    | F   | K   | S   | A   | M   | P   | E   | G   | 91  |
| 235 | aaa | aga | cac | gac | ttc  | ttc | aaa | tct | gct | atg | cct | gaa | ggt |     |
|     | Y   | V   | Q   | E   | R    | T   | I   | S   | F   | K   | D   | D   | G   | 104 |
| 274 | tac | gtt | caa | gaa | aga  | act | att | tct | ttc | aaa | gac | gac | ggt |     |
|     | T   | Y   | K   | T   | R    | A   | E   | V   | K   | F   | E   | G   | D   | 117 |
| 313 | act | tac | aaa | act | aga  | gct | gaa | gtt | aaa | ttc | gaa | ggt | gac |     |
|     | T   | L   | V   | N   | R    | I   | E   | L   | K   | G   | I   | D   | F   | 130 |
| 352 | act | tta | gtt | aac | aga  | att | gaa | tta | aaa | ggt | att | gac | ttc |     |
|     | K   | E   | D   | G   | N    | I   | L   | G   | H   | K   | L   | E   | Y   | 143 |
| 391 | aaa | gaa | gac | ggt | aac  | att | tta | ggt | cac | aaa | tta | gaa | tac |     |
|     | N   | F   | N   | S   | H    | N   | V   | Y   | I   | T   | A   | D   | K   | 156 |
| 430 | aac | ttc | aac | tct | cac  | aac | gtt | tac | att | act | gct | gac | aaa |     |
|     | Q   | K   | N   | G   | I    | K   | A   | N   | F   | K   | I   | R   | H   | 169 |
| 469 | caa | aaa | aac | ggt | att  | aaa | gct | aac | ttc | aaa | att | aga | cac |     |
|     | N   | V   | E   | D   | G    | S   | V   | Q   | L   | A   | D   | H   | Y   | 182 |
| 508 | aac | gtt | gaa | gac | ggt  | tct | gtt | caa | tta | gct | gac | cac | tac |     |
|     | Q   | Q   | N   | T   | P    | I   | G   | D   | G   | P   | V   | L   | L   | 195 |
| 547 | caa | caa | aac | act | cct  | att | ggt | gac | ggt | cct | gtt | tta | tta |     |
|     | P   | D   | N   | H   | Y    | L   | S   | T   | Q   | S   | V   | L   | S   | 208 |
| 586 | cct | gac | aac | cac | tac  | tta | tct | act | caa | tct | gtt | tta | tct |     |
|     | K   | D   | P   | N   | E    | K   | R   | D   | H   | M   | V   | L   | L   | 221 |
| 625 | aaa | gac | cct | aac | gaa  | aaa | aga | gac | cac | atg | gtt | tta | tta |     |
|     | E   | F   | V   | T   | A    | A   | G   | I   | T   | H   | G   | M   | D   | 234 |
| 664 | gaa | ttc | gtt | act | gct  | gct | ggt | att | act | cac | ggt | atg | gac |     |
|     | E   | L   | Y   | K   | *    |     |     |     |     |     |     |     |     | 239 |
| 703 | gaa | tta | tac | aaa | tga  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

**Şekil :** *T. thermophila*'ya göre kodon uyumu yapılmış olan sfGFP (TtsfGFP) nükleotid ve protein dizisi. Kırmızı renkli nükleotidler tarafımızca değiştirilmiş nükleotidler olup, toplamda 153 adettir (toplam dizinin %21.3'ü). Değiştirilen kodon sayısı ise 126'dır. Yeşil renklendirilmiş dizi kromatofor bölgesidir.

## Ek-5 Çalışmada Kullanılan Vektörler

- **pUC57 klonlama vektörü**

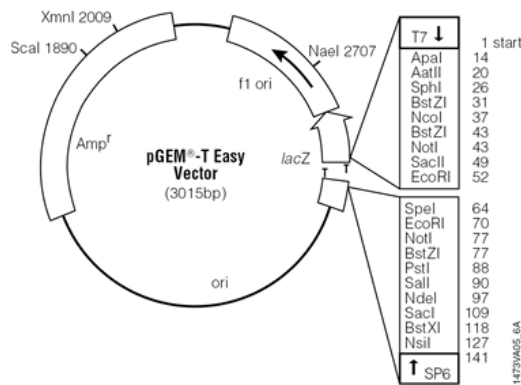
pUC57, sentetik üretilen TtsfGFP ve sfGFP genlerinin içerisine klonlanarak gönderildiği klonlama vektörüdür. TtsfGFP ve sfGFP genleri pUC57 vektörü içerisine EcoRV klonlaması ile klonlanarak gönderilmiştir.



Şekil 1: pUC57 klonlama vektörü

- **pGEM-T Easy klonlama vektörü**

Tetrahymena hipotetik proteininin (H) içerisinde bulunduğu klonlama vektörü.



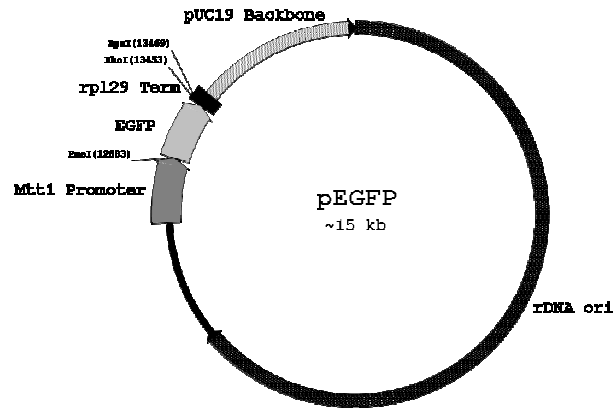
Şekil 2: pGEM-T Easy klonlama vektörü (Promega, A1360).

Rutin klonlama çalışmalarında tercih ettiğimiz pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, katalog no A1360) klonlama vektörü,  $\alpha$  peptidini kodlayan LacZ genini

taşımaktadır. Çoklu klonlama bölgesinin bu bölgede bulunması sonucu genin insersiyonel inaktivasyonu nedeni ile  $\alpha$  -komplementasyonun gerçekleşip gerçekleşmemesine bağlı olarak mavi-beyaz seçilimi sağlanmaktadır. Plazmitin 3' uçlarında bulunan tekli “T” nükleotidleri ile “AT” klonlaması yapılabilmekte ve hücre içinde baskılanması ise taşıdığı amfisilin direnç geni sayesinde sağlanmaktadır.

- **pEGFP Tetrahymena ifade vektörü**

Tetrahymena pVGF ifade vektörü içerisindeki Drp1 geni XhoI-ApaI enzimleri ile kesilerek çıkartılmış ve yerine stop kodonu içeren kısa bir linker ligasyonla vektöre eklenmiştir. Böylelikle sitoplazmik EGFP üretimi yapan Tetrahymena vektörü elde edilmiştir. Bu vektör çalışma öncesinde, laboratuvarımızca yapılandırılmıştır.



**Şekil 3:** Tetrahymena pEGFP ifade vektörü

## Ek-6 Çalışmada Uygulanan Deneysel Yöntemler

### a) SDS'li Alkalın Lizis Yöntemi ile Plazmit DNA İzolasyonu

*E. coli* klonlarından plazmit izolasyonu yapılırken genellikle kitler kullanılmaktadır. Fakat kitler genellikle bize hacimsel olarak kısıtlama getirmektedir. Örneğin mini izolasyon kitleri 3-5 ml, Midi izolasyon kitleri 20-50 ml gibi. Hedef plazmitin *E.coli* klonlarından hacimsel kısıtlama olmadan büyük miktarlarda izole edilmesinin yolu, SDS varlığı ile yapılan Alkaline Lizis yöntemidir [38,54]. Plazmit izolasyon basamakları aşağıdaki gibidir. Yöntem belirli bir hücre hacmine göre hesaplanmıştır. Kullanılan solüsyonların hacmi, başlangıç hücre kültürü hacmine oranlanarak kullanılabilir.

- Plazmit izolasyonu yapılacak *E. coli* klonundan amfisilinli LB Broth besiyerine ekim yapılır ve 37 °C 180 rpm'de gece boyu büyütülür.
- İnkübasyon sonrasında büyüyen kültürden alınan 20 ml hücre, 8.000 g (10.000 rpm)'de santrifüjlenerek peletlenir ve süpernatant dökülür.
- Hücre peleti ~5-10 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) ile pipetlenerek çözülür ve tekrardan 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip peletleme yapılarak süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücre peleti üzerine: 150 µl Lizozim (10 mg/µl), 20 µl 0.5 M EDTA (pH 8), 10 µl RNase A Solution (10 mg/ml) eklenerek pipet yardımı ile çözülür ve 30-60 dk buzda inkübasyona bırakılır.
- Süre sonunda karışımın üzerine taze hazırlanmış 0.2 M NaOH ve %1'lik SDS den 1'er ml eklenir ve dikkatlice yavaş yavaş karıştırma işlemi yapılır. Karışım işlemi yapıldıktan sonra 5 dk buzda inkübasyon gerçekleştirilir. Eğer saflaştırılacak olan plazmit büyükse (~10 kb ve üzeri) inkübasyon 10 dk'ya kadar uzatılabilir.
- Süre bitiminde 300 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac eklenir ve dikkatlice yavaş yavaş alt/üst edilme yoluyla karıştıma işlemi gerçekleştirilir. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra örnek buzda 10 dk inkübe edilir.
- İnkübasyon bitiminde örnek 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir ve sıvı faz temiz bir tüpe aktarılır.

- Elde edilen sıvı fazın hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) örneğin üzerine eklenir ve yaklaşık 15 saniye boyunca tüp çalkalanarak renginin beyaza dönmesi sağlanır. Daha sonra örnek orbital çalkalayıcıya koyularak, hızlı bir çalkalamayla 5 dk inkübe edilir.
- Süre sonunda örnek 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında örnekler santrifüj cihazından sarsmadan dikkatlice çıkartılır. Tüp içerisinde 2 faz bulunmaktadır. Bu fazlardan üst kısım pipetleme ile alınarak temiz bir tüpe aktarılır. Burada önemli olan oluşan fazlardan üst kısmı olabildiğince temiz, alt faz ile kontamine olmamış bir şekilde elde etmektir. Üst faz alınırken alınan hacim not edilmelidir.
- Elde edilen üst fazın hacminin 0.6 katı kadar izopropanol alınarak örneğin üzerine eklenir. İyice karıştırma işlemi yapıldıktan sonra örnek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında örnek 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatant dökülür ve tüp whatman kâğıdına ters çevrilerek artık izopropanol uzaklaştırılır.
- Kalan pelet üzerine öncelikle 200 µl 0.3 M NaAc eklenir ve pelet çözülür. Daha sonra çözülen peletin üzerine 500 µl 200 proof etanol eklenerek karıştırılır ve -20 °C'de 3 saat ya da daha fazla inkübasyon yapılır (isteğe göre gece boyu inkübasyon yapılabilir).
- İnkübasyon sonrasında örnek 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatant dökülür; kalan pelet havada kurutularak tüpte kalan artık etanolün uzaklaşması sağlanır. Daha sonra pelet isteğe bağlı olarak 10 µl ya da daha fazla hacimde dH<sub>2</sub>O veya elüsyon tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ile çözülür.
- Elde edilen plazmitin konsantrasyonu Nanodrop cihazının Nükleik Asit analizi (A260/A280) ile ölçülerek belirlenir.

#### **b) Vektör ve Hedef DNA'nın (Insert) Restriksiyon Enzimleri İle Kesilmesi**

Restriksiyon enzimleri ile DNA zincirinde belirli dizilerin olduğu bölgeler kesilebilir. Restriksiyon enzimleri ile iki DNA parçasının birleşmesi için

DNA uçları uygun hale getirilebilirken, yine bu enzimlerle hedef DNA bulunduğu DNA parçasından kesilerek alınabilir [55]. Hedef genin (insert) klonlama ya da ifade vektörlerine yerleştirilmesi için, öncelikle birkaç analiz yapılması gerekmektedir. Bunlardan ilki insertün WebCutter programı ile analiz edilerek restriksiyon enzimi kesim haritasının çıkarılmasıdır. Böylelikle vektörün klonlama bölgesinde bulunan enzimlerden hangilerinin insertü kesmediği belirlenmiş olur. Belirlenen klonlama enzimlerinin dizileri, hedef genin uçlarına tasarlanan primerler ile eklenir. Böylelikle hedef DNA'nın ve vektörün 5' uçlarındaki kesim dizileri ile 3' uçlarındaki kesim dizileri aynı olur. Eğer seçilen restriksiyon enzimleri yapışkan uç bırakıyor ise buna “yönlendirilmiş klonlama” denilir. Eğer küt kesim yapan restriksiyon enzimleri seçilirse “küt uç klonlaması” denilir. Yönlendirilmiş klonlamada verim her zaman daha yüksektir [38]. Çalışmada kullanılan enzim çiftleri PmeI-ApaI ve XhoI-ApaI'dir. PmeI küt, ApaI yapışkan uç bırakarak kestiğinden, yapılan klonlamaya “yarı yönlendirilmiş klonlama” denilebilir. Restriksiyon enzimleri ile kesim yapılırken, enzimleri üreten firmaların belirlediği yönergelere dikkat edilmiştir. İkili kesim yapılırken her iki enzimin çalışacağı ortak tampon seçilmiştir.

