

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL FLORESAN PROTEİN İFADELEYEN *ESCHERİCHIA COLI* HÜCRE
FABRİKALARDA FENOTİPİK HETEROJENİTENİN ADAPTASYONA ETKİSİ

Seniha Gözde ERTÜZÜN

Danışman Öğretim Üyesi
Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN

Ocak

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Seniha Gözde Ertüzün

İmzası

ÖZET

Yükse Lisans Tezi

Yeşil Floresan Protein İfadeleyen *Escherichia coli* Hücre Fabrikalarda Fenotipik Heterojenitenin Adaptasyona Etkisi

Seniha Gözde ERTÜZÜN

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Dr. Öğr. Üyesi Evren Doruk ENGİN

Gelişen Biyoteknoloji uygulamalarının getirdiği en büyük katkılardan biri heterolog protein üretimidir. Sentetik biyoloji ve genetik mühendisliği sayesinde heterolog protein eldesi için kolay manipüle edilebilen, hızlı, düşük maliyetli ve yüksek verimli mikrobiyal hücre fabrikaları üretimi mümkün hale gelmiştir. Mikrobiyal hücre fabrikalarından elde edilen birçok kimyasal ve bileşen, endüstriyel ve sağlık sektörleri başta olmak üzere birçok alanda rol almaktadır. Hücre fabrikaların oluşturulmasında kullanılmak üzere kurgulanan hücrelerin gürbüz, yüksek biyokütle ve verime sahip olmalarının yanında ürettikleri peptidlerin fonksiyonel ve çözünür nitelikte olmaları büyük önem taşır. İfadelenen gen her ne kadar rasyonel tasarımlarla hücreye aktarılmış olsa da hücre bankalarının istenilen özelliklerde oluşturulması büyük ölçüde evrimsel süreçler ile mümkün olmaktadır. Bu tez çalışmasında, T7 promotörü kontrolünde yeşil floresan protein üreten Δ recA ve Δ mutS genotipe sahip *E. coli* hücre fabrikaları elde edilecektir. Hücrelerin düşük ve yüksek heterolog rekombinant protein ifade heterojenitesi gösterdikleri fermentasyon koşulları optimize edilecek ve bu koşullarda pasajlar boyunca indüklenen kültürlerin proteomik ve genomik parmak izi profillemesi yapılacaktır. Böylece, genetik olarak stabil Δ recA bakteriler ile nokta mutasyonlar geliştirmeye yatkın Δ mutS hücre fabrikalarının adaptasyon hızları karşılaştırılacaktır.

2021, 110 sayfa

Anahtar kelimeler: Adaptasyon, moleküler klonlama, heterolog protein ekspresyonu, genomik parmak izi, proteomik parmak izi, floresan proteini

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Impact of Phenotypic Heterogeneity in Green Fluorescence Protein Expressing *Escherichia coli* Cell Factories on Adaptation

Seniha Gözde ERTÜZÜN

Ankara University Biotechnology Institute

Assitant Prof. Evren Doruk ENGİN

Heterologous protein production is one of the biggest contributions that developing Biotechnology application brings. Thanks to synthetic biology and genetic engineering, it becomes possible to produce easy to manipulate, fast, cost effective and high yield protein producing microbial cell factories. The chemicals and products obtaining from microbial cell factories have been used for industrial and health purposes and in other areas. It is incredibly important that the cells that programmed to be cell factories should be robust with having high biomass and yield, beside producing functional and soluble peptides. Although how well the circuit is designed, creating such microbial cell factories is up to evolutionary processes, mostly. In this thesis study, two genetically different *Escherichia coli* cell factories, one has $\Delta recA$ genotype and other has $\Delta mutS$ genotype, that producing green fluorescent protein under T7 promoter will be obtained. The fermentation conditions which the cells produce high and low recombinant protein expression heterology will be optimized and the cells will be passaged under these conditions. Then the passaged cultures will be tested by genomic and proteomic finger printing. Therefore, adaptation rate of genetically stabile $\Delta recA$ cell factories and the $\Delta mutS$ cell factories that are tend to have point mutation will be compared.

2021, 110 pages

Key Words: Adaptation, molecular cloning, heterologous protein expression, genomic fingerprint, proteomic fingerprint, fluorescence protein

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana bildiği her şeyi öğretmeyi hedeflemiş, her soruma cevap vermiş, akademik ve sosyal hayatta bana destek olmuş, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışmanım Evren Doruk ENGİN'e,

Bana tüm süreçlerde manevi desteklerini esirgemeyen ve teşvik eden Seçil DUREL'e ve canım arkadaşım Özüm Özoğlu'na,

Beni bugünlere getirmiş, ellerindeki her imkânı benim için kullanmış, bana her zaman destek olmuş, canımdan çok sevdiğim ailem, Ebru ERTÜZÜN, Cem ERTÜZÜN ve Gökçe ERTÜZÜN'e,

Tez çalışmamın son döneminde, kendi kızlarından ayırmadan bana destek olan KURUGÜL ailesine ve ailelerine katılmama vesile olan, her zaman beni destekleyen, yüreklendiren, yanımda olan ve bana inanan sözlüm Kutalp KURUGÜL'e en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ankara, 2021

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGE DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. STOKASTİK GEN EKSPRESYONU VE FENOTİPİK HETEROJENİTE.....	3
2.2. FENOTİPİK FLUKTUASYON VE EVRİM	4
2.2.1. YEŞİL FLORESAN PROTEİNİN MARKÖR OLARAK KULLANILMASI.....	5
2.3. MİKROBİYAL HÜCRE FABRİKALARI VE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ.....	7
2.3.1. T7 EKSPRESYON SİSTEMİ İLE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ.....	8
2.4. DENEY TASARIMI.....	10
2.4.1. PLACKET-BURMEN TASARIMI.....	10
2.4.2. BOX-BEHNKEN.....	10
2.4.3. KLONLAMA, VEKTÖR SEÇİMİ VE TRANSFORMASYON	11
2.4.3.1. T7 RNA POLİMERAZ GENİ	12

2.4.3.2. YEŞİL FLORESAN PROTEİN GENİ	13
2.5. FERMANTASYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU	13
3. GEREKÇE VE AMAC	15
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
4.1. MATERYAL	17
4.1.1. ÖN ÇALIŞMA	17
4.1.2. BİYOKÜTLE ÖLÇÜMÜ.....	18
4.1.3. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ İÇİN BAKTERİ SUŞU VE VEKTÖR SEÇİMİ.....	18
4.1.4. BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI.....	20
4.1.5. <i>ESCHERİCHİA COLI</i> BL21 NÜKLEİK ASİT EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI.....	22
4.1.6. <i>ESCHERİCHİA COLI</i> BL21 KROMOZOMAL DNA’SINDAN T7 RNA POLİMERAZ GENİNİN PZT İLE ÇOĞALTILMASI.....	24
4.1.7. T7 RNA POLİMERAZ PZT ÜRÜNÜ SİLİKA MATRİKS İLE SAFLAŞTIRILMASI.....	25
4.1.5. pACYC184 PLAZMİD VEKTÖRÜNÜN MİDİ – PREP ALKALEN LİZİS PLAZMİD EKSTRAKSİYONU	27
4.1.6. SİLİKA MATRİKS İLE PACYC184 PLAZMİD VEKTÖRÜNÜN SAFLAŞTIRMASI.....	28
4.1.7. pACYC184 PLAZMİD VEKTÖRÜNÜN RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİMİ İLE LİNNERİZASYONU	29
4.1.7.1. EcoRI restriksiyon enzimi ile kesim.....	29
4.1.7.2. End-Filling.....	30
4.1.7.3. Kloroform ile saflaştırma.....	31

4.1.8. SAFLAŞTIRILMIŞ PACYCY184-ECORI KESİM VE T7 RNA POLİMERAZ PZT ÜRÜNLERİNİN AGAROS JELDEN KANTİTASYONU.....	32
4.1.9. T7 RNA POLİMERAZ PCR ÜRÜNÜNÜN PACYC184 PLAZMİD VEKTÖRÜNE SLICE YÖNTEMİ İLE LİGASYONU.....	33
4.1.10. pACYC184-T7RNAP SLICE ÜRÜNÜNÜN <i>ESCHERİCHİA COLİ</i> / DH5A HÜCRELERİNE TRANSFORMASYONU	34
4.1.11. T7RNAP POZİTİF TRANSFORMANT KOLONİLERİN SEÇİLMESİ.....	34
4.1.12. PET28A-GFP VE PACYC184-T7RNAP PLAZMİDLERİNİN DH5A VE HME63 HÜCRELERİNE TRANSFORMASYONU	35
4.1.13. PET28A-GFP VE PACYC184-T7RNAP POZİTİF TRANSFORMANTLARIN KONTROLÜ VE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ.....	36
4.1.14. EN ETKİLİ FAKTÖRLERİN SEÇİLMESİ VE HÜCRELERİN PASAJLANMASI	37
4.1.15. HÜCRELERİN MOLEKÜLER VE PROTEİN YAPILARININ KARŞILAŞTIRILMASI	37
4.1.15.1. HÜCRELERİN DNA PARMAS İZİNİN ÇIKARILMASI.....	38
4.1.15.2. HÜCRELERİN PROTEİN PARMAS İZİNİN ÇIKARILMASI.....	40
4.2. YÖNTEM.....	41
4.2.1. BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI.....	42
4.2.2. ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ	42
4.2.3. GÖRÜNTÜ ANALİZİ.....	43
4.2.4. RASTGELE ÇOĞALTILMIŞ POLİMORFİK DNA ANALİZİ (AP-PCR).....	43
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>44</u>
5.1. PACYC184-ECORI KESİM ÜRÜNÜ AGAROS JEL GÖRÜNTÜSÜ	44
5.2. PACYC184-ECORI KESİM ÜRÜNÜ VE T7 RNA POLİMERAZ PZT ÜRÜNÜ SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ	45