Vektör ve insertden kesim reaksiyonuna yaklaşık 6-8 µg alınmıştır. Reaksiyon 37 °C'de genelde 20 saat civarında yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında reaksiyon 80 °C'de 20 dk bekletilerek enzim inaktivasyonu yapılmıştır.

Kesim ürünleri agaroz jele yüklenerek hem kesimin başarılı olup olmadığının belirlenmesi, hemde kesim reaksiyonu sonucunda istenilen ürünün saf bir şekilde elde edilmesi amacı ile elektroforez edilmiştir.

### **c) DNA Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi ve Jelden İzole Edilmesi**

Restriksiyon kesim reaksiyonları ve koloni PZR ürünleri gibi deneylerde elde edilen ürünlerin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için polimerize olma yeteneğine sahip olan Agar, 1X TBE tamponunda değişik konsantrasyonlarda (%0.7 - %1 arasında) çözülerek jel hazırlanmış ve içerisine EtBr eklenerek elektroforez tabağına dökülmüştür. Polimerize olan

agaroz jele, görüntülenmek istenen DNA ürünleri finalde 1X yükleme boyası ile yüklenmiştir [38]. Elektroforez işlemi ortalama 85 V'da 45-60 dk arasında gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminden sonra ürünler UVP Transilluminator ile görüntülenip, gerektiği yerde hedef DNA'nın olduğu bant jelden kesilerek elde edilmiştir. Klonlama deneylerinde kullanılacak olan ürünler 365 nm UV lambası ile görüntülenirken, kontrol amaçlı gerçekleştirilen deneylerde 312 nm'de görüntüleme yapılmıştır. Bunun nedeni 312 nm dalga boyuna sahip UV ışığının DNA'lara zarar vermesi ve bu nedenle klonlamada başarısızlık yaratmasıdır. 365 nm ise DNA'ya daha az zarar vermektedir. Bu ışık kaynağı altında kısa sürede gerçekleştirilen görüntüleme, klonlama çalışmalarındaki olumsuz etkiyi büyük oranda ortadan kaldırmaktadır. Agaroz jelden kesilen bantlardan hedef DNA'lar, QIAquick Gel Extraction Kit ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürünlerin konsantrasyonu Nanodrop cihazında yapılan analiz ile belirlenmiştir.

#### **d) Ligasyon**

Çalışılmak istenen genin bir vektör içerisine klonlanması ligasyon reaksiyonu ile gerçekleştirilebilir [38]. Ligasyona alınması gereken vektör ve insert miktarı, farklı durumlarda değişmekle birlikte, genellikle aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır.

$$(\text{Insert kb}) \times (\text{Vektör ng}) \times (\text{vektör:insert oranı}) / (\text{Vektör kb}) = (\text{Insert ng})$$

Ligasyon reaksiyonuna alınan vektör miktarı 50 ng-100 ng arası olması tavsiye edilirken, vektör:insert oranı genellikle 3:1 olarak önerilmektedir. Bu oran vektör ve insertün büyüklük farkına bağlı olarak değişebilir [38,56].

Ligasyon reaksiyonunda NEB T4 DNA Ligaz enzimi kullanılmıştır ve reaksiyon bileşenleri aşağıdaki gibidir:

#### İfade Vektörüne Ligasyon Protokolü:

|                      |               |
|----------------------|---------------|
| İnsert               | x µl          |
| Vektör               | y µl          |
| 10X Ligasyon Tamponu | 2 µl          |
| T4 DNA Ligaz         | 1 µl          |
| dH <sub>2</sub> O    | [17-(x+y)] µl |

Firma yönlendirilmiş klonlama için ligasyon reaksiyonunu oda sıcaklığında (24°C) ~1 saat önermektedir. Küt uç klonlamasını ise 16 °C’de gece boyu önermektedir. Ligasyon inkübasyonun ardından transformasyona geçilmeden önce 65 °C’de 10 dk enzim inaktivasyonun yapılması transformasyon verimliliğini arttırmakta olduğu firma tarafından belirtilmiştir [56,57].

Çalışmada kullanılan enzim çiftleri PmeI-ApaI ve XhoI -ApaI ‘dir. PmeI küt uç bırakarak keserken, XhoI ve ApaI yapışkan uç bırakarak kesmektedir. Yani klonlama, bir deneyde yarı küt-yarı yönlendirilmiş iken, diğer klonlamada yönlendirilmiş klonlamadır. Bu nedenle ligasyon reaksiyonu 16 °C’de gece boyu gerçekleştirilmiştir. Ligasyona alınan pVGF vektörü 15-17 kb arasında değişen büyüklüğe sahiptir. Kullanılan vektörün çok büyük olması, üzerine fazla ligaz enzimi bağlanmasına neden olacağından ve dolayısı ile ligasyon verimliliğini düşüreceğinden firmanın tavsiye ettiği ligaz enzimi miktarının 2 katı kullanılmıştır. Yine vektörün büyük olması ve fazla enzim bağlanması nedeni ile enzim inaktivasyonu 65 °C’de 20 dk yapılmıştır.

#### **e) *E. coli* Kompatent Hücre Hazırlığı**

Sıcaklık şoku ile transformasyonda kullanılacak olan *E. coli* hücrelerinin, hücre çeperlerinin zayıflatılması, dolayısı ile ortamda bulunan DNA parçalarını almaya müsait hale getirilme işlemidir. Hücre duvarının zayıflatılmasında CaCl<sub>2</sub> kullanılmaktadır [38]. Uygulanan yöntemin basamakları aşağıdaki gibidir:

- Kompatent hale getirilecek olan hücre tipi LB agar besiyerine çizgi ekimle ekilir ve büyütülür. Elde edilen kolonilerden tek bir tanesi alınır ve LB Broth besiyerine ekilerek gece boyu 37 °C’de 180 rpm’de inkübe edilir.

- Ertesi gün yetişen hücrelerden 0.5 ml alınır ve 100 ml taze LB Broth besiyerine ekilir. Ekilen hücreler 37 °C 180 rpm’de inkübe edilir.
- İnkübe edilen hücreler erken logaritmik faza kadar büyütülür. İstenen faza geldiğini anlamak için inkübe edilen hücrelerin spektrofotometrede OD’si ölçülür. Kör olarak dH<sub>2</sub>O’nun kullanıldığı spektrofotometrik ölçümde 550 nm’deki OD 0.4 - 0.6 arasında, 600 nm’deki OD 0.2- 0.4 arasında olmalıdır. Hücrelerin bu yoğunluğa eriştiği zamanı yakalamak için, inkübasyon başladıktan 70-80 dakika sonra spektrofotometrik ölçümlere başlanır.
- Hedeflenen OD elde edildiğinde hücreler 6000 rpm’de 15 dk santrifüjlenerek peletlenir ve besiyeri uzaklaştırılır.
- Elde edilen pelet soğuk 50 mM CaCl<sub>2</sub> ile çözülür ve 15 dk buzda inkübe edilir.
- Süre sonunda hücreler 15.000 rpm’de 15 dk santrifüjlenerek peletlenir ve üst faz dökülür.
- Kalan hücre peleti soğuk 4 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> ile **yavaşça** pipetlenerek çözülür. Çözülen hücrelerin üzerine 0.6 ml %80’lik gliserol eklenerek karıştırılır ve 200 µl’lik hacimlere bölünerek -86 °C’de stoklanır.
- Hazırlanan komopotentlerin etkinliği, pUC19 gibi yapısı ve çalışır olduğu bilinen bir plazmitin ısı şoku ile transforme edilmesi ile test edilir.

**f) Vektör DNA’nın Kompetent *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu ve Master Tabak Hazırlanması**

Isı şoku ile transformasyon yöntemi kullanılarak vektörlerin kompetent *E. coli* hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Ligasyon reaksiyonundan gelen vektörlerin transformasyona alınmadan önce 65 °C’de 10-20 dk inkübe edilerek enzim inaktivasyonu yapılmıştır. Ligaz enziminin inaktive edilmesi, transformasyon verimliliğini arttırmaktadır [58]. Isı şoku ile transformasyonda her 50 µl kompetent hücre için 25 ng vektör kullanılması gerekmekte olduğu literatürce belirtilmiştir [38]. Fakat laboratuvar deneyimlerimize göre saflaştırılmış vektörlerden transformasyon yapıldığında 2-10 ng arası vektör kullanılması

oldukça yeterlidir. Ligasyon reaksiyonundan gelen vektörlerin transformasyonunda ise, ligasyon verimliliğine bağlı olarak reaksiyonun 2 µl'si ile tüm hacim arasında değişen hacimlerde transformasyon yapılabilir. Isı şoku ile transformasyon basamakları aşağıdaki gibidir.

- -86 °C'den çıkartılan kompatent hücreler buzda ~15 dk bekletilerek çözülürler. Çözülen kompatent hücrelerin üzerine transforme edilmek istenen plazmit DNA eklenir ve buzda 30 dk. inkübe edilir.
- Süre sonuna hücreler 42 °C'de 2 dk, buzda 3 dk bekletilerek ısı şoku sağlanmış olur.
- Daha sonra hücrelerin üzerine 500 µl LB Broth besiyeri eklenir ve 30 dk ile 1 saat arasında 37 °C 180 rpm'de inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında hücreler 8000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek peletlenir ve süpernatant ~100 µl kalacak şekilde dökülür. Kalan süpernatantda hücreler çözülür ve 100 mg/ml Amfisilin içeren LB Agar tabaklarına drigalski spatülü kullanılarak yayma plak yöntemi ile yayılır. Ekim yapılan tabaklar 37 °C'de gece boyu inkübe edilir ve süre sonunda elde edilen koloniler gözlemlenir.
- **Master tabak hazırlanması:** Transformasyondan sonra transformasyon tabağında elde edilen kolonilerden isteğe göre değişen miktarda (genelde 20-30 arası) tek koloni seçilir ve bu koloniler dışarıdan çizgilerle karelere ayrılmış olan LB Agar besiyerinde hazırlanan alanlara ekilerek 37 °C'de gece boyu inkübe edilir. Ekilen kolonilerin büyümesinden sonra master tabak +4 °C'de yaklaşık 1 ay muhafaza edilebilir.

#### **g) Transformant *E. coli* Kolonilerinin Koloni PZR Yöntemi ve Restriksiyon Kesim Kontrolü ile Taranması**

Hedef genin vektöre, ligasyon reaksiyonu ile entegre edilmesinin ardından *E. coli* kompatent hücrelerine transform edilmesi sonrasında birçok koloni elde edilmektedir. Elde edilen kolonilerden hangisinin istenilen vektör formunu içerdiği, yani hedef geni içeren vektöre sahip olduğunu koloni PZR yöntemi ile hızlıca anlaşılabilir [59]. Koloni PZR yönteminde Master tabakta

belirli bir alana ekilmiş olan kolonilerden plazmit saflaştırması yapmadan pozitif kolonilerin belirlenmesi mümkündür. Yöntemde ihtiyaç olan bileşen, hedef gene spesifik primer çiftidir ve bu primer çiftinin *E. coli* genomuna non-spesifik oturup ürün üretmemesi, yöntemin doğru çalışması için gereklidir. Primerlerin *E. coli* genomuna oturup oturmadığı, koloni PZR'ye negatif olduğu bilinen bir kolonininde alınması ile anlaşılabilir. Yöntem basamakları aşağıdaki gibidir;

- Temiz bir ependorf tüpe 25 µl steril dH<sub>2</sub>O eklenir.
- Taranmak istenen koloniden öze ile steril şartlarda bir mikrar alınır ve ependorf tüpdeki suda çözülür.
- Çözülen örnek kaynayan suda 5 dk inkübe edilir ve süre sonunda buza alınarak birkaç dakika beklenir. Ardından 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilen örneğin süpernatant kısmından 20 µl alınarak temiz bir tüpe aktarılır.
- Elde edilen örnek hem hedef vektörü hemde *E. coli* genomunu içermektedir. Bu örnekten 2 µl alınarak, hedef gene özgü primerler ile PZR yapılabilir. Koloni PZR de genelde Taq Polimeraz kullanılmaktadır. Reaksiyon bileşenleri aşağıdaki gibidir.

**Reaksiyon (25 µl):**

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Kalıp                     | 2 µl    |
| F Primer (2.5 µM)         | 2.5 µl  |
| R Primer (2.5 µM)         | 2.5 µl  |
| dNTP karışımı (2 mM)      | 2 µl    |
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM) | 2.5 µl  |
| 10 Taq Buffer             | 2.5µl   |
| Taq Polymerase (5u/ml)    | 0.2 µl  |
| dH <sub>2</sub> O         | 10.8 µl |

Koloni PZR kurulurken pozitif kontrol ve negatif kontrolde yapılmalıdır. Koloni PZR ürünleri, pozitif kontrol, negatif kontrol ve marker DNA ile beraber agaroz jele yüklenerek elektroforez edilmiştir. Elektroforez sonrasında jel UV transsmilator ile görüntülenerek beklenen büyüklükteki ürünü veren koloniler belirlenmiştir. Belirlenen bu koloniler koloni PZR ile pozitif olduğu belirlenen

kolonilerdir. Koloni PZR sonucunda pozitif belirlenen kolonilere tamamen pozitif diyemeyiz. Bu nedenle ekstra kontroller yapılması gerekmektedir. Bunlardan biri plazmit izolasyonu ve restriksiyon kesim kontrolü iken diğeri DNA dizi analizidir.