5.3. T7 RNA POLİMERAZ GENİ PZT ÜRÜNÜ VE PACYCY184-ECORI KESİM ÜRÜNÜ AGAROZ JEL GÖRÜNTÜSÜ	46
5.4. ESCHERİCHİA COLİ / DH5A TRANSFORMANT HÜCRELERİNDEN PLAZMİD İZOLASYONU AGAROZ JEL GÖRÜNTÜSÜ.....	48
5.5. DH5A HÜCRELERİNDE İNDÜKLENEN GFP EKSPRESYONU.....	49
5.6. HME63 HÜCRELERİNDE İNDÜKLENEN GFP EKSPRESYONU	50
5.7. GFP ÜRETİMİ VE ANALİZİ	51
5.7.1. ÜREME EĞRİSİ.....	51
5.7.2. HÜCRELERİN GÖRÜNTÜLENMESİ VE GÖRÜNTÜ ANALİZİ.....	55
HSV (Hue Saturation Value) Analizi	55
5.7.3. DENEY KOŞULLARINA EN ETKİLİ FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ.....	62
5.8. HÜCRELERİN PASAJLANMASI	64
5.8.1. ÜREME EĞRİSİ.....	65
5.8.2. ISI HARİTASI VE DENDOGRAM	65
DH-GP1	65
HM-GP1	68
5.9. PROTEOMİK VE GENOMİK PARMAK İZİ ÇIKARILMASI.....	71
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>73</u>
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>76</u>
<u>EKLER</u>	<u>81</u>
<u>EK 1: BL21-GFP1.1 FENOTİPİK HETEROJENİTE DENEY MATRİSİ.....</u>	<u>82</u>
<u>EK 2: DH5A VE HME63 FENOTİPİK HETEROJENİTE DENEY MATRİSİ</u>	<u>83</u>
<u>EK 3: KULLANILAN MAKİNE-TEÇHİZAT LİSTESİ.....</u>	<u>84</u>

<u>EK 4: DH5A DENEY MATRİSİNDE ÜREME EĞRİSİ HAM VERİLERİ.....</u>	<u>85</u>
<u>EK 5: HME63 DENEY MATRİSİNDE ÜREME EĞRİSİ HAM VERİLERİ.....</u>	<u>86</u>
<u>EK 6: PASAJLANAN HÜCRELERDE ÜREME EĞRİSİ HAM VERİLERİ.....</u>	<u>87</u>
<u>EK 7: DENEY MATRİSİNDE ELDE EDİLEN FENOTİPİK ÇEŞİTLİLİK HAM VERİLERİ</u>	<u>88</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>89</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>90</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Gelmiş “fitness” durumunun oluşması (14).....	4
Şekil 2.2. Kırmızı ve yeşil floresan proteini ile fenotipik heterojenitenin modellemesi (23)6	
Şekil 2.3. Stres varlığının fenotipik etkisinin kırmızı floresan proteini ile monitörize edilmesi (22).....	6
Şekil 2.4. Mikrobiyal hücre fabrilalarının seçilmesi ve ürün eldesi (10)	8
Şekil 2.5. T7 Ekspresyon Sistemi (32)	9
Şekil 2.6. SLiCE metodu ile klonlama (40)	12
Şekil 4.1. pET28a-GFP plazmid vektörünün genetik haritası	19
Şekil 4.2. pACYC184 plazmid vektörünün genetik haritası	20
Şekil 4.3. <i>E. coli</i> BL21 kromozomal DNA izolasyonu spektrofotometrik analizi	24
Şekil 4.4. T7 RNA Polimeraz gen bölgesinin PZT ürün büyüklüğü.....	25
Şekil 5.1. Saflaştırılmış pACYC184 plazmid vektörü, 1:10 seyreltilmiş saf pACYC184 plazmid vektörü ve pACYC184-EcoRI kesim ürünü agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 5.2. Saflaştırılmış pACYC184-EcoRI kesim ürünü ve T7RNAP PZT ürünü spektrofotometrik analiz sonucu.....	45
Şekil 5.3. T7 RNA Polimeraz geni PZT ürünü ve pACYC184-EcoRI kesim ürünü kantitasyonu agaroz jel görüntüsü	46
Şekil 5.4. pACYC184-EcoRI Kesim Ürünü ve T7RNAP PZT Ürünü Jelden Kantitasyon	47
Şekil 5.5. GFP ve T7RNAP geni içeren DH5α hücre transformantlarından izole edilen plazmidler	49

Şekil 5.6. GFP ve T7RNAP geni içeren DH-GP1 hücrelerinin floresan mikroskobu altında FITC filtresi ile 40 x büyütülerek çekilmiş fotoğrafı	50
Şekil 5.7. GFP ve T7RNAP geni içeren HM-GP1 hücrelerinin floresan mikroskobu altında FITC filtresi ile 40 x büyütülerek çekilmiş fotoğrafı	50
Şekil 5.8. Deney matrisine uygun indüklenmiş GFP eksprese edebilen BL21 hücrelerinden elde edilen örnek üreme eğrileri	52
Şekil 5.9. Deney matrisine uygun indüklenmiş DH-GP1 hücrelerinden elde edilen örnek üreme eğrileri.....	53
Şekil 5.10. Deney matrisine uygun indüklenmiş HM-GP1 hücrelerinden elde edilen örnek üreme eğrileri.....	54
Şekil 5.11. Deney matrisine indüklenen DH-GP1 hücrelerinin GFP ekspresyon HSV analiz örnek sonuçları	56
Şekil 5.12. Deney matrisine indüklenen DH-GP1 hücrelerinin GFP ekspresyon HSV analiz örnek sonuçları	57
Şekil 5.13. Deney matrisine uygun olarak indüklenen DH-GP1 hücrelerine ait 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası ve dendogramı.....	58
Şekil 5.14. Deney matrisine indüklenen HM-GP1 hücrelerinin GFP ekspresyon HSV analiz örnek sonuçları	59
Şekil 5.15. Deney matrisine indüklenen HM-GP1 hücrelerinin GFP ekspresyon HSV analiz örnek sonuçları	60
Şekil 5.16. Deney matrisine uygun olarak indüklenen HM-GP1 hücrelerine ait 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası ve dendogramı.....	61
Şekil 5.17. DH-GP1 hücrelerinden elde edilen yanıt yüzeyleri	62
Şekil 5.18. HM-GP1 hücrelerinden elde edilen yanıt yüzeyleri.....	63
Şekil 5.19. Pasajlanan D1 ve D2 hücrelerinde üreme eğrisi değişimi.....	66

Şekil 5.20. DP-GP1 hücre pasajları arasındaki ilişki.....	67
Şekil 5.21. Pasajlanan H1 ve H2 hücrelerinde üreme eğrisi değişimi.....	69
Şekil 5.22. HM-GP1 hücre pasajları arasındaki ilişki	70
Şekil 5.23. Genomik parmak izi	71
Şekil 5.24. Proteomik parmak izi, SDS-PAGE	72



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Besiyeri Faktörleri En Düşük ve En Yüksek Miktarları	15
Çizelge 4.1. Hazırlanan Besiyerlerinin İçerikleri	22
Çizelge 4.2. Kromozomal DNA Lizis Tamponunda Kullanılan Kimyasallar ve Çalışan Konsantrasyonları.....	24
Çizelge 4.3. Kromozomal DNA Yıkamasında Kullanılan Solüsyon Kimyasalları ve Miktarları.....	25
Çizelge 4.4. T7 RNA Polimeraz Gen Bölgesinin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler...	26
Çizelge 4.5. Guanidinli Saflaştırma Protokolü Bağlanma Tamponu Çözeltileri ve Kullanılan Miktarları	27
Çizelge 4.6. Alkalen Lizis I, II ve III Çözeltileri ve Çalışan Konsantrasyonları.....	29
Çizelge 4.6. Guanidinli Saflaştırma Protokolü Yıkama Tamponu Çözeltileri ve Kullanılan Miktarları.....	27
Çizelge 4.7. Guanidinli Saflaştırma Protokolü Bağlanma Tamponu Çözeltileri ve Kullanılan Miktarları	30
Çizelge 4.8. Guanidinli Saflaştırma Protokolü Yıkama Tamponu Çözeltileri ve Kullanılan Miktarları.....	30
Çizelge 4.9. pACYC184 Plazmid Vektörünün EcoRI Restriksiyon Enzimi ile Lineerizasyonunda Kullanılan Malzemeler ve Çalışan Konsantrasyonları.....	31
Çizelge 4.10. End-Filling Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler Ve Çalışan Konsantrasyonları	32
Çizelge 4.11. End-Filling Reaksiyonu Termal Döngü	32
Çizelge 4.12. Pacyc184-EcoRI Kesim Ürününün Kloroform İle Saflaştırılmasında Kullanılan Malzemeler Ve Miktarları	33
Çizelge 4.13. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon Stok Çözeltileri	34
Çizelge 4.14. pACYC184-EcoRI Kesim Ve T/RNAP PZT Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklene Miktarları	34
Çizelge 4.15. 10x Tampon Çözeltisi İçerik ve Stok Konsantrasyonları.....	38
Çizelge 4.16. AP PCR Reaksiyonunda Kullanılan Stok ve Çalışan Malzemeler, Kullanılan Primerler ve Termal Döngü.....	40
Çizelge 4.17. Protein İzolasyonu Solüsyonunu Oluşturan Stok Miktarlar.....	41

Çizelge 4.18. 4x Laemmli Yükleme Tamponu Bileşenleri Stok Konsantrasyonları.....	41
Çizelge 4.19. SDS-PAGE Jel Bileşenleri Stok Konsantrasyonları	41
Çizelge 5.1. En Yüksek Fenotipik Heterojenite Ve En Düşük Fenotipik Heterojenitenin Gözlemlendiği Koşullar.....	65
Çizelge 5.2. Üreme Koşulları ve Pasajlanan Hücre Adları	66



SİMGELER DİZİNİ

g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
nm	Nanometre
bp	Baz çifti
CHCl ₃	Kloroform
NaCl	Sodyum Klorür
ddH ₂ O	Çift distile su
s	Saniye
dk	Dakika
h	Saat
U	Ünite
OD	Optical density (optik yoğunluk)
Δ	Delta
α	Alpha
™	Trade Mark
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