Koloni PZR’de pozitif belirlenen hücrelerden QIAGEN plazmid mini kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitlerden ~1 µg alınarak, içerisine klonlama yapılan restriksiyon enzimleri (PmeI-ApaI ya da XhoI-ApaI) ile kesim reaksiyonuna alınmıştır. Kesilen plazmitler agaroz jel elektroforezi yapılarak UV transsimilatörde görüntülenmiş ve plazmitten beklenen büyüklükte hedef DNA’nın salınıp salınmadığı kontrol edilmiştir.

#### **h) DNA Dizi Analizi**

Koloni PZR ve restriksiyon kesim reaksiyonu ile pozitif olduğu belirlenen kolonilerden elde edilen plazmitlerin en son kontrolü DNA dizi analizi ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi ile klonlama yapılan genlerin 5' ve 3' bölgelerine yakın bölgelere tasarlanmış ve genin içerisinden dışarıya doğru yöneltilmiş primerler kullanılarak, hedef genin vektör ile birleşme bölgeleri kontrol edilmiştir.

Dizi analizi “Backman Coulter GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi PZR’inde kalıp olarak vektörler kullanılmıştır ve elde edilen reaksiyon ürününün etanol çöktürmesi ile saflaştırılması kit protokolünde tarif edildiği şekilde uygulanmıştır. Saflaştırma işlemi verimlilik artışı sağladığından manyetik boncuklar (Agencourt CleanSEQ) ile yapılmıştır. Saflaştırılan ürünlerin okumaları dizi analizi cihazı CEQ8000’de gerçekleştirilmiştir.

#### **i) Konjugatif Tetrahymena Hücrelerine Vektörlerin Elektroporasyon ile Transformasyonu ve Pozitif Klonların Sıvı Nitrojende Stoklanması**

Çalışmada yapılandırılan vektörler Tetrahymena hücrelerine temelde J. Gaertig ve M. A. Gorovsky (1992)’nin yöntemi ve diğer birkaç protokolün beraber

değerlendirilmesi sonucunda, BioRad Gene Pulser aleti ile transform edilmiştir [39-41].

Transformasyon deneyinde sıvı N<sub>2</sub>'den taze uyandırılmış 4-5 günlük Tetrahymena CU428 ve B2086 ırkı hücreler kullanılmıştır. Tetrahymena hücreleri PPY besiyerinde (100 unit/ml Pen-Strep) geç logaritmik faza kadar büyütüldükten sonra 10 mM Tris-HCl (pH7.5) ile yıkanarak yaklaşık 18-24 saat açlığa alınmıştır. Açlık süresinin sonunda hücreler Thoma lamı ile sayılarak ml'de  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ayarlanmış ve daha sonra her iki hücre tipinden de eşit hacim alınarak geniş tabanlı steril bir erlende birleştirilerek çalkalamasız bir şekilde 30 °C'de konjugasyona alınmıştır. Konjugasyonun başlatılmasından yaklaşık 1-2 saat sonra belirli aralıklarla, konjugasyon verimliliği ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir. Verimliliğin, konjugasyonun yaklaşık ~2.-3. saatin sonunda %80'nin üzerinde olup olmadığı ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir. Konjugasyonun verimi istenilen değerin altında ise deneye devam edilmemelidir [40]. Hücrelerin nükleer gelişimi Hoechst boyaması ile mikroskopta kontrol edilmiştir. Konjugasyonun "Makronükleer Gelişim 1" gelişim evresinde (konjugasyonun ~9-10. saatinde) hücreler 10 mM HEPES'le yıkanmış ve peletlenerek finalde  $1.7 \times 10^7$  hücre/ml olacak şekilde 10 mM HEPES de çözölmüştür. Çözölen hücrelerden 230 µl alınarak, hacmi 250 µl'ye tamamlayacak şekilde 10-40 µg plazmit (yeteri kadar plazmit alınarak hacmi 10 mM HEPES ile istenilen miktara getirilmiştir) ile karıştırılmıştır. Karışım bekletilmeden 4 mm aralıklı Gene Pulser (Bio-Rad) elektroporasyon küvetine aktarılmış ve ateşleme (440 Volt, 25-µF Capacitor, 200 Ω) yapılmıştır. Ateşlemeden 10-60 sn sonra hücrelerin üzerine 5 mL SSP besiyeri (250 µg/ml Pen-Strep içeren) eklenmiştir. Besiyeri eklenen hücreler 12'lik mikrotiter tabaklarının 3 kuyusuna eşit olarak bölünerek (~1.67 ml her bir kuyu için) 30 °C'de inkübe edilmiştir. Yaklaşık 12-24 saat sonra hücreler 100 µg/ml paramomisin baskısına alınmıştır. Paramomisin baskısına alınan transformant hücreler 3-4 gün 30 °C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler binoküler mikroskopta kontrol edilerek canlılığın devam ettiği kuyular belirlenmiştir. Paramomisin baskısı 100 µg/ml'den 800 µg/ml'ye kadar kademeli olarak çıkartılarak, antibiyotik baskısına tam dirençli pozitif hücreler belirlenmiştir. Paramomisin baskısında pozitif olarak belirlenen hücrelerden bir miktar alınarak

PPY besiyerinde büyütülmüştür. Daha sonra hücreler 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenerek ~3 saat inkübe edilmiştir ve süre sonunda hücreler flüoresan mikroskopta incelenerek GFP ışması yapıp yapmadıkları belirlenmiştir [38,39,41,42]. Paramomisine karşı direnç gösteren ve yeşil flüoresan ışma yapan Tetrahymena hücrelerinden sıvı nitrojen stoğu yapılmıştır [3].

Sıvı N<sub>2</sub> stoğu için Tetrahymena klonları PPY (2.5 µg/ml Pen-Strep, 100 µg/ml paramomisin) besiyerinde ~24 saat büyütülmüşlerdir. Süre sonunda hücreler 8.000 rpm'de 5 dk peletlenerek 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) açlık tamponunda yıkanmış ve tekrar peletlenerek başlangıç besiyeri hacminde açlık tamponunda çözölmüştür. Açlığa alınan hücreler ~18-24 saat sonra Thoma lamı ile sayılarak ml'deki hücre sayıları belirlenmiştir. Konsantrasyonu belirlenen hücrelerden 5x10<sup>6</sup> kadar hücre içeren hacim alınarak 8.000 rpm'de 5 dk peletlenmiş ve 3 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)'de çözölmüştür. Çözölen hücrelerin üzerine membran filtre ile steril edilmiş 2 ml %20 DMSO eklenerek nazıkce karıştırılmıştır. Homojen hale getirilen karışımdan 200'er µl alınarak karyojenik tüplere bölünmüş ve 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Süre sonunda karyojenik tüpler, içersinde 250 ml izopropanol bulunan Myster Frosty'e koyulmuş ve -86 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüpler Sıvı N<sub>2</sub>'ye alınmıştır. Dondurarak stoklanması yapılan Tetrahymena'lar tekrar uyandırılmak istendiğinde ise, sıvı N<sub>2</sub>'den çıkartılan karyojenik tüpler hemen 37 °C'deki su banyosuna koyularak hücrelerin çözölmesi sağlanmışır. Hücreler çözöölünce sıcaklığı 37 °C olan PPY besiyerine ekilmiş ve gece boyu 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra canlanan hücreler oda sıcaklığında büyümeye bırakılmışır.

#### **j) Flüoresan Mikroskop Analizleri**

Transformasyon sonucunda elde edilen pozitif Tetrahymena klonları Leice DM6000 flüoresan mikroskobu ile incelenerek yeşil flüoresan ışma analizi yapılmıştır. Çalışmada yapılandırılan vektörlerde, flüoresan protein genleri CdCl<sub>2</sub> ile indüklenabilen Mtt1 promotörü kontrolünde bulunmaktadır [42]. Bu sayede çalışılan genlerin kontrollü bir şekilde üretimi mümkündür. pEGFP, pVTsfGFP,

pVsfGFP ve pVTtsfGFP-H vektörleri ile transforme edilmiş Tetrahymena klonları 25 ml PPY besiyerine ekilerek ~20 saat 30 °C 120 rpm’de büyütülmüştür. Büyüyen hücrelerden 500 µl alınarak ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine 0.5 µl %20’lik formaldehit eklenerek hücrelerin ölmesi sağlanmıştır. Formaldehit eklenince hemen klonlardan bir miktar alınarak preparat yapılmış ve 20X objektifte GFP filtresinde görüntülenmiştir. Daha sonra besiyerinde bulunan hücreler 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmiş ve her klon ayrı bir steril petri tabağına dökülmüştür. Bu sayede hücrelerin çalkalama olmadan yeterince oksijenlenmesi sağlanmıştır. Hücrelerin petri tabaklarına aktarılmasının sebebi, her 20 dk’da bir flüoresan görüntüleme yapılacağından, hücrelerin çalkalamalı etüve koyulup alınması hem zamansal hemde pratiklik açısından sorun çıkartmasıdır. Petri tabağına aktarım hücrelerin yeterince oksijenlenmesini sağladığından deneysel bir soruna neden olmamıştır. İndükleme yapıldıktan sonra her 20 dk’da 500’er µl örnek toplanmış ve formaldehit ile hareketsiz hale getirildikten sonra flüoresan mikroskopta görüntülenmiştir. Toplamda 240 dk (13 ölçüm) ölçümden sonra elde edilen görüntüler toplanarak analiz edilmiştir.

**k) CdCl<sub>2</sub> ile İndüklenen Tetrahymena Klonlarından Zamana Bağlı Spektral Flüoresan Işıma Ölçümü, Toplam Protein İzolasyonu ve Ni-NTA Affinite Safılaştırması**

Canlı Tetrahymena klonlarından spektroskopik flüoresan ölçüm yapılarak, TtsfGFP, sfGFP ve EGFP tabanlı klonlar arasındaki ışıma farkları elde edilmiştir (pVTtsfGFP, pVsfGFP, pEGFP). Tetrahymena klonları PPY (100 µg/ml paramomisin, 2.5 µg/ml Pen-Strep) besiyerinde 30 °C, 120 rpm’de yaklaşık 2 gün büyütülmüş ve hücre konsantrasyonları Thoma lamı ile sayılarak ml’de 300.000’e ayarlanmıştır. Yoğunlukları eşitlenen klonların her birinden 5 ml alınarak santrifüjlenmiş ve hücre peleti -20 °C’ye kaldırılmıştır. Daha sonra yine her bir klondan 200 µl alınarak UV geçirgen 96’lık microplate’e koyulmuş ve Molecular Devices Spektramax M2 cihazında flüoresan okuma yapılmıştır. Flüoresan okuma değerleri 488 nm eksitasyon, 510 nm emisyon değerlerinde yapılmıştır. Daha sonra Tetrahymena klonları 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmiştir.

İndüklenen hücreler oda sıcaklığında, orbital çalkalayıcıda 50 rpm’de inkübe edilmiştir. İndüklemeden sonra her 30 dk’da bir klonlardan 5’şer ml örneklem alınmış ve peletlenerek 20 °C’ye kaldırılırken, aynı zamanda herbir klondan 200’er µl alınarak UV geçirgen 96’lık microplate aktarılmış ve flüoresan okuma yapılmıştır. Toplamda 180 dk yapılan indükleme boyunca sıfırıncı zaman dahil 7 ölçüm yapılmıştır. Sonuçta elde edilen değerler grafiklenerek klonların arasındaki karşılaştırma yapılmıştır.

Zaman bağlı flüoresan ölçüm deneyinde yapılan analizler sonucunda, deney grubları ile kontrol grubları arasında dramatik farkın elde edildiği sürede (180. dk) elde edilen örneklemelerden toplam protein izolasyonu yapılmıştır. Tetrahymena’dan toplam protein izolasyonu Zhang ve Thompson [43] yöntemine göre yapılırken, T100B tamponu kullanılmıştır. Tampon içeriği şöyledir:

Final konsantrasyonu

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Triton-X 100               | %1      |
| Tris/HCl (pH 7.5)          | 2.5 mM  |
| EDTA                       | 150 mM  |
| PMSF                       | 2 mM    |
| Proteaz İnhibitör Kokteyli | 1X - 4X |

İndükleme yapılan Tetrahymena klonlarından elde edilen peletlerin üzerine (25 milyonluk hücre peleti için 3 ml T100B gereklidir) gerekli miktarda soğuk T100B tamponu eklenip, peletler pipetlenerek çözülmüştür. Çözülen peletler 5 sn kadar vortekslelendikten sonra 10 dk buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında ara ara örnekler karıştırılmıştır. Süre sonunda örnekler 15.000 g 4 °C’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım temiz tüplere aktarılmıştır. Elde edilen bu sıvı toplam proteindir ve Tetrahymena proteinlerinin ~%80 nini temsil etmektedir.

Elde edilen toplam proteinlerin içerdiği protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edilmiştir [60]. Bunun için öncelikle protein saflaştırma tamponu olan T100B ile standart eğri oluşturulmuştur. T100B nin içeriği Bradford ölçümü için tam uygun olmadığından, tampon su ile 1:10 dilüe edildikten sonra standart eğri oluşturulmasında kullanılmıştır. Standart eğri için BSA (Bovine serum albumin)

proteininden bir seri tartılarak 1:10 dilüe edilmiş T100B de çözölmüştür ve Bradford yöntemi ile absorbansları elde edilmiştir. Elde edilen absorbanslardan standart eğri çizilerek, eğrinin formülü elde edilmiştir ve formöl şöyledir;

$$y(\text{absorbans})=0.4222x + 0.005$$

Burada, “y” yerine Bradford’da elde edilen absorbans değeri yazıldığında, “x” yani protein miktarı hesaplanmış olunur. Bradford ölçümü yapılırken, ölçülen proteinlerde su ile 1:10 dilüe edilerek ölçüme alınmıştır. Daha sonra elde edilen absorbans formölde yerine konarak “x” değeri elde edilmiştir. Elde edilen bu değeri dilüsyon faktörü olan “10” ile çarpılarak, elimizdeki örneğin mililitresindeki protein miktarı miligram cinsinden elde edilmiştir.

N-terminalinde 6X His takısı bulunan klonlardan elde edilen toplam proteinlerden Ni-NTA seferoz tanecikleri ile afinite saflaştırması yapılmıştır. Saflaştırma Qiagen “The QIAexpressionist 2003” maneline göre yapılmıştır. Manuelde Tetrahymena’dan ya da diğer siliatlardan affinite saflaştırması gibi bir başlık olmadığından, manueldeki mevcut diğer prosedürler modifiye edilmiştir. Naturel şartlarda gerçekleştirilen affinite saflaştırmasında imidazol kullanılarak saflaştırma yapılmıştır. Affinite saflaştırmasında manuelde olmayan T100B tamponu, içerisine proteinaz inhibitör kokteyli konmadan ve içerisindeki PMSF miktarı 1 mM’a indirilerek hazırlanmıştır. Tetrahymena klonlarından saflaştırılan toplam proteinlerden belirli bir miktar alınarak, 4 ml toplam proteine 1 ml %50 slurry Ni-NTA seferoz taneciğı olacak şekilde, karıştırılmıştır. Karışım çalkalamalı bir şekilde 2-3 saat +4 °C’de inkübe edilmiştir. Böylelikle 6X His takısı bulunan proteinlerin Ni-NTA taneciklerine bağlanması sağlanmıştır. İnkübe edilen protein hazırlanan bir kolona aktarılmış ve Ni-NTA taneciklerine bağlanamayan fazla sıvı kısmın akması sağlanmıştır (F.T). Daha sonra kolona eklenen örnek 4ml x 2 kez yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama solüsyonu için hazırlanan T100B içerisine finalde 20 mM olacak şekilde imidazol eklenmiştir. İmidazolün bu yüzdesi 6XHis takılı proteinleri Ni-NTA taneciklerinden ayırmazken, kolona bağlanamayan fazla proteinlerin yıknamasını sağlamaktadır. Yıkama adımında kolondan ayrılan ilk atık (1 W) toplanmıştır. Yıkama işleminden sonra kolona yüklenen Ni-NTA taneciklerinden rekombinant proteinler elüsyon solüsyonu (finalde 250 mM imidazol içeren modifiye T100B)

ile çözölüp alınmıştır. Elüsyon 500 µl x 2 kez yapılmıştır. İmidazol 6XHis takısına göre daha küçük ve Ni-NTA taneciklerine daha fazla afiniteye sahiptir. Bu sayede rekombinant proteinler kolondan sökölerek alınmıştır.

#### **l) Tetrahymana Klonlarından İzole Edilen Proteinlerden SDS PAGE Analizi ve Western Blotlama**

Tetrahymenanın pVTsfGFP, pVsfGFP ve pEGFP klonlarından zamana bağı spektroskopik ışımaya deneyinde elde edilen 180. dk toplam proteinleri ile 18 saat indüklenen pVTsfGFP ile pVTsfGFP-H klonlarından izole edilen proteinlerden eşit mg'da protein alınarak poliakrilamid SDS jele yüklenmiş ve elektroforez edilmiştir. Poliakrilamid jelinin paketleme kısmı %5, ayırma kısmı ise %10'luk dökölmüştür. Jel içeriğı aşağıdaki gibidir;

**Tablo 1.** Değışik konsantrasyonlardaki poliakrilamid jel içeriğı. Verilen değıerlerdeki miktarlarda karışım hazırlandıktan sonra **paketleme jeli** için 50µl %10 APS, 10 µl TEMED eklenirken; **ayırma jeli** için 50 µl %10 APS, 5 µl TEMED eklenmiştir. \*Paketleme jeli için 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), ayırma jeli için 1.5M Tris-HCl (pH 8.8).

| % Jel konsantrasyon | dH <sub>2</sub> O (ml) | %30 Degaz edilmiş Akrilamid/Bis (ml) | Jel Buffer* (ml) | %10 SDS (ml) |
|---------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------|--------------|
| %5                  | 5.7                    | 1.7                                  | 2.5              | 0.1          |
| %10                 | 4.1                    | 3.3                                  | 2.5              | 0.1          |
| %15                 | 3.1                    | 4.3                                  | 2.5              | 0.1          |

SDS PAGE yapılırken aynı yüklemekten 2 paralel yapılmıştır. Bunlardan biri Comassie Brilliant Blue ile boyanırken diğeri Western blotlama deneyinde kullanılmıştır. Comassie ile boyanan jel ~1 saat boyandıktan sonra, dH<sub>2</sub>O ile jelden fazla boya uzaklaştırılmış ve elde edilen protein bantları gözlenmiştir.

Western blotlama deneyinde, elektroforez edilen poliakrilamid jel Western transfer tamponuna alınarak ~1 saat orbital çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Böylece jelin şişmesi ile gözeneklerinin biraz daha açılarak, içerisindeki proteinlerin geçişine daha müsait hale gelmesi sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra şişen jelin boyutu cetvel ile ölçölmüş ve bu ölçüye uygun

kalın whatman kâğıtları ile PVDF membran kesilmiştir. Daha sonra Western transfer tamponu ile ıslatılmış kalın whatman kâğıtlarından 3 adet üst üste koyulmuş, onun üzerine metanole batırılarak yüzeyi aktif hale getirilmiş PVDF membran koyulmuştur (aktif yüzü yukarı bakacak şekilde). Membranın üzerine poliakrilamid jel dikkatlice yerleştirilmiş, son olarak jelin üzerine ise 3 adet Western tamponu ile ıslatılmış kalın whatman kâğıtlarından koyulmuştur ve Semi-Dry (yarı kuru) Blotlama cihazına yerleştirilmiştir. Blotlama cihazına akım olarak, “jelin alanı x 0.8” değerinde mA akım verilerek ~2-3 saat blotlama işlemi yapılmıştır. Böylelikle poliakrilamid jeldeki proteinler elektrik akımı ile PVDF membrana geçmiştir. Blotlama işleminden sonra PVDF membran 1X TBS ile yıkanarak, Western Blocker (W0138, Sigma) ile 1 saat bloklanmıştır. Bloklama bittikten sonra membran 4-5 kez 5'er dk TBS-T tamponu ile (1X TBS + %0.05 Tween20) yıkanmıştır. Yıkamadan sonra membran TBS de 1:20 dilüe edilmiş Western Blocker içerisine eklenmiş birincil antikor ile +4 °C'de orbital çalkalayıcıda gece boyu inkübe edilmiştir. Deneyimizde birincil antibadi olarak monoklonal mouse Anti-GFP (Roche, katalog no:11814460001) kullandığımızdan 1:20 dilüe Western Blockere'ın ml başına 1µl Anti-GFP eklenerek inkübasyona alınmıştır. Birincil antikor ile inkübasyondan sonra, membran TBS-T ile 4-5 kez 5'er dk yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra membran, 1X TBS ile 1:20 dilüe edilmiş Western Blockere'a eklenen anti-mouse IgG (Sigma, Kat.no: A5225) ile 1 saat oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra membran 2 kez 5'er dk 1X TBS ile yıkanmıştır. Yıkamadan sonra membran TMB (T0565, Sigma) ile muamele edilerek, ikincil antikorun üzerindeki belirtecin aktif hale getirilmesi sağlanmış ve bantlar görüntülenmiştir.

#### **m) Çalışmada Kullanılan Primerler**

FSfGFPsuz 5' gcgcatatgatgagcaaaggagaagaacttttc 3'

RSfGFPsuz 5' acgggatcctcatattgtagagctcatccatgcc 3'

FSfGFPlu 5' gcgcatatgatgtctaaaggtgaagaattattcactgg 3'

RSfGFPlu 5' acgggatcctcatattgtataattcgtccataacc 3'

FSfGFPdizi 5' ggtcctgttttattacctgacaacc 3'

RSfGFPdizi 5' ccgtagtagcgtcaccttcacc 3'

FSfGFPsuz-RSfGFPsuz (sfGFP için) ve FSfGFP<sub>lu</sub>-RSfGFP<sub>lu</sub> (TtsfGFP için) primer çiftleri pUC57 klonlama vektörü içerisindeki sfGFP ve TtsfGFP'nin PZR ile üretilerek *E.coli* pET16-b ekspresyon vektörüne NdeI-BamHI klonlaması için tasarlanmıştır. Her iki vektör çiftinin ileri primerinin 5' ucunda NdeI kesim bölgesi ile geri primerinin 3' ucunda BamHI kesim bölgesi bulunmaktadır. Ayrıca bu 4 primerin uçlarına, restriksiyon kesim deneylerinde enzimin oturması için fazladan 3 baz eklenmiştir. Yine bu iki primer çifti, Tetrahymena ifade vektörlerinin kontrolünde (koloni PZR) kullanılmıştır. FSfGFPdizi ve RSfGFPdizi primerleri TtsfGFP ile sfGFP primerine göre ortak tasarlanmış olup, genlerin içlerinden 5' ve 3' uçlarına doğru yönlendirilmiş dizi analizi primerleridir. Genlerin, vektörde klonlandığı bölgeye yerleşme şekli ve birleşme noktalarının teyidi için tasarlanmıştır.

## Ek-7 Sentetik Üretimi Yapılan TtsfGFP ve sfGFP Kasetleri

Tasarımı yapılarak “Shanghai ShineGene Molecular Bio-Technologies” firmasına ürettirilen TtsfGFP ve sfGFP kasetleri aşağıda verilmiştir.

- TtsfGFP Kaseti: 791 bç uzunluğundadır. **Koyu** yazılmış dizi TtsfGFP dizisidir.

```
5' gtttaaacatg caccaccaccaccaccac gacgacgacgacaaa atgtctaaaggtgaagaatt  
attcactgggtgttggttcctatttttagttgaattagacggtgacgttaacggtcacaaattctctgt  
tagaggtgaaggtgaaggtgacgctactaacggtaaatcttaaaattcatttgcactactgg  
taaattacctgttccttggcctacttttagttactactttaacttacgggtgttcaatgcttctctag  
ataccctgaccacatgaaaagacacgacttcttcaaactctgctatgcctgaaggttacgttcaaga  
aagaactatttctttcaaagacgacggtacttacaaaactagagctgaagttaaattcgaaggtga  
cacttttagttaacagaattgaattaaaaggtattgacttcaaagaagacggtaacatttttaggtca  
caaattagaatacaacttcaactctcacacggtttacattactgctgacaaacaaaaaacggtat  
taaagctaacttcaaaattagacacacggtgaagacggttctgttcaattagctgaccactacca  
acaaaacactcctattggtgacgggtcctgttttattacctgacaaccactacttatctactcaatc  
tgttttatctaaagaccctaacgaaaaagagaccacatgggttttattagaattcggtactgctgc  
tggtattactcacggtatggacgaattatacaaa gacgacgacgacaaa ctcgag tga tga gggcc  
c 3'
```

- sfGFP Kaseti: 791 bç uzunluğundadır. **Koyu** yazılmış olan dizi sfGFP dizisidir.