IPTG	İzopropil β -D-tiyogalaktopiranosit
GFP	Green Fluorescent Protein (Yeşil Floresan Protein)
T7RNAP	T7 RNA Polimeraz
CRP	cAMP Reseptor Protein
SDS	Sodyum dedosil sülfat
SLiCE	Seamless Ligation Cloning Extract
UV	Ultra-violet (Mor ötesi)
TB	Terrific Borth (Zengin Besiyeri)
W	Watt
PEG	Poli etilen glikol
FITC	Florosein izotiyosiyanat
PZT	Polimeraz zincir tepkimesi
TSS	Transformation and storage solution (transformasyon ve saklama çözeltisi)

1. GİRİŞ

Heterolog proteinler sentetik biyoloji ve genetik mühendisliği metotları kullanılarak yabancı bir organizma içerisinde üretilen proteinlerdir (1). Heterolog protein eldesi için başlangıç olarak, mikrobiyal organizmalar ve prokaryotların ökaryotik canlılarla ilişkilerinin hakkındaki bilgilerin kısıtlı olması sebebi ile, hayvan ve bitki dokuları ya da biyolojik sıvıları kullanılmıştır (2). 1977’de insan proteini olan somatostatinin ve sonrasında insülinin *Escherichia coli*’de üretilmesi bilim insanlarının dikkatini mikrobiyal hücre fabrikalarında rekombinant protein üretimine yoğunlaştırmıştır. Mikrobiyal hücre fabrikalarının yüksek hızda ve verimde, geniş spektrumda ve düşük bütçe ile heterolog protein üretebilme potansiyelinin anlaşılması ile bu potansiyelin ortaya çıkarılması için optimizasyon çalışmaları başlamıştır (1). Günümüzde de devam eden bu çalışmalar dahilinde metabolik mühendislik ile yollara müdahale edilmekte, hücreler farklı ve zorlayıcı fermantasyon koşullarında üretilmekte ve kromozomal DNA veya plazmidler üzerine farklı genetik devreler kurulmaktadır. Geçmişten bu yana heterolog protein üretiminde en çok tercih edilen mikrobiyal fabrika hücre *E. coli* hücreleri olsa da yüksek verimde fonksiyonel peptid üretimi için gereken optimal genetik devre ve fermantasyon koşulları hala tam olarak bilinmemektedir (1-5). Bu hücrelerde rekombinant protein eldesi için kullanılmak üzere sıkça tercih edilen sistemlerden biri pET sistemidir. Bu sistemde laktoz varlığında indüklenebilen lacUV5 promotörü kontrolünde T7 RNA Polimeraz üretimi gerçekleşmektedir. Bu viral DNA’ya bağımlı T7 RNA Polimeraz enzimi ise özgül olduğu T7 promotör dizisine bağlanarak güçlü transkripsiyonel aktivite göstermektedir. Güçlü promotörlerin hücreye getirdiği metabolik yükler sonucunda hücrelerde stres yanıtı gelişir (4, 6, 7). Heterolog protein üretimi için hücre fabrikaların oluşturulmasında kullanılmak üzere kurgulanan hücrelerin gürbüz, yüksek biyokütle ve verime sahip olmalarının yanında ürettikleri peptidlerin fonksiyonel ve çözünür nitelikte olmaları büyük önem taşır. Bu özelliklere sahip hücre bankaları oluşturulurken ifadelenecek gen her ne kadar rasyonel tasarımlarla hücreye aktarılmış olsa da hücre bankalarının istenilen özelliklerde oluşturulması büyük ölçüde evrimsel süreçler ile mümkün olmaktadır (5, 8-11). Hücreler stabil formlarını evrimsel süreç içerisinde hayatta kalma şansını arttıracak gen regülasyonlarını devam ettirerek alırlar. Gen ekspresyonları mevcut koşullara uyumluluk sağlayarak hayatta kalma ihtimalini arttırmak üzere stokastik olarak gerçekleşir.

Bu süreç evrimin önemli bir parçasıdır (12-14). Stokastik gen ekspresyonu sonucu izogenik hücrelerde gözlenen fenotipik heterojenite bazı bireylerin stres koşullarında hayatta kalma şansını arttırmaktadır. Artan fenotipik fluktuasyonun artan evrimleşme hızı ile ilişkisini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (8, 9, 15, 16). Rekombinant protein üreten mikrobiyal hücre fabrikaları hem heterolog protein üretiminin hem de fermentasyon sürecinde maruz kaldıkları ortam koşullarının getirdiği stres ile artmış fenotipik heterojenite ve mutasyon hızlarını indükleyerek popülasyonun yeni bir “fitness” durumuna adapte olması ile sonuçlanabilmektedir (8, 17, 18). Gerçekleştirmiş olduğumuz ön çalışmalarda, T7 promotörü kontrolünde heterolog rekombinant protein (yeşil floresan protein) ifadeleyen *E. coli* hücre fabrikalarının, bu proteinin ifadesi yönünden fenotipik heterojenite gösterdiğini gözlemledik. Bu tez çalışmasında T7 promotörü kontrolünde yeşil floresan protein üreten $\Delta recA$ ve $\Delta mutS$ genotipe sahip *E. coli* hücre fabrikaları elde edilecektir. Bu hücrelerin düşük ve yüksek heterolog rekombinant protein ifade heterojenitesi göstermek üzere indüklendikleri fermentasyon koşulları optimize edilecek ve bu koşullar ile pasajlar boyunca indüklenen kültürlerin proteomik ve genomik parmak izi profillemesi yapılarak adaptasyon süreci değerlendirilecektir. Böylece, genetik olarak stabil $\Delta recA$ bakteriler ile nokta mutasyonlar geliştirmeye yatkın $\Delta mutS$ hücre fabrikalarının adaptasyon hızları karşılaştırılacaktır.

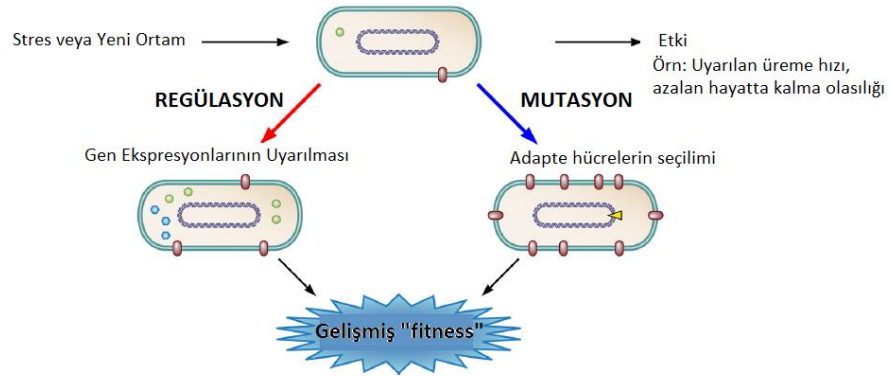
Bu tez çalışmasında hücreler, farklı stres koşullarına maruz bırakılacak, fenotipik heterojenite indüklenerek düşük ve yüksek heterolog rekombinant protein ifade heterojenitesi gösterdikleri fermentasyon koşulları optimize edilecektir. Hücrelerin evrimsel süreçleri proteomik ve genomik analizler ile araştırılacaktır. Elde edilen bulgular sonucunda fenotipik heterojenitenin optimizasyonu sağlanabilir ve çalışmada uygulanan metotlar istenilen özelliklerde hücre bankaları evrimleştirmekte kullanılabilir. Bu tez, fenotipik heterojenitenin düşük ve yüksek düzeyde ifade bulduğu kültürlerde üretilen rekombinant protein üretiminin bu hücrelerdeki evrimsel hıza etkisinin araştırılması, farklı genotipteki hücrelerde evrimsel sürecin anlaşılması ve yüksek verimde heterolog protein elde etmek üzere kullanılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu tezde farklı fermentasyon koşulları ile indüklenen hücrelerin düşük ve yüksek heterolog rekombinant protein ifade heterojenitesi gösterdiği koşulları sağlayan önemli faktörler Plackett- Burmen ile belirlenecek ve yanıt yüzeyleri Box- Behnken tasarımı ile toplanacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. STOKASTİK GEN EKSPRESYONU VE FENOTİPİK HETEROJENİTE

Gen ekspresyonu mRNA ve protein düzeyinde hücreler arası farklılaşma ile sonuçlanabilen stokastik bir süreçtir. Stokastik gen ekspresyonu hücresel çeşitlilik, hücresel farklılaşma, hücresel hafıza ve evrim olgularında önemli bir etkiye sahiptir (19). Metabolik mühendislik uygulamalarında üretilen ürünün manipülasyonunu ve kontrolünü sağlamak için hücresel çeşitliliğin anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Hücresel çeşitlilik genetik, fenotipik heterojenite ve lokal çevresel faktörler gibi sebeplerden kaynaklanabilmektedir. Hücreler çevresel strese maruz kaldığında bu strese cevaben gen regülasyonları gerçekleştirmektedirler. Yapılan araştırmalarda, izogenik hücreler arasında dahi bazı bireyler stokastik gen ekspresyonlarının de etkisiyle transkripsiyon ve translasyon mekanizmalarındaki farklılıklar yüzünden sentetik devreleri daha iyi eksprese etmekte ve bireysel gen ekspresyonlarında fluktuasyon görülebilmektedir. Bu fluktuasyonlar stokastik “gürültü” olarak adlandırılmaktadır. Fluktuasyonlar çevresel gürültülerden ve hücre için stokastik reaksiyolardan kaynaklanabilmektedir. Hücresel çeşitliliğin anlaşılması ile hücrelerin daha yüksek verimde ürün ürettikleri optimal sentetik devre ve koşullar belirlenmesi ve hücrelerin yüksek verimde ve fonksiyonel heterolog protein üretmeleri üzerine programlanmaları hedeflenmektedir (12, 19-23). Böylece gürbüz, yüksek verimli ve fonksiyonel protein üretebilen mikrobiyal hücre fabrikaları oluşturulmak istenmektedir (11). Hücrelerden biri hayatta kalma olasılığını en yüksek seviyede arttıran adaptif gen ekspresyonunu gerçekleştirdiğinde popülasyon yeni koşullara adapte olabilmekte ve popülasyon optimal bir genetik mutasyon geçirebilmektedir (24). Bu olguları incelemek üzerine kurulan deneylerde sıkça çevresel faktörler yardımı ile stres yaratılmakta ve genetik yapıları bilinen bakteri ve mayaların bu streslere verdikleri yanıtlar analiz edilmektedir. Ek olarak, regülasyonları kontrol edebilmek adına ortama arabinoz veya laktoz gibi indükleyiciler eklemek veya ısı şoku uygulamak da tercih edilen diğer stratejilerdir (20). Yapılan çalışmalarda tek bir faktörü değişimi ile hücresel yanıt tetiklendiğinde dahi adaptasyon süreci gereği evrimsel başarıyı arttırmak üzere gerçekleşen stokastik gen ekspresyonları ile gelen heterojenite ve epistatik etkiler yeni ve gelişmiş bir “fitness” durumuna adaptasyonu göstermektedir (Şekil 2.1.). Bu süreç ile oluşan tek bir mutant 48 saate kadar ortamda çoğalarak popülasyonun büyük bir çoğunluğunu

oluşturabilmektedir. Mutant popülasyonun avantajı üreme hızı ve ortamdaki üreme koşullarının uygunluğu ile doğru orantılıdır (9, 14).



Şekil 2.1. Gelişmiş “fitness” durumunun oluşması (14)

Bu olgu, gerçekleştirdiğimiz tez çalışmasında Oksitetrasiklin direnç genine sahip pACYC184 plazmid vektörünü başarı ile içerisine alıp bu geni eksprese edebilen yüksek oksitetrasiklin direncine sahip *E. coli* hücrelerinin Oksitetrasiklin içeren besiyerinde seçilmesinde kullanılmıştır. Böylece yüksek performanslı gen ekspresyonu gerçekleştiren hücrelerin seçilimi amaçlanmıştır.

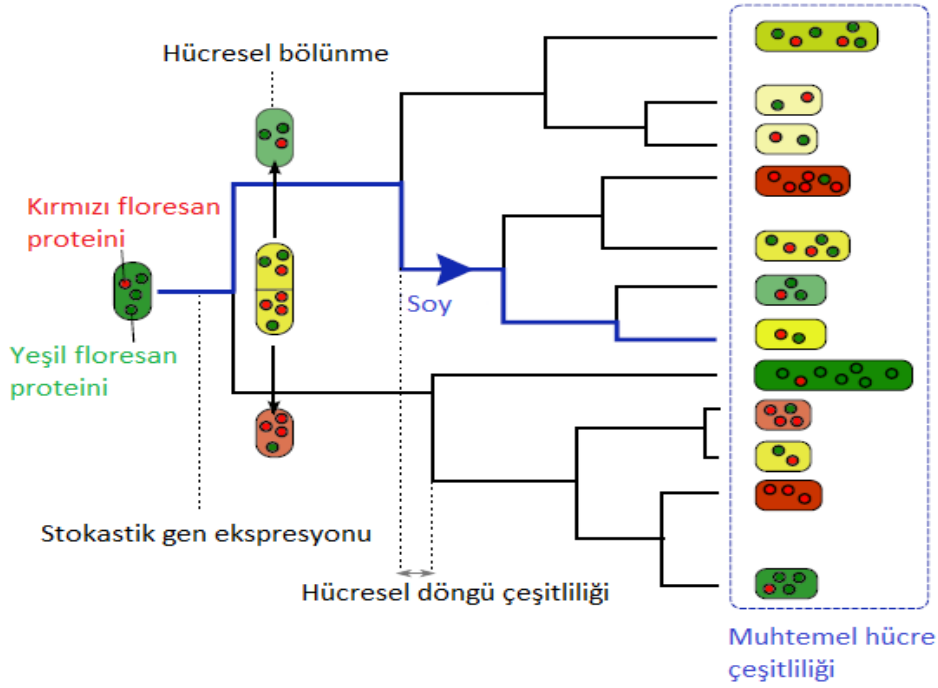
2.2. FENOTİPİK FLUKTUASYON VE EVRİM

Gen ekspresyonları temel olarak hayatta kalma şansını arttırmak üzere farklı regülasyon mekanizmalarının kombinasyonu ile düzenlenmektedir. Bu karışık regülasyon sistemi adaptasyon ve mutasyon süreçlerini doğrudan etkileyerek evrimsel süreçte büyük bir rol edinmektedir (13, 14, 17, 24-28). Fenotipik fluktuasyonların adaptasyon, farklılaşma ve evrim ile olan ilişkisini anlamaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Artan adaptasyon kapasitesi artan hayatta kalma olasılığı ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda yüksek fluktuasyona sahip popülasyonların evrimsel hızının daha yüksek olduğu savunulmaktadır (8, 18). Bu çalışmalara göre, evrimsel hız, popülasyon yüksek bir “fitness” durumuna ulaştığında azalmakta ve uyumlu mutantların korunması için, sabit

koşullar altında kalmak koşuluyla, bireylerin “fitness” durumu artarken popülasyondaki fenotipik fluktuasyon azaltmaktadır. Fakat; doğada koşullar her zaman sabit kalmaz ve bu değişken koşullara adapte olmakta olan organizmalarda fenotipik fluktuasyon yüksektir. Yüksek oranda fenotipik fluktuasyon hücresel çeşitlilik ve “most-fitted” bireyin seçilimi için büyük bir avantajdır. Böylece adaptif gen ekspresyonunun hücresel çeşitlilikle ve hücresel çeşitliliğin artan hayatta kalma olasılığı ile doğrusal orantılı olduğu desteklenmektedir (8, 18, 24). Yapılan bir çalışmada bazı mutantların bu avantajı kaybetmemek adına, sabit koşullar altında dahi izogenik fenotipik fluktuasyon gösterdiği kaydedilmiştir (9). Hücresel yanıt ve fluktuasyon üzerine çalışmalarda floresans proteini sıkça kullanılmaktadır (21, 29).

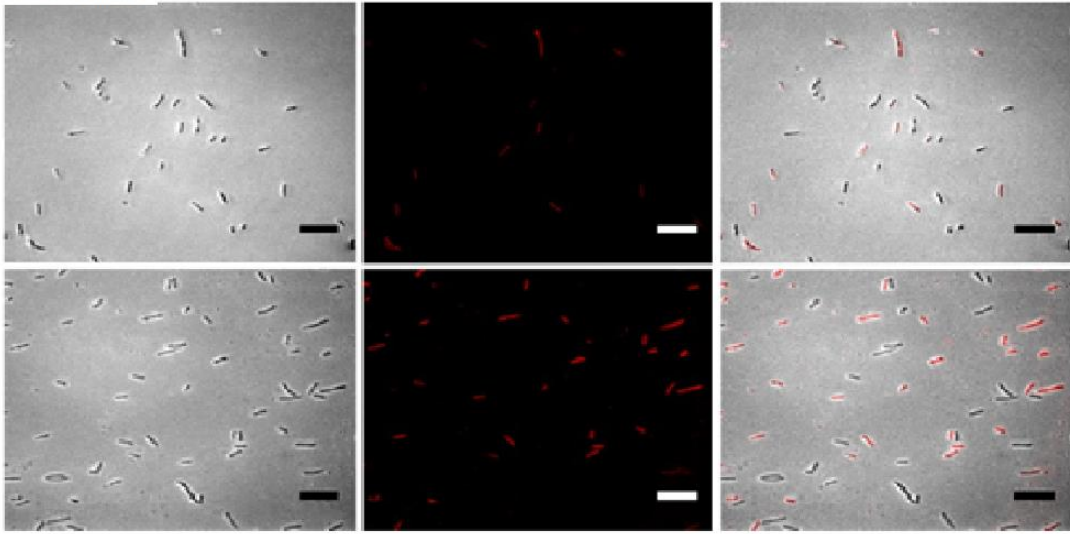
YEŞİL FLORESAN PROTEİNİN MARKÖR OLARAK KULLANILMASI

Optimizasyon süreci metabolik reaksiyonların monitörize edilmesi ile başlamaktadır. Floresan proteinleri bu amaç için sıkça kullanılmaktadırlar. Bu metotla transkripsiyon aktiviteleri, promotör ekspresyon seviyeleri ve protein sentezlerini de içeren metabolik olayları değerlendirmek mümkün olmaktadır. Floresan proteinleri ile monitörize edilebilen bir diğer fenomen ise hücresel çeşitliliktir. Hücresel çeşitlilik, popülasyonun strese dayanıklılığını arttırdığından ve yüksek verimde ürün üreten hücrelerin eldesini mümkün kıldığı sebebi ile mikrobiyal hücre fabrikaların oluşturulmasında kritik önem taşır (11, 12, 19-22, 27). Hücresel çeşitlilikle beraber protein katlanmalarını ve stabilitelemlerini gözlemlemek amacı ile de floresan proteinlerden markör olarak yararlanılmaktadır. Bunun için en çok tercih edilen markör floresan proteinler yeşil ve kırmızı floresan proteinleridir (Şekil 2.2.). Bu sayede yüksek verimlilikte protein üretebilen mikrobiyal hücre fabrikaları seçilmesi hedeflenmektedir. Bir indikatöre bağlı olarak yüksek veya düşük miktarda eksprese edilen floresan proteinler ortama eklenen stres faktörlerinin fenotipik heterojenite üzerindeki ve evrimsel etkilerini ölçmek için kullanılabilmektedirler (Şekil 2.3.). Bu veriler ile bazı spesifik sistemler için optimal sentetik devreler ve koşullar kaydedilmektedir (11).