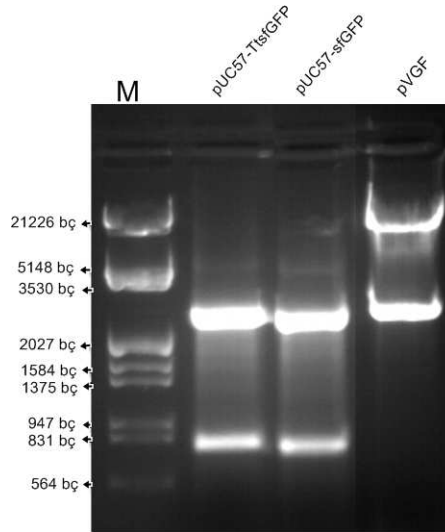
```
5' gtttaaacatg caccaccaccaccaccac gacgacgacgacaaa atgagcaaaggagaagaact  
tttctactggagttgtcccaattcttgttgaattagatgggtgatgttaatgggcacaaattttctgt  
ccgtggagaggggtgaaggtgatgctacaaacggaaaactcacccttaaattttatttgcactactgg  
aaaactacctgttccatggccaacacttgtcactactctgacctatgggtgttcaatgcttttccc  
ttatccggatcacatgaaacggcatgactttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacagga  
acgcactatatctttcaaagatgacgggacctacaagacgcgtgctgaagtcaagtttgaaggtga  
tacccttggttaatcgatcgagttaaaaggtattgattttaaagaagatggaaacatttctcggaca  
caaactcgagtacaactttaactcacacaatgtatacatcacggcagacaaacaaaagaatggaat  
caaagctaacttcaaaattcgccacaacggtgaagatgggtccgttcaactagcagaccattatca  
acaaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattacctgtcgacacaatc  
tgtcctttcgaagatcccaacgaaaagcgtgaccacatgggtccttcttgagtttgtaactgctgc  
tggtgattacacatggcatggatgagctctacaaa gacgacgacgacaaa ctcgag tga tga gggcc  
c 3'
```

Gri: PmeI kesim bölgesi; Turkuaz: 6X His takısı; Pembe: Enterokinaz kesim bölgesi; Yeşil: XhoI kesim bölgesi; Mavi: ApaI kesim bölgesi

## Ek-8 İfade Vektörlerinin Oluşturulması

Tetrahymena’da TtsfGFP ve sfGFP genlerinin ifade edilmesi için, pUC57 vektörü içerisinde bulunan TtsfGFP ve sfGFP’nin, pVGF vektörüne klonlamaları yapılmıştır. Klonlamada 3 çeşit vektör yapılandırılmıştır. Bunlardan ikisi PmeI-ApaI klonlaması ile oluşturulan pVTtsfGFP ve pVsfgGFP iken, üçüncüsü Tetrahymena hipotetik proteini kodlayan genin (H), pVTtsfGFP’ye XhoI-ApaI klonlanmasıyla oluşturulan pVTtsfGFP-H’dır.

pUC57-TtsfGFP, pUC57-sfGFP ve pVGF vektörlerinin herbirinden ~6 µg alınarak, PmeI (Thermo)- ApaI (TAKARA) restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesim ürünleri agaroz jele yüklenerek elektroforez edilmiştir. PmeI-ApaI kesiminden gelen 791 bç büyüklüğündeki Tt-sfGFP ve sfGFP ile ~15 kb büyüklüğündeki pVGF jelden kesilmiştir (şekil 1). Tüm jelden kesilen ürünler “QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit (cat: 28706) ile saflaştırılmıştır.

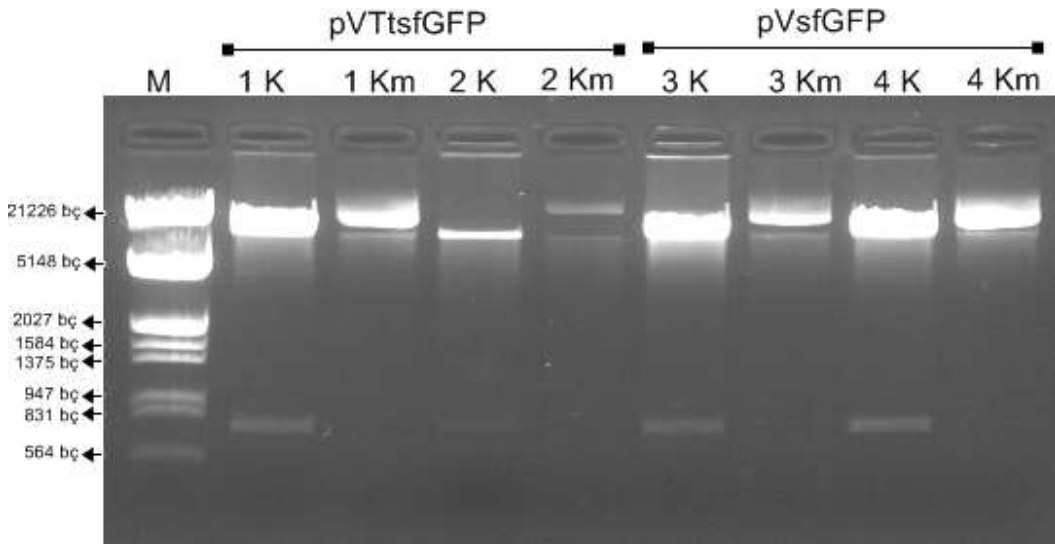


**Şekil 1:** pVTtsfGFP ve pVsfgGFP vektörlerini yapılandırmak için PmeI-ApaI kesimi yapılan pUC57- TtsfGFP, pUC57-sfGFP ve pVGF vektörleri. Kesime alınan pUC57-TtsfGFP ve pUC57-sfGFP vektörleri, 791 bç büyüklüğündeki insert ve 2710 bç büyüklüğündeki vektör gövdesi şeklinde ayrılmıştır. 791 bç büyüklüğündeki bantlar hedeflenen TtsfGFP ve sfGFP genleridir. Kesime alınan pVGF vektörü ise ~2700 bç büyüklüğündeki EGFP+DrpI ile ~15 kb büyüklüğündeki vektör gövdesine ayrılmıştır. Agaroz jel %0.8’lidir. Agaroz jelin ayırma gücü çok etkin olmadığından ~15 kb büyüklüğündeki pVGF vektör gövdesi Markerın 21226 bç büyüklüğündeki bandı hizasında koşmuştur. **M.** EcoRI-HindIII Lambda DNA marker (Thermo).

Safılaştırılan TtsfGFP ile sfGFP, pVGF içerisine PmeI-ApaI klonlaması ile yerleştirilmiştir (pVTtsfGFP, pVsfgGFP). Ligasyonlar “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” de belirtilen formüle göre 3:1 oranda yapılırken [38], reaksiyon gece boyu 16  C’de gerçekleştirilmiştir (enzim olarak NEB T4 DNA Ligaz kullanılmıştır). Ligasyon reaksiyonu sonrası enzim inaktivasyonu firmanın önerdiği 65  C’de 10 dk yerine, 20 dk yapılmıştır. Çünkü pVGF büyük bir vektördür ve dolayısı ile üzerinde birçok ligaz enzimi bağlı bulunmaktadır. Vektörün zerindeki tüm enzimlerin ayrıldığından emin olmak için enzim inaktivasyon süresi uzatılmıştır.

Ligasyon rnleri NEB-10 Beta kimyasal kompatent hücrelerine ısı şoku ile transforme edilmiştir. Transformasyon sonrasında transformasyon tabaklarından 20’ser koloni seçilmiş ve master tabak yapılmıştır. Master tabaklardaki koloniler, koloni PZR ile taranmıştır. Tüm koloni PZR’lerde taranan her 10 koloniden ortalama 5 kadarı pozitif çıkmıştır.

Yapılandırılan ve koloni PZR de pozitif olduğu görülen tüm vektörler içerlerine klonlama yapılan enzim çiftleri ile kesilerek ikinci bir kontrolden geirilmiştiler ve koloni PZR’nin sonucu teyit edilmiştir (şekil 2).

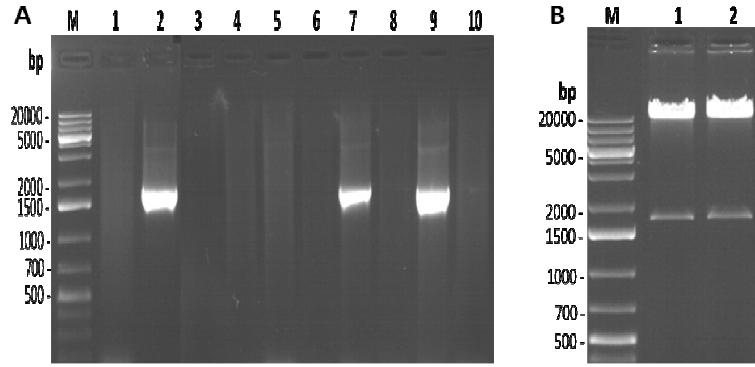


**şekil 2:** Koloni PZR’de pozitif olduğu belirlenen pVTtsfGFP ve pVsfgGFP vektörlerinin PmeI-ApaI ikili kesim kontrolü. pVTtsfGFP ve pVsfgGFP vektörlerini içeren farklı klonlardan 2’ser adet alınarak PmeI-ApaI restriksiyon kesimine alınmıştır ve agaroz jelde hem kesilmiş hem kesilmemiş formda yüklenmiştir. Fotoğrafta grldği gibi kesilmiş

olan vektörlerden 791 bç'lik insertler salınırken, üst kısımlarında ~15 kb büyüklüğündeki vektör gövdeleri kalmıştır. Kesilmemiş vektörlerde konkamer şeklinde ve olması gereken yere yakın koşmuşlardır. Ayrıca kesilmemiş vektör içerisinde farklı bir vektör kontaminasyonu olmadığı görülmektedir. **M.** EcoRI-HindIII Lamda DNA marker. **K.** Kesilmiş vektör. **Km.** Kesilmemiş vektör. Agaroz jel %0.8'likir.

Pozitif olduğu belirlenen vektör formlarının *E. coli* klonlarından birer tane seçilerek büyütülmüş ve klasik fenol-kloroform yöntemi ile plazmit izolasyonu yapılmıştır [38]. İzole edilen vektörler TtsfGFP'nin uçlarına yakın konuma göre tasarlanmış ve içeriden dışarıya doğru yönlendirilmiş ileri-geri primerler ile Dizi Analizi yapılmıştır. Böylelikle klonlanan genlerin okuma çerçevesinde olup olmadığının yanında klonlanan bölgenin uç kısımlarının doğruluğuda teyit edilmiştir.

Yapılandırılan pVTtsfGFP vektörü teyit edildikten sonra içerisine Tetrahymena hipotetik protein geni H, XhoI-ApaI klonlaması ile klonlanmıştır. Klonlamada pVTtsfGFP ve pGEM-T-H vektöründen ~6 µg alınarak XhoI (TAKARA)- ApaI (TAKARA) restriksiyon kesimine alınmıştır. Kesimden sonra ürünler agaroz jel elektroforezine alınmış ve kesim ürünleri olan pVTtsfGFP (~16 kb) ile H geni (1668 bç) agaroz jelde 365 nm'de görüntülenerek jelden kesilmiş ve "QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit (cat: 28706) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma ürünleri yukarıda bahsedildiği gibi ligasyona alınarak kimyasal kompetent *E. coli* Neb-10 Beta hücrelerine ısı şoku ile transform edilmiş ve devam eden pozitif klon taraması (Şekil 3-A) ve vektör teyit işlemleri (Şekil 3-B) diğer vektörlerle aynı şekilde yapılmıştır.



**Şekil 3:** pVTtsfGFP-H vektörünün klonlanmasında elde edilen kolonilerden yapılan koloni PZR. **A.** pVTtsfGFP-H vektörünü içeren *E.coli* klonlarının koloni pzs sonucu. **M.** Marker Fermentas GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 75 to 20,000 bp Thermo #SM1331 **1.** Negatif kontrol. pVTtsfGFP vektörü, diğer klonlar ile aynı şartlarda kurulan PCR sonucu. **2.** Pozitif kontrol. pET16b-H (laboratuvarımızda önceden yapılandırılan bir vektör) vektöründen, diğerleri ile aynı şartlarda kurulan PCR sonucu. **3-10.** pVTtsfGFP-H vektörünü içerdiği düşünülerek taranan koloniler **B.** Koloni PZR’de pozitif olduğu belirlenen A’daki 7. ve 9. kolonilerden izole edilen pVTtsfGFP-H vektörlerinin XhoI-ApaI restriksiyon kesim kontrolü.

Şekil 3-A’da 7. ve 9. kuyularda görülen bantlar, 2. kuyudaki pozitif kontrol ile aynı ve 1668 bp büyüklüğündedir. Bu *E. coli* klonlarından saflaştırılan plazmitlerden kurulan XhoI-ApaI kesim kontrolüne baktığımızda (B), beklenen büyüklük olan 1668 bp’de hipotetik H geni ile normalde ~16 kb’de koşması gerekirken ~20 kb civarında koşan pVTtsfGFP vektörü görülmektedir. pVTtsfGFP’nin beklenenin üstünde koşması, kullanılan agaroz jelin konsantrasyonunun sahip olduğu ayırım gücünün büyük DNA’larda etkin olmamasıdır.

## Ek-9 pVTtsfGFP, pVsfGFP ve pVTtsfGFP-H İfade Vektörlerinin Dizi Analizi

- pVTtsfGFP vektöründe TtsfGFP ile rpl29 terminasyon bölgesinin birleşiminin dizi analizi

agacgacgacgacaaaactcgagtgatgagggccc aacaaacaaccaacaaaacttctattcataaattatac  
 taaactatatgtctcatatatcatacaaaatatcatatTTTTTaaatgccatataatgtgctgtactttatt  
 taaatTTTTaactcaaaactatTTTTcatataaacttattcattcttccctataacttaacaacaacgaaaa  
 aaaaaaatacttctcaaatattcaaaacaatatTTTTacatTTTTtctaatccaaatacaaaatgtaaaca  
 atattcaaaatTTTTaaataaattaattaatgaatgaatgaatgtatctttgttaatttcaaaataattttga  
 tgttcattcaatcagtc aaataatgaaaacttctcaaccttaaactcattaatatttaatttcgtataataaa  
 tcaaatTTataaatagtagttattttaatcccttcataagtaattttgagcaataaat

Sarı gölgeli kısım TtsfGFP kasetinin bitim bölgesidir. Gri gölgeli alan ise rpl29 geni terminasyon dizisidir. Geri kalan dizinin ise Blast analizi yapılmış fakat analiz sonucunda verilen diziye benzer bir dizi elde edilmemiştir.