Şekil 2.2. Kırmızı ve yeşil floresan proteini ile fenotipik heterojenitenin modellenmesi (23)

Stres uygulanmadığında



Stres uygulandığında

Şekil 2.3. Stres varlığının fenotipik etkisinin kırmızı floresan proteini ile monitörize edilmesi (22)

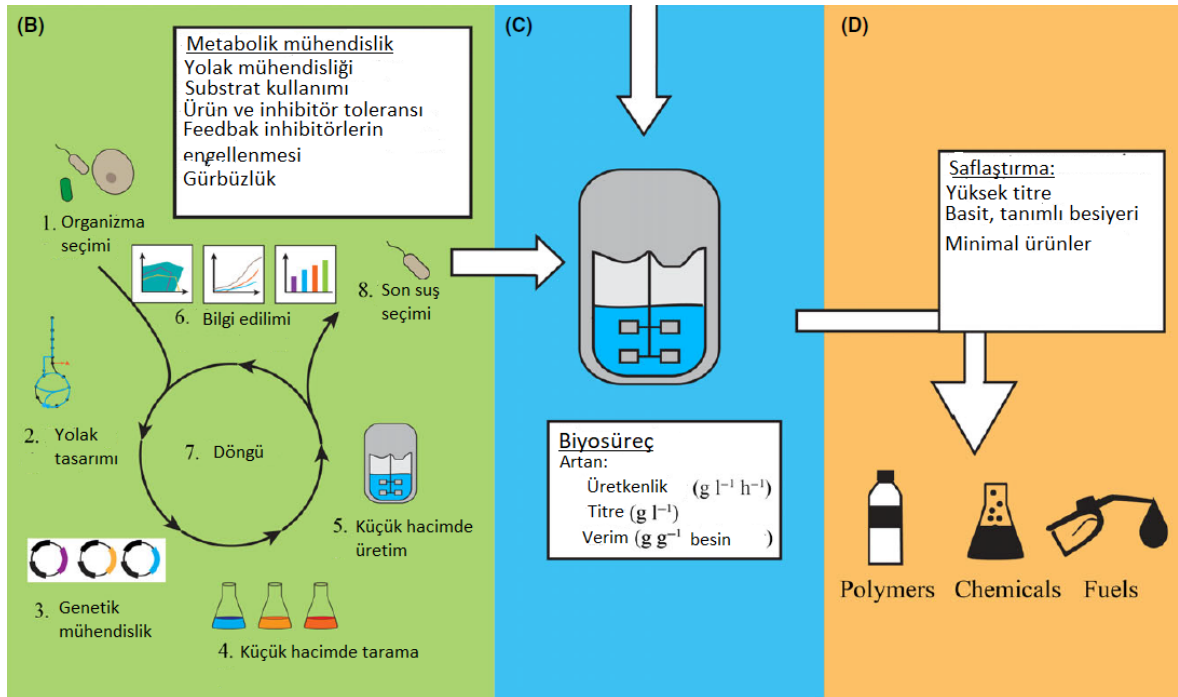
Bu tez çalışmasında pET28a vektör plazmidine daha önce aktarılmış GFP geni, aynı hücre içerisindeki pACYC184 plazmid vektörüne aktarılmış T7 geni kontrolünde IPTG ile indüklenmiştir. Her iki plazmid vektörüne sahip olan hücrelerde IPTG ile indüklenen T7

promotörü kontrolünde GFP ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve gözlemlenen fenotipik heterojenite analiz edilmiştir.

2.3. MİKROBİYAL HÜCRE FABRİKALARI VE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

Mikrobiyal hücre fabrikaları bilimsel araştırmalarda, sentetik kimyasalların, endüstriyel ve farmasötik proteinlerin, antimikrobiyal ajanların ve benzer bileşenlerin üretilmesinde kullanıldığından biyoteknolojik uygulamalar arasında özel bir yere sahiptir (26). Heterolog protein üretimi için hücre fabrikaların oluşturulmasında kullanılmak üzere kurgulanan hücrelerin gürbüz, yüksek biyokütle ve verime sahip olmalarının yanında ürettikleri peptidlerin fonksiyonel ve çözünür nitelikte olmaları büyük önem taşır (11). Heterolog protein üretiminde amaç mikrobiyal hücre fabrikaları oluşturarak düşük maliyetle ve kısa zamanda yüksek verimlilikte protein veya diğer bileşenleri elde etmektir. Geçmişte protein eldesi için ancak düşük miktarlarda saflaştırılmış protein elde edilebilen kilolarca hayvan ve bitki dokularının ya da biyolojik sıvılarının kullanımı yerini, günümüzde düşük maliyeti, hızlı olmasının ve kolay manipüle edilebilmesinin avantajı ile mikrobiyal hücre fabrikalarında rekombinant protein üretimi ve saflaştırılmasına bırakmıştır (2). Yüksek verimde mikrobiyal hücre fabrikaları üretebilmek adına kurulan sentetik devreler ve uygulanan koşullar BioBrick ve ePathBrick gibi bazı veri bankalarında depolanmaktadır. Böylece fonksiyonel sentetik devreler ve optimizasyon koşulları bilim dünyası ile paylaşılmaktadır (11). İstenilen özelliklere sahip hücre bankaları oluşturulurken ifadelenecek gen her ne kadar rasyonel tasarımlarla hücreye aktarılmış olsa da hücre bankalarının istenilen özelliklerde oluşturulması büyük ölçüde evrimsel süreçler ile mümkün olmaktadır (5, 8, 25). Rekombinant protein üretimi basit bir anlatımla üretilmesi hedeflenen proteini kodlayan ilgili gen bölgesinin uygun vektöre aktarılıp yine uygun bir hücreye aktarılması ve bu hücrede ilgili protein üretiminin yapılmasıdır. Hücreler bazı durumlarda kendilerini koruyacak özellikleri kazanmak üzere evrimleşirler (19, 25). Hücrelerin izlediği bu strateji, rekombinant protein eldesinde hedef geni alan hücreleri seçmek için hücreye transforme edilen plazmide uygun olarak besiyeri içerisine antibiyotik gibi seçici materyaller ekleyerek sıkça kullanılır. Hedef geni alan hücrelerin seçiminin ardından hedef proteinin heterolog olarak yüksek verimde üreten mikrobiyal hücre fabrikalarının üretilmesi gelir (9, 14). Günümüzde heterolog protein eldesi için en çok

tercih edilen mikroorganizma *E. coli*'dir. *E. coli*, her ne kadar uzun yıllardır çalışılan, iyi bilinen bir mikroorganizma olsa da yüksek verimde rekombinant protein elde etmek için optimizasyon çalışmaları hala sürmektedir. Sıkça başvurulanan bir yöntem olarak sentetik devrelerin kurulması metabolik yolları kontrol etmeyi ve kurulan genetik devreye bağımlı hedef protein üretilmesini mümkün kılmaktadır (5, 10). Mikrobiyal hücre fabrikalarının zorlu koşulları tolere edebilecek özellikte olmaları üretilen heterolog protein açısından önem kazanmaktadır (1, 2, 4-6, 8, 10, 14, 17, 18, 20, 23, 24, 26). Mikrobiyal hücre fabrikalarının seçilmesi ve ürün eldesi Şekil 2.4.'te gösterilmiştir.

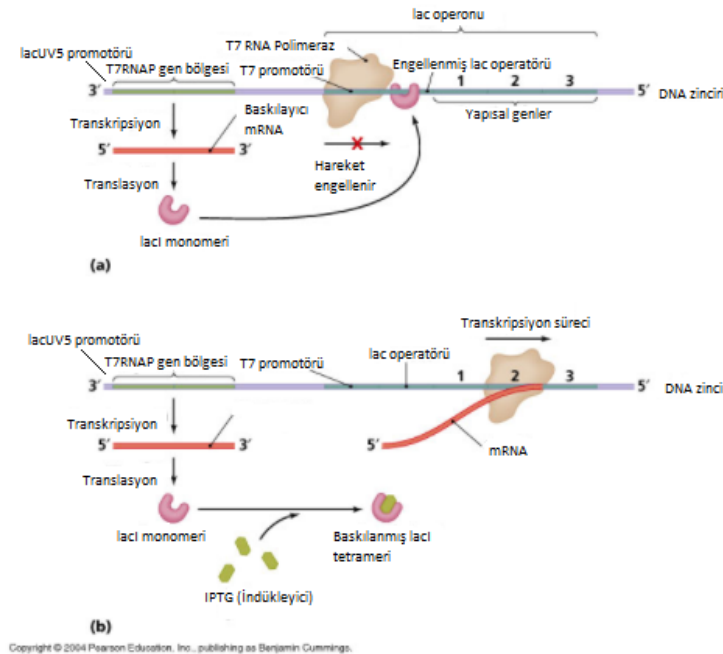


Şekil 2.4. Mikrobiyal hücre fabrikalarının seçilmesi ve ürün eldesi (10)

T7 EKSPRESYON SİSTEMİ İLE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

Mikrobiyal hücre fabrikalarında rekombinant protein üretimi moleküler biyolojide en çok ilgi gören, popüler, devrim niteliğinde bir uygulamadır. 1990'larda rekombinant protein üretimi için en uygun suşu bulmak üzerine yapılan çalışmalarda birçok *E. coli* suşu denenmiş ve B hücre hattı bu amaç için en uygun hat olarak seçilmiştir. B hücre hattının genom analizinin yapılması, heterolog protein üretiminde kullanılabilecek fenotiplerin moleküler anlamda anlaşılmasını sağlamıştır. Bu çalışmalar sonucunda *E. coli* BL21 (DE3) suşu en uygun suş olarak seçilmiştir (6). *E. coli* BL21(DE3), suşu Barbara A. Moffatt tarafından modifiye edilmiştir. Bu suş içerisinde bakteriyofaj λ kaynaklı laktöz varlığında

indüklenebilen *lacUV5* promotörü kontrolünde T7 RNA Polimeraz üretimi gerçekleşmektedir. Bu viral DNA'ya bağımlı T7 RNA Polimeraz enzimi ise özgül olduğu T7 promotör dizisine bağlanarak güçlü transkripsiyonel aktivite göstermektedir. Lac-repressor (LacI) düzenleyici bir transkripsiyon faktörüdür, ortamda bir indükleyici olmadığında *lac* operonundaki operatörlere bağlanarak T7 RNA Polimeraz'ın ve ilgili gen bölgesinin ifadesini engeller. İndükleme sırasında LacI-tetrameri allolaktoz ya da analoglarından birine bağlanarak operatör bölgeleri serbest bırakır ve T7 RNA Polimeraz transkripsiyon ve translayonu gerçekleştirir (Şekil 2.1.). İndüksiyon için hücrede metabolize edilmediğinden IPTG altın standart olarak kullanılır (30). Hücre IPTG'yi metabolize etmediğinden stabil ve güçlü indüksiyon sağlanmış olur (2). Bu sistemde protein indüksiyonunun kontrol altına alınması ile yüksek seçicilikte protein üretilir. Hem *E. coli*'nin hem de entegre edilen gen bölgesinin ve indükleme metodunun rekombinant protein üretimi için sıkça tercih edilen bir strateji olmasına ve uzun yıllardır üzerinde çalışılmış, iyi anlaşılmış bir sistem olmasına rağmen halen fonksiyonel protein üretiminde aksaklık ve başarısızlıklar yaşanmaktadır. Bu sebeple *E. coli*'de protein üretimi optimizasyon çalışmaları devamlı olarak sürmektedir (4, 6, 31).



Şekil 2.5. T7 Ekspresyon Sistemi (32)

2.4. DENEY TASARIMI

Heterolog protein üretimi birçok faktörü içeren ve bunlardan etkilenen bir süreçtir. Bu çok faktörlü süreçte tekrarlanabilir optimal üretim koşullarının belirlenmesi için deney tasarım metotları sıkça kullanılmaktadır. Deney tasarım metotları kısa zamanda, düşük maliyetle ve yüksek verimde ürün eldesi için gereken faktörleri ve faktörlerin birbirleriyle olan ilişkisini belirlenmesini sağlamaktadır. Böylece deney tasarımı metotları olası hataları ve gereken deneme sayılarını minimize etmektedir (33, 34).

PLACKETT-BURMEN TASARIMI

1946 yılında Plackett ve Burman tarafından iki seviyeli kısmi faktöriyel tasarım olarak tasarlanan bu tasarım “Hadamard Matriks tasarımı” olarak da bilinmektedir. Kısmi faktöriyel dizaynlarda faktör ve deneme sayılarının minimum sayıda tutulmasına gerek yoktur. Özellikle optimizasyon deneylerinde önemli faktörleri belirlemek amacı ile tam faktöriyel tasarımlardan önce kullanılmaktadır. Plackett-Burman tasarımlarında tüm faktörlerin yer aldığı kombinasyonlar deney seti olarak listelenir ve tüm kombinasyonlar arasından en önemli faktörler böylece seçilmektedir. Bu tasarımda eksik olan ise faktörler arası etkileşimdir. Bu eksikliği yanıt yüzeyi oluşturma yetisine sahip olan 3 seviyeli bir kısmi faktöriyel tasarım olan Box-Behnken tasarımı tamamlar (33, 35).

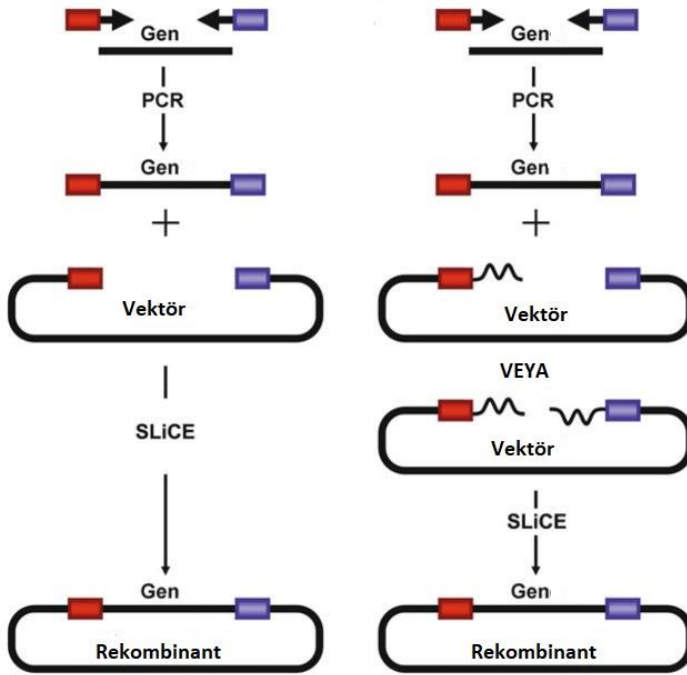
BOX-BEHNKEN

Box ve Behnken'in 1960'lı yıllarda geliştirdiği bu yöntem, 3 seviyeli kısmi faktöriyel tasarım olarak Box ve Behnken tarafından geliştirilmiş ve yanıt yüzeyi analizinin yapılmasına olanak sağlayan istatistiksel bir yöntemdir. Bu tasarımda Plackett-Burmen tasarımından elde edilen en etkili faktörlere yüksek orta ve düşük seviyeler atanır ve deney matrisinde kullanılacak kombinasyonlar bu seviyelerin en optimal şekilde kullanılması ile oluşturulur. Bu sayede en optimal deney koşulları belirlenerek etkili bir deney matrisi kurulmuş olur. Böylece deney sayısı azalmış ve elde edilen sonuçlar güven kazanmıştır (33, 36).

KLONLAMA, VEKTÖR SEÇİMİ VE TRANSFORMASYON

Rekombinant protein üretim süreci, hedef proteinin veya proteinlerin transle ve transkripte olduğu bir ya da daha fazla gen bölgesinin birbirleriyle ligasyonunun uygun, yabancı bir konakçı hücreye aktarılması ve vektörler üzerindeki güçlü promotorlar yardımıyla hedef gen ürününün ifadenmesi ile şekillenmektedir. Moleküler klonlama metotları akılcı bir deney tasarımı ile başlar. Hedeflenen genler güçlü bir promotörün altında eksprese edilecek şekilde klonlanarak hedef proteinin ifadesi sağlanır. İyi bir klonlama için taşıyıcı vektörler üzerlerinde ribozom bağlanma bölgeleri, kontrol elementleri, antibiyotik direnç kaseti, replikasyon orijinleri, klonlamaya olanak sağlayan restriksiyon endonükleaz kesim bölgeleri ve güçlü promotörler bulunmaktadır. Tüm bunlar hücredeki regülasyon düzeninin bir parçasıdır ve bu düzen mekanizması hücrenin enerjisini etkili bir şekilde kullanarak protein eksprese etmesini sağlamaktadır. Fakat bir proteinin ekspresyonu sadece iyi bir klonlama tasarımına bağlı değildir. Promotor seçimi, ekspresyon vektörlerinin kopya sayısı, çoklu klonlama bölgesi, antibiyotik direnç kaseti, pET ekspresyon sistemleri gibi bazı özellikler de protein üretimini etkilemektedir (15, 37, 38). *Lac* operonuna ek olarak, *E. coli* BL21 (DE3) ikinci bir düzenleyici sisteme sahiptir. cAMP-CRP kompleksi *lacI* promotörü başlangıç bölgesinde yer alan CRP bağlanma bölgesine bağlanır. Bu bağlanma *lac* promotorunun transkripsiyonunu başlatır. Bir indükleyici varlığında CRP bağlanma bölgesine bağlanamaz ve *lac* promotorunun aktifliği dramatik bir şekilde düşer. *Lac* promotörünün *lacI* ve CRP ile ikili kontrolü maksimum baskılamayı sağlamış olur. Bu mekanizmalara birçok enzim ve faktör de dahil olur. Bazı durumlarda yabancı bir proteinin salgılanması, üretilmesinden daha verimlidir. B hücreleri T2S salgı sistemi barındırdığından diğer hatlardaki hücrelerden daha fazla protein salgılar. Bu özelliği ile de rekombinant protein üretimi için daha avantajlı bir konumdadır (7). Bu tez çalışmasında ilgili iki gen bölgesi iki farklı plazmide klonlanmıştır. Kullanılan iki plazmid birbirlerinden farklı antibiyotik direnç kasetleri içermektedir. Her iki gen bölgesi de plazmid vektörlerine Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) metodu ile klonlanmıştır. Konvansiyonel klonlama yönteminde plazmid vektörü restriksiyon endonükleaz enzimi ya da enzimleri ile kesilerek restriksiyon enzime özgü DNA dizilerinden DNA'nın fosfodiester bağlarını keserek DNA üzerinde yapışkan uçlar (sticky ends) veya kör uçlar (blunt ends) oluşturmaktadır. Daha sonra bu uçları klonlamaya hazır hale getirmek için DNA'nın 3' ve 5' uçlarına PZT ile DNA dizileri eklenir. Çoğaltılan insert DNA ile plazmid vektöre ait

DNA parçaları DNA ligaz enzimi ile bir araya getirilmiş olur (Şekil 2.2.). Bu tez çalışmasında da konvansiyonel klonlama metodu kullanılmış, böylece insert, plazmid vektör içerisinde klonlanmıştır (39, 40). Daha sonra SLiCE ürünleri *E. coli* DH5α ve HME63 suşlarına transforme edilmiş ve uygun antibiyotikli besiyerlerinde pozitif transformantlar seçilmiştir. Seçilen koloniler daha sonra farklı miktarlarda IPTG ile indüklenerek T7 promotörü kontrolünde GFP ekspresyonlarındaki fenotipik heterojenite gözlemlenmiştir.



Şekil 2.6. SLiCE metodu ile klonlama (40)

2.4.1.1. T7 RNA POLİMERAZ GENİ

T7 Polimeraz geni RNA Polimerazlar arasında en iyi çalışılmış ve analiz edilmiş genlerdendir. Gürbüzlüğü ve promotör spesifik üretimi sağlayan T7RNAP bu özellikleri ile in vivo gen ekspresyonu için çok kullanışlıdır. Bu promotör kendi kendini limitleme özelliğindedir. *E. coli*'de *lac* operatörü kontrolünde IPTG ile indüklenen T7RNAP ekspresyon sistemi kontrollü bir şekilde protein eksprese eder (4, 31, 41). Bu tez çalışmasında T7 RNA Polimeraz geni spesifik primerlerle PZT ile *E. coli* BL21 suşu kromozomal DNA'sından 3294 baz çifti uzunluğunda çoğaltılarak elde edilmiştir. T7 RNA polimeraz geni SLiCE klonlama ile *E. coli* DH5α ve HME63 suşlarına klonlanmıştır.