- pVTtsfGFP vektöründe Mtt1 protmotoru ile TtsfGFP birleşme bölgesinin dizi analizi

aattatttgtaaactTTTTtatttctgataaaaaataaattgattgactcatgatttaaactatgagtcaa  
 cctaactaatTTTcaaaattcttctatttctaaaatatagatgtgattccttgaatctctcttgaatataaagta  
 atTTTTtatatttctgatataattcttagctacgtgattcacgatttatgcaatgatccatataaaataatgt  
 aaatagtgtatataatataattcgtctTTTTtatttctttatataatttaaaaaaattaaaaaatttaataaa  
 gctctaataaaaaataataataactaaacttaaaatagttttaaacatgcaccaccaccaccaccagcagac  
 gacgacaaaatgtctaaagggtgaagtaattattcactgggtgtgttcctatttttag

Yukarıda verilen dizi analizi sonucunda Gri gölgelendirilmiş dizi Mtt1 promotoru, yeşil gölgelendirilmiş dizi ise TtsfGFP kasetidir. Elde edilen okumanın Mtt1-TtsfGFP dizisi ile dikey hizalaması aşağıda verilmiştir.

|                       |                                                                           |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Mtt1-TtsfGFP<br>okuma | CAATTTATTTCTAAAAATATTTAAAAATAAAAAATAATAAGGGTTTTGAATAACTCCTT 60<br>-----   |
| Mtt1-TtsfGFP<br>okuma | TAATTTAAATACACATTTTTAAATTTTTTTTAGCTCTTTAAATATTCATAAAAAATAAAA 120<br>----- |
| Mtt1-TtsfGFP<br>okuma | ATACTAACTAAAAATAAAAAAGATAATAATGATTAAAGGTATAATACTGAATAAGA 180<br>-----     |
| Mtt1-TtsfGFP<br>okuma | AAAAACATAATAGAGTACTTATTTTTTATATCACTATTTTTAATATCTTGAAAGCAAAAC 240<br>----- |
| Mtt1-TtsfGFP<br>okuma | TTTTTTATATATCTTAAATATATTGTATCGTTTATTCAATTATTTCTTTAAATTTCAA 300<br>-----   |

```

Mtt1-TtsfGFP      ATATATTGATAAAAAAGATGACATGTTTTTTAAAGAAAACATGAAATATAAAATAGATAA 360
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      ATATCAATTATTTTATTATTATAAATATATAAGCTGCTCAAAACATAGCTCATTTCATCAAT 420
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      TATAATATGTGAATCATTAAATTTTCAAAATATTACTCATTATTTAGGCTATCATTTATTT 480
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      TTTATTTTCAATTATCCGTTTCTATTATATTTTAAATATTAAGTTGTGATTCTTGAATTTT 540
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      GTGTCATGAATTATTTTGTAATCTTTTTATTCTGATAAAAAATATAAAATGATTGACTC 600
okuma      -----AATTATTTGTAATCTTTTTATTCTGATAAAAAATATAAAATGATTGACTC 52
                *****

Mtt1-TtsfGFP      ATGATTAAATCATGAGTCAACCTAACTAAATTTTCAAAATCTTCTATTCTAAAAATATAG 660
okuma      ATGATTAAATCATGAGTCAACCTAACTAAATTTTCAAAATCTTCTATTCTAAAAATATAG 112
                *****

Mtt1-TtsfGFP      ATGTGATTCTTGAATCTCTCTTGAATATAAAGTAATTTTTATATTCTGATATAAATCT 720
okuma      ATGTGATTCTTGAATCTCTCTTGAATATAAAGTAATTTTTATATTCTGATATAAATCT 172
                *****

Mtt1-TtsfGFP      TAGCTACGTGATTCACGATTTATACAATGATCCATATAAAATAATGTAATAGTGTATAT 780
okuma      TAGCTACGTGATTCACGATTTATGCAATGATCCATATAAAATAATGTAATAGTGTATAT 232
                *****

Mtt1-TtsfGFP      ATATATATTCGCTTTTTTATTCTTTATATAATTTAAAAAAATTTAAAAATTTAATAAA 840
okuma      ATATATATTCGCTTTTTTATTCTTTATATAATTTAAAAAAATTTAAAAATTTAATAAA 292
                *****

Mtt1-TtsfGFP      GCTCTAATAAAAAAATAAATAACTAACTTAAATAAGTTTAAACATGCACCACCACCA 900
okuma      GCTCTAATAAAAAAATAAATAACTAACTTAAATAAGTTTAAACATGCACCACCACCA 352
                *****

Mtt1-TtsfGFP      CCACCACGACGACGACGACAAAATGTCTAAAGGTGAAG-AATTATTCAGTGGTGTGTTG 959
okuma      CCACCACGACGACGACGACGACAAAATGTCTAAAGGTGAAGTAATTATTCAGTGGTGTGTTG 411
                *****

Mtt1-TtsfGFP      CTATTTTAGTTGAATTAGACGGTGACGTTAACGGTCACAAATCTCTGTTAGAGGTGAAG 1019
okuma      CTATTTTAG----- 420
                *****

Mtt1-TtsfGFP      GTGAAGGTGACGCTACTAACGGTAAATTAACTTTAAATTCATTTCACACTACTGGTAAAT 1079
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      TACCTGTTCTTGGCCTACTTTAGTTACTACTTTAACTTACGGTGTTCAATGCTTCTCTA 1139
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      GATACCCTGACCACATGAAAAGACAGCACTTCTTCAAATCTGCTATGCCTGAAGGTTACG 1199
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      TTCAAGAAAGAACTATTTCTTTCAAAGACGACGGTACTTACAAACTAGAGCTGAAGTTA 1259
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      AATTGGAAGGTGACACTTTAGTTAACAAGATTGAATTAAGGTATTGACTTCAAGAAG 1319
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      ACGGTAACATTTTAGGTACAAATTAGAATAACAACCTCAACTCTCACACGTTTACATTA 1379
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      CTGCTGACAAACAAAAACGGTATTAAAGCTAACTTCAAAATTAGACACAACGTTGAAG 1439
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      ACGGTTCTGTTCAATTAGCTGACCACTACCAACAAACACTCCTATTGGTGACGGTCTCTG 1499
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      TTTTATTACCTGACAACCACTACTTATCTACTCAATCTGTTTATCTAAAGACCCTAACG 1559
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      AAAAAAGAGACCACATGGTTTATTAGAATTCGTTACTGCTGCTGGTATTACTCACGGTA 1619
okuma      -----

Mtt1-TtsfGFP      TGGACGAATTATACAAAGACGACGACGACAACTCGAG 1657

```

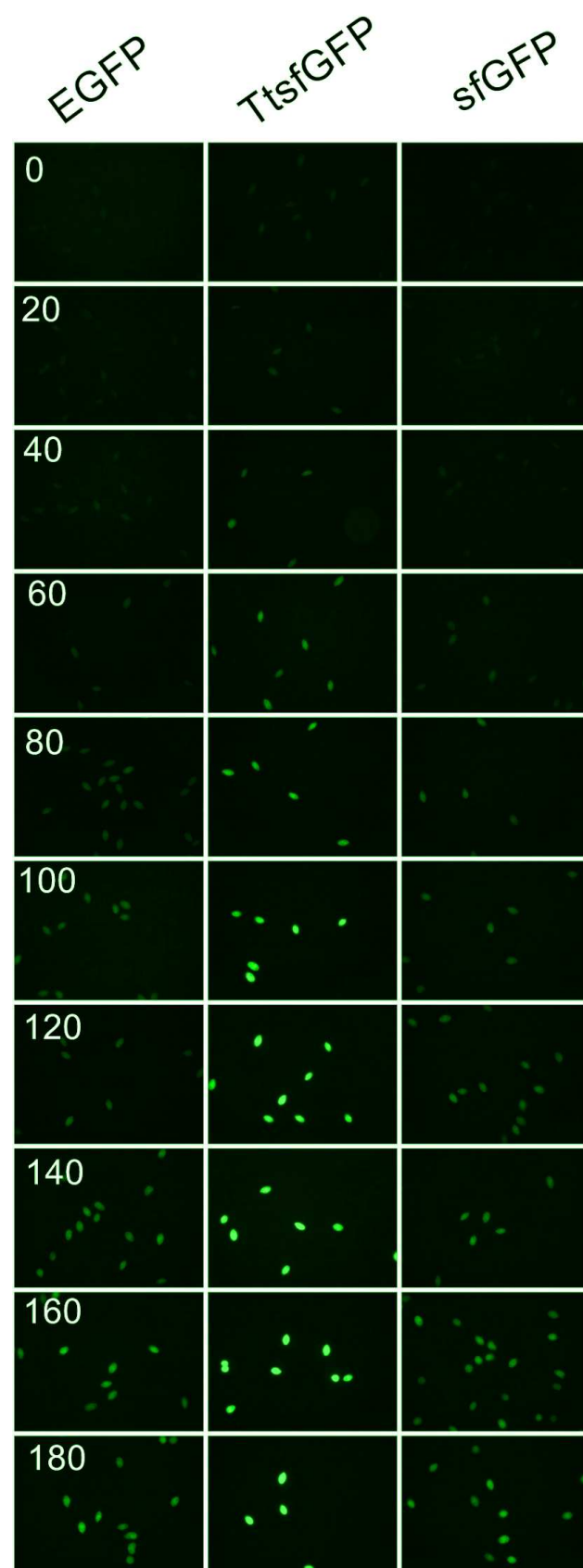
- pVsfGFP vektörü ile yapılan dizi analizinde primerlerden kaynaklanan sorun nedeniyle anlamlı sonuç elde edilememiştir. Fakat restriksiyon kesim kontrollerinde düzgün kesilmesi, kontrol PZR'lerde beklenildiği gibi bant elde edilmesi, Tetrahymena'da yapılan deneylerde fonksiyonel protein gözlenmesi gibi sonuçların elde edilmesi pVsfGFP vektörünün beklenildiği gibi olduğunu göstermektedir.

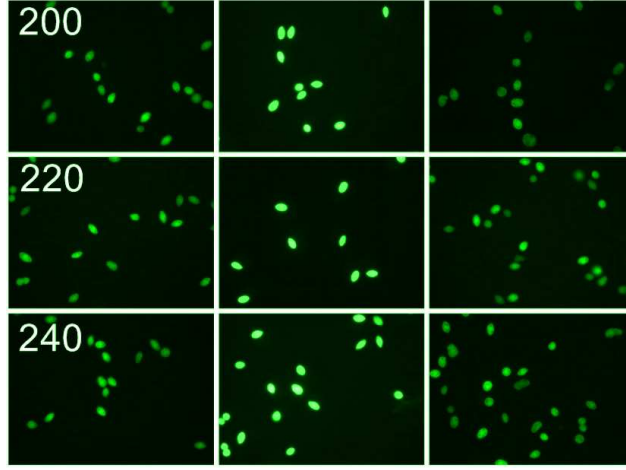
#### **Ek-10 Tetrahymena Klonlarının CdCl<sub>2</sub> ile İndüklenmesinin Ardından Zamana Bağlı Işımlarının Mikroskopik Karşılaştırılması**

Tetrahymena klonları PPY besiyerinde (100 µg/ml paramomisin) büyütüldükten sonra klonlardan 500 µl alınarak, 0.5 µl %20 formaldehit ile öldürülmüş ve preparatlanmıştır. Yapılan preparatlar Leica DM6000 Flüoresan mikroskopta 20X objektifte GFP fitresinde görüntülenmiştir. Elde edilen bu ilk görüntüler sıfıncı zaman olarak kayıt edilmiştir. Daha sonra kalan hücreler 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmiş ve indüklemekten sonra her 20 dk'da bir tüm klonlardan sıfıncı zamandaki gibi preparat hazırlanarak flüoresan mikroskopta görüntülenmiştir. Toplamda 240 dk sürdürülen deneyde elde edilen tüm görüntüler Şekil 'de verilmiştir.

Sitoplazmik protein olan EGFP, TtsfGFP ve sfGFP kendi aralarında değerlendirildiğinde en erken ve en fazla ışımaya sahip olan klon TtsfGFP klonudur. TtsfGFP 20. dk'dan itibaren hafif ışımaya başlarken, sfGFP ve EGFP 60. dk'da ışımaya başlamıştır. TtsfGFP henüz 100. dk'da iken flüoresan görüntüleme açısından parlaklığı doygunluğa ulaşırken, sfGFP ve EGFP 200-220. dk'larda ulaştığı görülmektedir. TtsfGFP'nin 100. dk'dan itibaren sahip olduğu flüoresan ışımaya gücüne ve parlaklığına sfGFP ve EGFP deney süresince ulaşamamıştır.