2.4.1.2. YEŞİL FLORESAN PROTEİN GENİ

Heterolog protein üretimi optimizasyonu ve kantitasyonu çalışmalarında farklı renklerde floresan ışık veren protein kullanımı yaygındır. Floresan proteinleri genellikle deniz canlılarından ve böceklerden karakterize ve elde edilmiştir. GFP geni, *Aequorea victoria* olarak adlandırılmış deniz anasından amplifiye edilmiştir. UV ışığına maruz bırakılan GFP geni içeren hücreler yeşil floresan ışık yayarlar (42, 43). Bu çalışmada Yeşil Floresan Proteini (GFP) daha önce klonlandığı pET28a plazmid vektörü DH5 α ve HME63 suşlarına transforme edilerek kullanılmıştır. Çalışma kapsamında GFP, T7 promotörü kontrolünde IPTG ile indüklenerek kontrollü bir şekilde ifade ettirilmiş ve fenotipik heterojenitenin analizi sağlanmıştır.

2.5. FERMANTASYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Stokastik gen ekspresyonunun indüklenmesi için hücrelerin yaşam şartlarının zorlaşması ve onları değişime zorlaması gerekmektedir. Bu tür bir stresi sağlamak ve fenotipik heterojeniteyi indüklemek için, mikropilaya kuyularında besiyeri ortamında bulunan besin maddeleri deney tasarımı kurgulanan matrisine uygun olarak farklı oranlarda eklenmiştir. Bu tez çalışmasında çok sayıda faktörü işleyen kısmi faktöriyel tasarımı olan Plackett-Burman tasarımından yararlanılmıştır. Bu metotla uygulanan faktörler arasında en etkili faktörler belirlenmiştir. Ancak bu tasarım faktörlerin birbirleriyle olan ilişkisini ortaya koymak açısından yetersiz kaldığından, bu eksiklik yanıt yüzeyi oluşturma yetisine sahip olan 3 seviyeli bir kısmi faktöriyel tasarım olan Box-Behnken tasarımı ile tamamlanmıştır. Bu tasarımda Plackett-Burman tasarımından elde edilen en etkili faktörlere yüksek orta ve düşük seviyeler atanmış, deney matrisinde kullanılan kombinasyonlar bu seviyelerin en optimal şekilde kullanılması ile oluşturulmuş ve faktörler arası etkileşim analizi için Box-Behnken Metodu kullanılarak yanıt yüzeyi elde edilmiştir (36). Kullanılan faktörler, en yüksek ve düşük seviyeleri ile Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Besiyeri Faktörleri En Düşük ve En Yüksek Miktarları

Gliserol	%0- %0.8
IPTG	0.1mM – 2mM
Etanol	%0-%3
Kanamisin	25 ng/mL
Oksitetrasiklin	20 ng/mL
Baz Besiyeri (Maya özütü-Tripsin karışımı)	%1- %3

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Heterolog protein üretimi hem araştırmalarda kullanılması hem de ürün eldesi için biyoteknolojik uygulamalarda çok yüksek önem taşımaktadır. Heterolog protein üretimi ileri moleküler genetik mühendisliği ve biyoteknolojik uygulamalar kullanılarak hedef proteinin akılcı sentetik devrelerin yabancı bir hücrede kurulması ile eksprese ettirilmesidir. Farklı hedef proteinlerin üretilmesi için farklı sentetik devre ve fermantasyon koşullarına ihtiyaç duyulmakta olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Heterolog protein üretiminde en çok tercih edilen organizma, genetik yapısı ve hücresel işleyişi iyi bilinen *E. coli*'dir. Uzun yıllar çalışılmasına karşın, yüksek verimde heterolog protein eldesi için en uygun fermantasyon koşulları ve sentetik devre bilinmemektedir (8). Heterolog protein üretiminde amaç mikrobiyal hücre fabrikaları oluşturarak düşük maliyetle ve kısa zamanda yüksek verimlilikle protein veya diğer bileşenleri elde etmektir (9, 17, 26). Bu amaç yüksek verimli hücre fabrikalarının evrimleştirilmesi ve yüksek verimde protein üreten hücre bankası oluşturma ihtiyacını doğurmaktadır. Hücreler stabil formlarını evrimsel süreç içerisinde hayatta kalma şansını arttıracak gen regülasyonlarını devam ettirerek alırlar. Mevcut koşullara uyumluluk, sağlayarak hayatta kalma ihtimalini arttırmak üzere stokastik olarak gerçekleşen gen ekspresyonları, evrimin önemli bir parçasıdır (5, 10). Stokastik gen ekspresyonu sonucu izogenik hücrelerde gözlenen fenotipik heterojenitenin bazı bireylerin stres koşullarında hayatta kalma şansını arttırdığı yapılan çalışmalarda raporlanmıştır (9, 14, 16, 18, 20). Bazı çalışmalar artan fenotipik fluktuasyonun artan evrimleşme hızı ile ilişkisini göstermektedir (8, 16, 18). Rekombinant protein üreten mikrobiyal hücre fabrikaları hem heterolog protein üretiminin hem de fermantasyon sürecinde maruz kaldıkları ortam koşullarının getirdiği stres ile artmış fenotipik heterojenite ve mutasyon hızlarını indükleyerek popülasyonun yeni bir "fitness" durumuna adapte olması ile sonuçlanabilmektedir. Heterolog protein üretimi için hücre fabrikalarının oluşturulmasında kullanılmak üzere kurgulanan hücrelerin gürbüz, yüksek biyokütle ve verime sahip olmalarının yanında ürettikleri peptidlerin fonksiyonel ve çözünür nitelikte olmaları büyük önem taşır. Bu özelliklere sahip hücre bankaları oluşturulurken ifadelenecek gen her ne kadar rasyonel tasarımlarla hücreye aktarılmış olsa da hücre bankalarının istenilen özelliklerde oluşturulması büyük ölçüde evrimsel süreçler ile mümkün olmaktadır (8, 9, 14). Bu olguların çalışılmasında en sık kullanılan hücre olan

E. coli hücrelerinde rekombinant protein eldesi amacıyla kullanılmak üzere sıkça tercih edilen sistemlerden biri pET sistemidir. Bu sistemde laktoz varlığında indüklenebilen lacUV5 promotörü kontrolünde T7 RNA Polimeraz üretimi gerçekleşmektedir. Bu viral DNA'ya bağımlı T7 RNA Polimeraz enzimi ise özgül olduğu T7 promotör dizisine bağlanarak güçlü transkripsiyonel aktivite göstermektedir (4, 6). Güçlü promotörlerin hücreye getirdiği metabolik yükler sonucunda hücrelerde stres yanıtı gelişir. Gerçekleştirmiş olduğumuz ön çalışmalarda, T7 promotörü kontrolünde heterolog rekombinant protein (yeşil floresan protein) ifadeleyen *E. coli* hücre fabrikalarının, bu proteinin ifadesi yönünden fenotipik heterojenite gösterdiğini gözlemledik. Bu tez çalışmasında T7 promotörü kontrolünde yeşil floresan protein üreten Δ recA ve Δ mutS genotipe sahip *E. coli* hücre fabrikaları elde edilmiştir. Bu hücrelerin düşük ve yüksek heterolog rekombinant protein ifade heterojenitesi göstermek üzere indüklendikleri fermentasyon koşulları optimize edilmiş ve bu koşullar ile pasajlar boyunca indüklenen kültürlerin proteomik ve genomik parmak izi profillemesi yapılarak adaptasyon süreci değerlendirilmiştir. Böylece, genetik olarak stabil Δ recA bakteriler ile nokta mutasyonlar geliştirmeye yatkın Δ mutS hücre fabrikalarının adaptasyon hızları karşılaştırılmıştır. Bu tezde farklı fermentasyon koşulları ile indüklenen hücrelerin düşük ve yüksek heterolog rekombinant protein ifade heterojenitesi gösterdiği koşulları sağlayan önemli faktörler Plackett- Burmen ile belirlenmiş ve yanıt yüzeyleri Box- Behnken tasarımı ile toplanmıştır. Bu tez, uzun yıllardır araştırılan stokastik gen ekspresyonunun evrimsel süreçteki yerinin anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Biyoteknolojik uygulamalarda yaygın bir sorun olarak karşılaşılan zor proteinlerin üretimi ve yüksek verimde heterolog protein eldesi bu tez çalışmasında yaratılan stresler ve organizmanın bu streslere verdiği yanıtlar baz alınarak farklı yaklaşımlarla sağlanabilir ve arttırılabilir. Elde edilen bulgular sonucunda fenotipik heterojenitenin optimizasyonu sağlanabilir ve çalışmada uygulanan metotlar istenilen özelliklerde hücre bankaları evrimleştirmekte kullanılabilir. Bu tez çalışmasında fenotipik heterojenitenin düşük ve yüksek düzeyde ifade bulduğu kültürlerde üretilen rekombinant protein üretiminin bu hücrelerdeki evrimsel hıza etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma farklı genotipteki hücrelerde evrimsel sürecin anlaşılması ve yüksek verimde heterolog protein elde etmek üzere kullanılması açısından büyük önem taşımaktadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Bu tez çalışmasında *Escherichia coli* BL21(DE3), *E. coli* DH5 α ve *E. coli* HME63 suşları kullanılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda pET28a_GFP içeren BL21 suşu kullanılmış ve Plackett-Burmen tasarımı ile R Studio’da tasarlanan matris ile belirlenip besiyerine eklenen faktörlere karşı Box-Behnken tasarımı ile yanıtlar toplanmış ve en önemli faktörler belirlenmiştir. Markör olarak kullanılan GFP üretiminin seçilen hücrede indüklenmesi için gerekli T7RNAP geni *E. coli* BL21 suşu kromozomal DNA’sından PCR ile çoğaltılarak elde edilmiştir. Devreyi taşıması için pACYC184 plazmidi izole edilmiş ve EcoRI enzimi ile ligasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan T7RNAP PCR ürünü, linearize edilmiş saf pACYC184 plazmidine SLICE yöntemi ile klonlanmıştır. Hücrenin GFP eksprese eder hale gelebilmesi için pET28a_GFP içeren *E. coli* BL21 suşundan pET28a_GFP plazmidi izole edilmiş ve T7RNAP geni içeren pACYC184 plazmidi ile DH5 α ve HME63 suşlarına ko-transforme edilmiştir.