Deneyde kullanılan Leica DM6000 flüoresan mikroskopunun kamera sistemi kalitesi düşük olduğundan; GFP fitresinde yapılan görüntülemeye yeşil renkte olması gereken görüntüyü turkuaz renkte göstermektedir. Elde edilen fotoğraflar, Tetrahymena'ların flüoresan mikroskopta görülen orijinal görüntüsüne uygun olarak "PhotoScape 3.6.3" programı ile renklendirilmiştir.





**Şekil:** CdCl<sub>2</sub> (2 µg/ml) ile indüklenerek her 20 dk'da bir görüntülenenen Tetrahymena klonları. Leica DM6000 flüoresan mikroskobunun kamera sistemi yetersiz olduğundan, yeşil ışımaya sahip olan Tetrahymena hücreleri turkuaz renkte fotoğraflanmıştır. Elde edilen fotoğraflar, Tetrahymena'ların flüoresan mikroskopta görülen orijinal görüntüsüne uygun olarak "PhotoScape 3.6.3" programı ile renklendirilmiştir.

### Ek-11 Tetrahymena Klonlarının CdCl<sub>2</sub> ile İndüklenmesinin Ardından Zamana Bağlı Işımlarının Spektroskopik Karşılaştırılması

Tetrahymena TtsfGFP (pVTtsfGFP), sfGFP (pVsfgGFP) ve EGFP (pEGFP) klonları PPY (100 µg/ml paramomisin) besiyerinde büyütülmüş ve hücre konsantrasyonları 300.000 hücre/ml'ye ayarlandıktan sonra klonlar 2 µg/ml CdCl<sub>2</sub> ile indüklenmiştir. İndüklemeye birlikte sıfırıncı zamanda dahil her 30 dk'da bir Molecular Devices Spektramax M2 cihazında 488 nm ekisitasyon / 510 nm emisyonunda flüoresan okuma yapılmıştır. Deney 3 bağımsız tekrar şeklinde yapılmış ve elde edilen flüoresan ölçümleri aşağıda verilmiştir (Tablo 1).

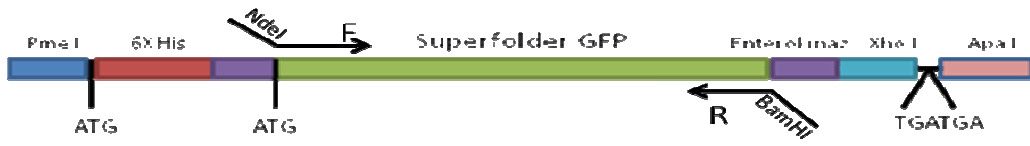
**Tablo1:** CdCl<sub>2</sub> ile indükledikten sonra zamana bağlı olarak flüoresan ışıması ölçülen Tetrahymena klonlarından elde edilen ölçüm değerleri.

| 1. Tekrar |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|           | 0 dk     | 30 dk    | 60 dk    | 90 dk    | 120 dk   | 150 dk   | 180 dk   |
| TtsfGFP   | 155,873  | 197,83   | 580,127  | 1004,516 | 1730,478 | 2690,553 | 4138,104 |
| sfGFP     | 484,559  | 491,799  | 761,445  | 912,606  | 1148,352 | 1316,686 | 2086,915 |
| EGFP      | 271,807  | 157,002  | 512,539  | 628,71   | 843,812  | 1152,145 | 1501,793 |
|           |          |          |          |          |          |          |          |
| 2. Tekrar |          |          |          |          |          |          |          |
|           | 0 dk     | 30 dk    | 60 dk    | 90 dk    | 120 dk   | 150 dk   | 180 dk   |
| TtsfGFP   | 474,364  | 431,489  | 618,175  | 1069,998 | 2071,059 | 3416,058 | 4437,619 |
| sfGFP     | 508,265  | 504,075  | 566,958  | 809,546  | 1161,22  | 1650,287 | 2090,569 |
| EGFP      | 422,369  | 430,64   | 450,406  | 512,41   | 596,089  | 806,015  | 1175,6   |
|           |          |          |          |          |          |          |          |
| 3. Tekrar |          |          |          |          |          |          |          |
|           | 0 dk     | 30 dk    | 60 dk    | 90 dk    | 120 dk   | 150 dk   | 180 dk   |
| TtsfGFP   | 570,11   | 561,105  | 725,597  | 1194,981 | 1987,195 | 3098,498 | 4402,661 |
| sfGFP     | 573,603  | 566,797  | 580,029  | 623,023  | 739,27   | 900,678  | 1632,425 |
| EGFP      | 577,49   | 519,728  | 555,269  | 614,68   | 794,012  | 944,709  | 1224,992 |
|           |          |          |          |          |          |          |          |
| Ortalama  |          |          |          |          |          |          |          |
|           | 0 dk     | 30 dk    | 60 dk    | 90 dk    | 120 dk   | 150 dk   | 180 dk   |
| TtsfGFP   | 400,1157 | 396,808  | 641,2997 | 1089,832 | 1929,577 | 3068,37  | 4326,128 |
| sfGFP     | 522,1423 | 520,8903 | 636,144  | 781,725  | 1016,281 | 1289,217 | 1936,636 |
| EGFP      | 423,8887 | 369,1233 | 506,0713 | 585,2667 | 744,6377 | 967,623  | 1300,795 |

Bağımsız tekrarlar ile 3 kez tekrarlanan deneyde elde edilen spektroskopik okumaların ortalaması alındıktan sonra hata barlarıyla beraber çizgi grafiği çizilmiştir (Şekil 3.4).

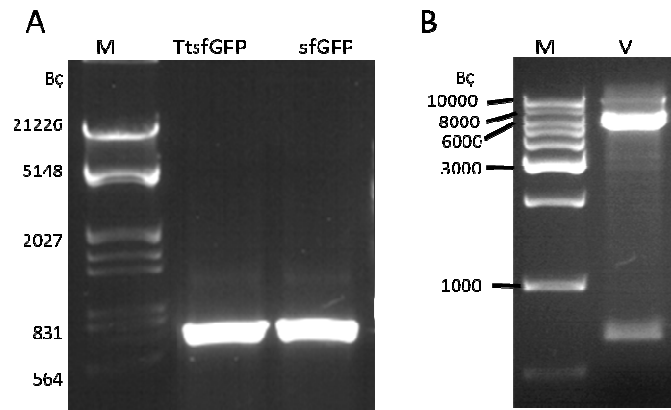
## Ek- 12 TtsfGFP ve sfGFP Genlerinin *E. coli* Hücrelerinde İfade Edilmesi

Tetrahymena'ya kodon uyumu yapılan TtsfGFP ve sfGFP genleri, sentetik olarak ürettirilip pUC57 vektörü içerisinde alınmıştır. Tasarlanan protein lokalizasyon-affinite kaseti içerisindeki bu genlerin işlevselliğinin kontrolü için, her iki gen ATG başla ve TGA bitir kodonları sınırlarından itibaren 5' NdeI, 3' BamHI kesim bölgesi bulunan primerler ile üretilerek, pET-16b ifade vektörüne klonlanmıştır.



**Şekil 1:** pUC57-TtsfGFP ve pUC57-sfGFP vektörlerinden TtsfGFP ve sfGFP'nin ileri ve geri primerler ile üretilmesi. Her iki gene de F primeri ile 5' NdeI, R primeri ile 3' BamHI kesim bölgesi yerleştirilmiştir. Üretilen ürün 729 bç'dir.

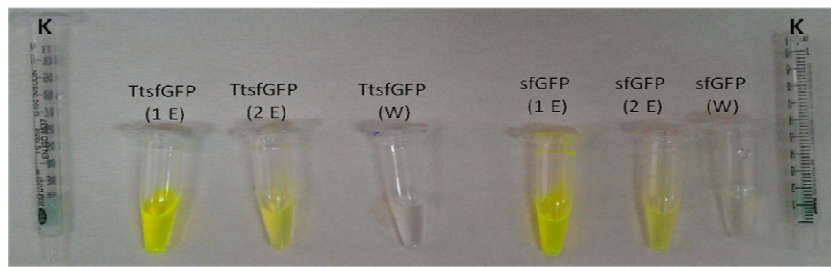
Şekil 1'de görüldüğü gibi üretilen TtsfGFP ile sfGFP, NdeI-BamHI kesiminde alınmış ve yine aynı enzimlerle kesilmiş pET-16b ifade vektörüne klonlanmıştır.



**Şekil 2:** TtsfGFP, sfGFP ve pET16b NdeI-BamHI restriksiyon enzimleri ile kesimi. **A.** TtsfGFP ve sfGFP'nin NdeI-BamHI ikili kesimi. M: EcoRI-HindIII Lamda DNA marker. **B.** V.

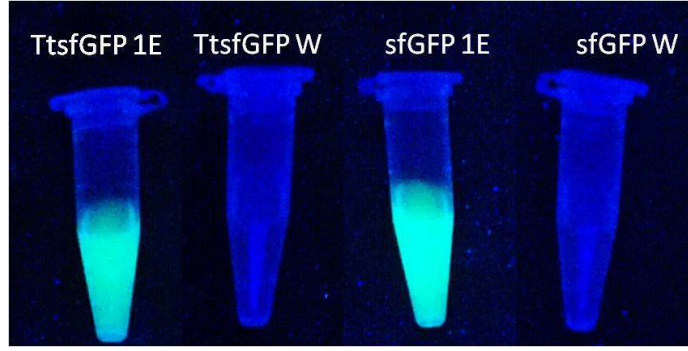
İçerisine NdeI-BamHI klonlaması ile sfGFP klonlanmış pET-16b vektörünün NdeI-BamHI kesim reaksiyonu. M. GeneRuler DNA ladder (R0491, Thermo).

Şekil 2-A’de görüldüğü üzere PZR ile üretilmiş olan TtsfGFP ve sfGFP NdeI-BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve uçları traşlanmış. Kesilen ürünlerin büyüklüğü 723 bp’dir. Aynı şekilde, içerisinde sfGFP bulunan pET-16b vektörü NdeI-BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve Şekil 2-B “V” kuyusunda görülen üstteki 5711 bp’lik ürün elde edilmiştir. Restriksiyon enzimleri ile kesilen tüm ürünler jelden kesilerek “QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit (cat: 28706) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürünler T4 DNA ligaz ile 3:1 oranda ligasyona alınmış (pET-16b-TtsfGFP ve pET-16b-sfGFP) ve ligasyon ürünleri kimyasal kompetent *E.coli* BL21(DE3) ekspresyon konakçısına ısı şoku ile transforme edilmiştir. Transformasyon sonucunda elde edilen kolonilerin hafif yeşil ışımaya sahip olduğu görülmüştür (gün ışığı altında). Yeşil ışımaya sahip olan kolonilerden her iki klon için birer adet seçilmiş ve LB broth (amfisilin içeren) besiyerine ekilmiştir. Gece boyu 37 °C’de 200 rpm’de çalkalamalı olarak büyütülen hücreler, 1 mM/ml IPTC ile indüklenmiş ve ~3-4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler peletlenmiştir. Elde edilen hücre peletlerinden Qiagen The QIAexpressionist (2003) manüeline göre hem toplam protein hemde Ni-NTA affinite saflaştırması yapılmıştır (Şekil 3).



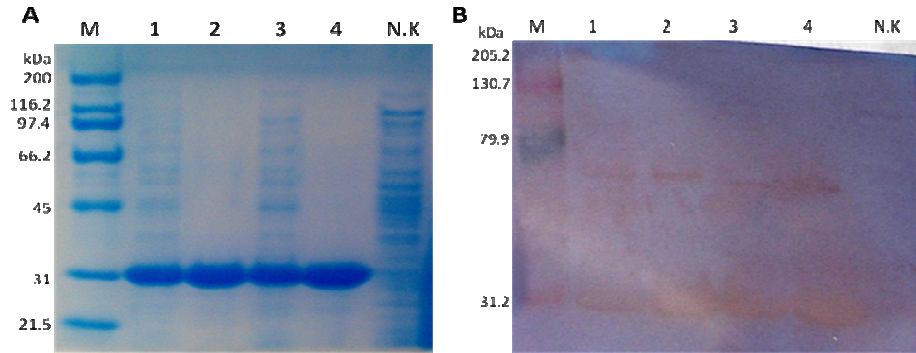
**Şekil 3:** Ni-NTA affinite saflaştırması ile saflaştırılan TtsfGFP ve sfGFP proteinler. Şekilde, saflaştırılan proteinlere ait birinci elüsyon (1 E), ikinci elüsyon (2 E) ve yıkamada (W) elde edilen örnekler verilmiştir. K. Affinite saflaştırması için yapılan kolonlar.

Elde edilen örneklerden birinci elüsyonlar ile birinci yıkamalar UV kutusunda 365 nm eksitasyonda görüntülenmiştir (Şekil 4).



**Şekil 4:** *E. coli* klonlarından Ni-NTA affinite ile saflaştırılan TtsfGFP ve sfGFP'nin, birinci elüsyon (1E) ve birinci yıkamalarda (W) elde edilen örneklerin UV kutusunda 365 nm ekistasyondaki görüntüleri.

pET-16-b vektörüne klonlanan TtsfGFP ve sfGFP'nin 5' uçlarında 6XHis bulunmamasına rağmen, bu proteinlerin N-Terminaline vektörden gelen 6XHis takısı yerleşmiştir. Bu sayede TtsfGFP ve sfGFP affinitik saflaştırılmıştır.



**Şekil 5:** *E. coli* pET-16b-TtsfGFP ve pET-16b-sfGFP klonlarından saflaştırılan toplam protein ile Ni-NTA affinite saflaştırmasıyla elde edilen proteinlerin SDS PAGE ve Western blot analizi. **1.** pET-16b-TtsfGFP den saflaştırılan toplam protein. **2.** pET-16b-TtsfGFP toplam proteininden Ni-NTA affinite saflaştırması ile saflaştırılan TtsfGFP. **3.** pET 16b-sfGFP'den saflaştırılan toplam protein. **4.** pET-16b-sfGFP toplam proteininden Ni-NTA affinite saflaştırması ile saflaştırılan sfGFP. **N.K:** Transform olmamış *E. coli* BL21(DE3)'in IPTG ile indüklenmesinden sonra saflaştırılan toplam protein. **A. SDS PAGE analizi.** **M.** Biorad Standart protein marker **B. Western blot analizi.** **M.** Kaleideskop Western marker.

Şekil 4'de görüldüğü üzere hem toplam proteinde hem de Ni-NTA affinite saflaştırmasında rekombinant üretilen TtsfGFP ve sfGFP (teorik olarak

~26 kDa olmasına karşın) 31 kDa büyüklüğünde görülmektedir. Beklenildiği gibi aynı koşullarda indüklenen N.K da ise rekombinant protein izi görülmemektedir. Üretilen rekombinant proteinin TtsfGFP ve sfGFP olduğu Şekil 4-B’de görülen ve monoklonal Mouse Anti-GFP/anti Mouse antikorları ile yapılan Western blot deneyinde teyit edilmiştir. SDS PAGE de olduğu gibi 31 kDa’da elde edilen bantların yanında, ~60 kDa civarında (1, 2, 3, 4 kuyularında) zayıf bantlarda elde edilmiştir. Bu elde edilen zayıf bantlar, dimer oluşturmuş TtsfGFP ile sfGFP’dir.

Sonuç olarak tarafımızca tasarlanan ve sentetik ürettirilen TtsfGFP ile sfGFP genlerinin işlevsel olduğu teyit edilmiştir. Bunun yanında Tetrahymena’ya tamamen kodon uyumu yapılan TtsfGFP’nin, yüksek oranda *E. coli*’ye kodon uyumlu sfGFP ile neredeyse aynı oranda üretildiği görülmüş ve tasarlanan TtsfGFP’nin, *E. coli*’de üretiminde bir kısıtlama olmadığı gösterilmiştir.

### Ek-13 Konuya Genel Giriş

Flüoresan proteinler belirli bir dalga boyunda uyarıldıklarında, uyarıldıkları dalga boyundan daha düşük enerjili flüoresan ışımaya veren proteinlerdir. İlk kez Japon bilim adamı Osamu SHIMOMURA'nın, 1961 yılında denizanası *Aequorea victoria*'da Yeşil Flüoresan Proteini (wild type Green Fluorescent Protein; WT-GFP) keşfetmesiyle birlikte, bu flüoresan proteinlerin biyoloji alanındaki kullanımı başlamış ve günümüzde oldukça yaygınlaşmıştır [14-16]. GFP; tek zincirden oluşan, yapısında 11  $\beta$ -plaka ile 4  $\alpha$ -sarmal katlanması bulunan 238 aminoasit (a.a.) uzunluğunda bir proteindir. GFP'nin katlanmış 3B yapısı,  $\beta$ -katlanmalarıyla oluşan fıçı'ya benzer silindirik ( $\beta$ -fıçı) bir yapıdır [17]. Silindir yapının merkezindeki 65Ser-66Tyr-67Gly aminoasitleri kromatofor yapı oluşturur ve bu kromatofor yapı flüoresan ışımaya gerçekleştiren bölgedir. Flüoresan proteinler, ışımaya yapmak için bir substrata ihtiyaç duymazlar. Belirli bir dalga boyunda ışın ile uyarılma durumunda kromatofor yapı "**çözünmüş oksijenin**" varlığında otokatalitik oksidasyon döngüsüne girerek, uyarıldığı dalga boyundan daha az enerjili ve dalga boyu daha fazla olan ışımaya yapar [15,17,18]. Flüoresan proteinlerin ışınması için kritik etmenlerden biri çözünmüş oksijen iken, diğer önemli etken proteinin doğru katlanarak sitoplazmada çözünebilir formda olmasıdır. Çünkü doğru katlanmayan flüoresan proteinler ortamda çözünmüş oksijen olmasına rağmen ışık alamazlar ve agregat halinde (inklüzyon yapıları) çökelirler [16].

Flüoresan proteinler birçok amaç doğrultusunda *in vivo* sistemlerde kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; protein üretim paterninin analizi, protein-protein etkileşimi ve proteinlerin organellere lokalizasyonu, hücre anatomi belirleme, hücre tanımlama ve hücresel-fizyolojik süreçlerin görüntülenmesi olarak sıralanabilir. Özellikle protein-protein etkileşimi ve proteinlerin organellere lokalizasyonunun görüntülenmesi deneylerinde, farklı renklerde flüoresan protein takısı eklenmiş farklı proteinlerin etkileşimi (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) veya protein-organel ilişkisinin tanımlanması yapılabilmektedir [15,16,50,61-63]. Hedef proteininin önüne (N- terminal tag) veya arkasına (C-terminal tag) GFP gibi flüoresan proteinler yerleştirilerek oluşturulan birleşik

(füzyon)-proteinler ile hücre içi veya organel lokalizasyonu belirlenebilmektedir. Bir protein hücre içerisinde tek flüoresan protein takısı ile görüntülenebildiği gibi; bazı çalışmalarda birden fazla proteinin durumu farklı renkte flüoresan protein takıları ile eşzamanlı olarak görüntülenebilmektedir. Lokalizasyon deneyleri tasarlanırken, hedef proteinin katlanmasında zorluk yaratmayacak veya hücre içi yönlendirici sinyal dizisini bloke etmeyecek protein ucuna takı takılmalıdır.

Yabancı GFP ile yapılan çalışmalarda, çalışılan ortamın pH değeri, sıcaklığı gibi etmenlerin GFP ışımasına etki ettiği görülmüştür. Bu nedenle GFP proteininin amino asit dizisinde yapılan mutasyonel çalışmalar neticesinde yabancı GFP'ye göre daha hızlı katlanan, daha parlak ışıma veren, değişik pH aralıklarına adapte GFP varyantları elde edilmiştir. Ayrıca 65Ser-66Tyr-67Gly kromatofor dizisi ile bu yapıyı çevreleyen aminoasitlerde yapılan bazı kritik değişiklikler, farklı renkte ışıma yapan GFP varyantlarını oluşturmuştur [15,19–21]. 2006 yılında Pe'delacq J.D ve ark. tarafından bilinen GFP mutantlarına göre ışıma gücü artırılmış, agregasyonu minimize edilmiş, asitliğe karşı direnci yükseltilmiş, katlanma hızı ve çözünürlüğü artırılmış olan yeni bir mutant; **“Superfolder GFP (sfGFP)”** ismiyle geliştirilmiştir [23–25]. Geliştirilen bu yeni GFP varyantı ile hem sitoplazmik pH'da hemde endoplazmik retikulum, bakteri periplazması gibi oksidatif ortamlarda çalışmalar yapılabilir. Diğer GFP mutantlarında olduğu gibi, sfGFP'de füzyon olarak üretildiği proteinin çözünürlüğünü arttırmaktadır. Bu özelliğinin yanında zayıf katlanma potansiyeli olan ve çözünürlüğü az olan bazı proteinlerle, sfGFP füzyon olarak üretildiğinde; sfGFP'nin yanında üretildiği proteinin katlanmasına yardım ettiği ve böylelikle çözünürlüğünü arttırdığı da rapor edilmiştir [23,26]. sfGFP'nin sahip olduğu özellikleri neticesinde, hem protein lokalizasyon deneylerinde hemde rekombinant protein üretiminde kullanılabilir bir takı olduğuna karar verilmiştir.

Bazı türlerde flüoresan proteinlerin direk takı olarak kullanımı, kodon sözlüğü ve kodon kullanım frekans farklılıklarından dolayı zorluklara neden olabilmektedir. Protein üretiminde, gen kaynağı organizma ile protein üretilen konakçı organizma arasındaki kodon sözlüğü/kullanım sıklığının farklı olması, translasyon aşamasında problemlere neden olabileceğinden, flüoresan protein gen dizisinin kodon tercihi, mutasyonel düzeltmelerle hedeflenen konakçının kodon

kullanım sıklığına uyumlu hale getirilmelidir [30–34]. Çünkü konakçı içerisinde işleyen translasyon makinesi hedef mRNA’da nadir kodona geldiğinde; translasyonun yavaşlaması, translasyonda çerçeve kayması, yanlış aminoasit eklenmesi veya translasyon sonlanması olabilir [45,64] . Bu gibi problemler hedef gende bulunan nadir kodonların sayısına ve konumuna göre değişmektedir. Özellikle proteinlerin Amino ve Karboksil uçlarına yakın bulunan, yani hedef proteini kodlayan genin 5' ile 3' uçlarına yakın konumda peşi sıra bulunan birden fazla nadir kodon, translasyon da aksaklıklara neden olabilmektedir. Piyasada bulunan GFP ve GFP mutantları genellikle *Escherichia coli* ve insan kodon sözlüğüne uyumludur. Dolayısıyla; bu canlılar dışında bir konakçı ile çalışıldığında; hedef genlerin kodon kullanım sıklığının sessiz mutasyonlar ile konakçı canlıya göre adapte edilmesi, hedef proteinin üretiminde verimi arttırmak için gereklidir.

Projemizin model organizması olan *Tetrahymena thermophila*; ökaryotik, silli ve tek hücreli, klasik biyoloji, moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında kullanımı artış gösteren, makroçekirdek genom projesi bitmiş bir organizmadır [1]. Biyolojisi oldukça fazla araştırılan *T. thermophila*, 3-4 saatte bölünen, üretimi ucuz, steril ve yüksek yoğunlukta kültürizasyonu yapılabilen, biyolistik silah veya elektroporasyon ile transform edilebilir bir canlıdır. Ayrıca *T. thermophila*, heterolog protein üretiminde (örneğin insandan), üretilen bazı kompleks proteinlerin olgunlaşması için gerekli translasyon-sonrası modifikasyonları (disülfid bağlarının oluşturulması, glikalizasyon v.b.) gerçekleştirebilmektedir. Bu özellikleri ile *T. thermophila* diğer ökaryotik protein üretim konakçlarına alternatif oluşturmaktadır [2].

*T. thermophila*’da birçok proteinin GFP ve mutantları ile C- veya N-terminal füzyonları oluşturularak protein lokalizasyonu gerçekleştirilmiştir [4,6,7,10,11]. Bu çalışmalarda kullanılan GFP mutantları; genellikle sadece ışması güçlendirilmiş GFP mutandı olan EGFP ve dsRED flüoresan protein varyantı olan mCherry’dir [5,10,11]. *Tetrahymena*’da protein lokalizasyon çalışmalarında tasarlanan füzyon proteinlerin yapısı, sadece mikroskopik görüntülemeye uygundur. Fakat yapılan protein lokalizasyon çalışmalarında flüoresan ışmanın, özellikle indüklenebilir sistemlerde, ne kadar hızlı olduğu

yani indüklemeyen sonra kaçınıcı saatte elde edilebildiği bilinmemektedir. sfGFP gibi katlanma hızı, stabilizasyonu ve ışıması EGFP'ye göre arttırılmış bir GFP mutandının, bu organizmada kullanıldığı bir lokalizasyon araştırması henüz literatürde bildirilmemiştir. Bunun yanında; homolog ya da heterolog üretilen flüoresan takılı hedef proteinler genel olarak afinitik saflaştırmaıya uygun olarak üretilmemektedir. Çünkü flüoresan proteinler, Maltoz bağlanma proteini (MBP) ile Glutasyon S Transferaz (GST) afinite takıları gibi belirli bir yüzeye ya da liganda afinite göstermediğinden afinitik kolon saflaştırmasında kullanımı mümkün değildi. Fakat Chromotek firmasının çıkardığı yeni bir sistem sayesinde (GFP-Trap), GFP'lerin immünoprecipitasyonu GFP spesifik monoklonal antikorlar ile mümkün hale getirilmiştir [49]. GFP-Trap yönteminde belirli bir yüzeye sabitlenen GFP antikorları, GFP ve GFP ile füzyon halindeki proteinlerin saflaştırmasında etkili sonuçlar verdiği bildirilmiş ve Tetrahymena alanında yapılan bir çalışmada da uygulaması yapılmıştır [8,49]. Başka bir alternatif olarak, eğer flüoresan proteinlerin uygun ucuna 6X Histidin takısı eklenirse; hem proteinin katlanmasında bir engel yaratmayacak, hemde flüoresan proteinlerin afinitik saflaştırılması mümkün olacaktır. Bu şekilde tasarlanan bir flüoresan takının, hem lokalizasyon çalışmalarında hem de rekombinant proteinlerin afinitik saflaştırılmalarında eşzamanlı kullanımı mümkün olmaktadır [27–29].