ÖN ÇALIŞMA

Bu tez çalışmasında mikroorganizmalara stres uygulanarak fenotipik heteronejnite elde edilmesi amaçlanmıştır. Belirlenen stres faktörlerinin hücre üzerindeki etkisini gözlemlemek ve faktörlerin kullanılabilirliğini ölçmek için önceden transforme edilmiş - 80°C’de %50 gliserollü 2 xYT içerisinde saklanmış pET28a plazmid vektörüne entegre GFP genini içeren BL21 hücresi kullanılmıştır. Yapılan çalışmada BL21-GFP1.1 hücreleri 50 μ g/ml Kanamisin içeren 10 ml 2xYT içerisinde 37°C’de bir gece inkübe edilmiştir. Elde edilen kültür OD₆₀₀=4.5 olarak ölçülmüştür. 1 ml hücre kültürden alınarak ependorfa aktarılmış ve 6000 k x g’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpteki besiyeri temizlendikten sonra elde edilen pellet 900 μ l 1x PBS ile resüspanse edilmiştir. Elde edilen süspansiyon OD₆₀₀=0.05 olacak şekilde deney matrisine eklenmiştir (Ek-1). Deney matrisinde kullanılan baz besiyeri ve tampon çözelti Çizelge 4.1.’de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucu faktörlerin izogenik hücrelerde fenotipik heterojenite yaratmakta başarılı olduğu görülmüş ve tez çalışmalarında kullanılmışlardır.

BIYOKÜTLE ÖLÇÜMÜ

Biyokütle ölçümleri 595 nm’de optik yoğunluk ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Agilent Technologies 8453 UV-visible spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Ölçümden önce steril 2 x YT ölçülerek referans ölçüm olarak tanıtılmıştır.

REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ İÇİN BAKTERİ SUŞU VE VEKTÖR SEÇİMİ

Bu tez çalışmasında deneysel evrim ve rekombinant protein üretiminde sıkça tercih edilen *Escherichia coli* bakterisinin farklı suşları kullanılmıştır (27, 30). GFP gen bölgesi içeren pET28a plazmidi izolasyonu için *E. coli* BL21 suşu, kurulan sentetik devreleri taşıması için ise *E. coli* DH5a ve *E. coli* HME63 suşları kullanılmıştır. Heterolog GFP üretiminde bakteriyel pET ekspresyon sisteminden yararlanılmıştır. Bakteriyel pET sistemlerinde laktoz varlığında indüklenebilen lacUV5 promotörü kontrolünde T7 RNA Polimeraz üretimi gerçekleşmektedir. Bu viral DNA’ya bağımlı T7 RNA Polimeraz enzimi ise özgül olduğu T7 promotör dizisine bağlanarak güçlü transkripsiyonel aktivite göstermektedir.

***Escherichia coli* DH5a**

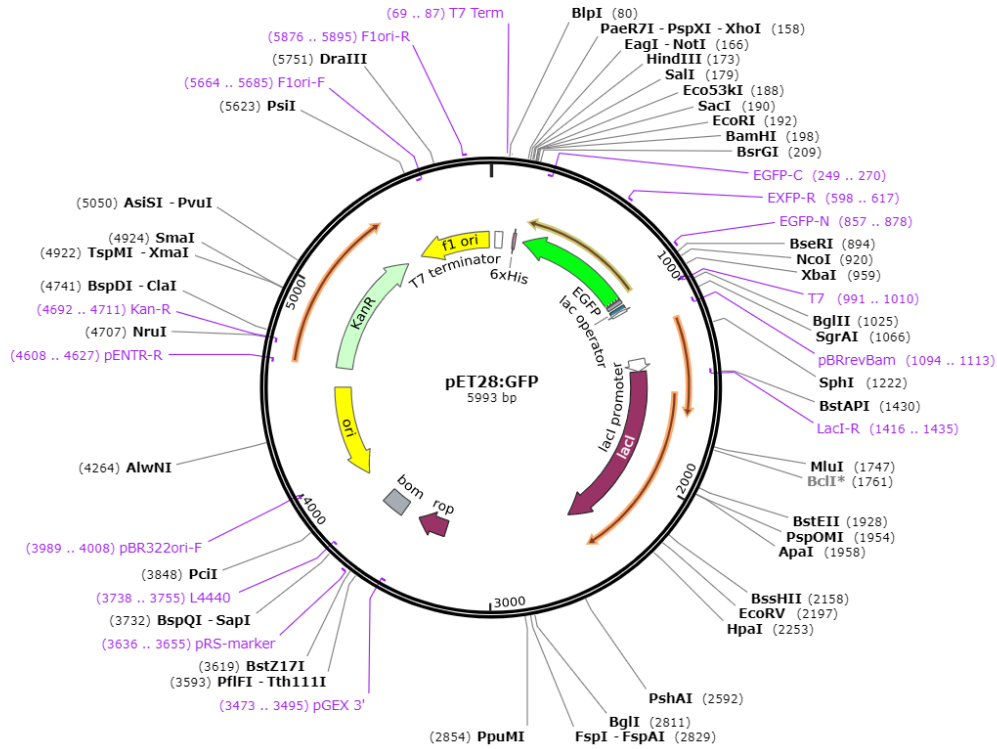
DH5a laboratuvarlarda en sık kullanılan *E. coli* suşudur. *E. coli*’nin homolog rekombinasyonlara olan yatkınlığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu yatkınlığın sebebi onarımda rol alan en önemli bakteriyel rekombinasyon proteinlerinden RecA proteinini içermesidir. İçerdiği bu protein ve benzer mekanizmaları nedeniyle genetik olarak stabil bir suştur (44). Bu tez çalışmasında stabil genotipteki bir bakterinin adaptasyon hızının incelenmesi için kullanılmıştır.

***Escherichia coli* HME63**

Rekombinasyon sırasında gerçekleşen hatalı eşleşmelerin tamirini MutS proteini üstlenir. HME63 suşu MutS mutant bir suştur. Bu mutasyonu sebebiyle genetik mutasyonlara açık bir genotiptedir (45). Bu tez çalışmasında mutasyona yatkın genotipteki adaptasyon hızının incelenmesi için kullanılmıştır.

pET28a-GFP

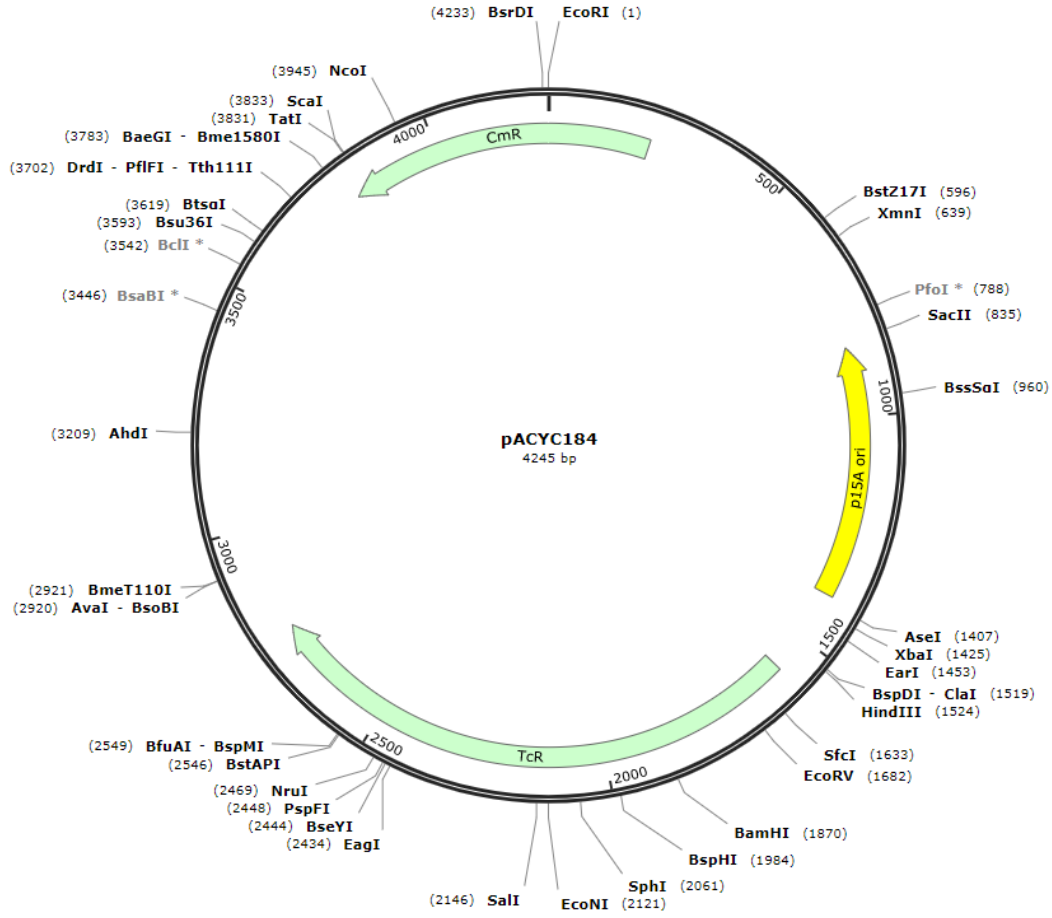
Bu tez çalışmasında, laboratuvarında daha önce üretilmiş olan pET28a-GFP plazmidi kullanılmıştır. Bu plazmid DH5α ve HME63 hücrelerine pACYC184-T7RNAP plazmidi ile ko-transforme edilmiştir. Bu sayede T7 promotoru kontrolünde GFP üretimi sağlanmıştır. İçerdiği kanamisin direnç kaseti sayesinde plazmidi alan koloniler seçici besiyerinde elde edilmiştir.



Şekil 4.1. pET28a-GFP plazmid vektörünün genetik haritası

pACYC184

Bu çalışmada p15a replikasyon orijinli düşük kopya sayılı (hücre başına 15 kopya) 424 bp uzunluğundaki pACYC184 vektör plazmidi kullanılmıştır. EcoRI enzimi ile kloramfenikol direnç kaseti bölgesinden kesilmiş ve bu bölgeye T7 RNA Polimeraz geni eklenmiştir. Bu plazmid DH5α ve HME63 hücrelerine pACYC184-T7RNAP plazmidi ile ko-transforme edilmiştir. Bu sayede T7 promotoru kontrolünde GFP üretimi sağlanmıştır. İçerdiği tetrasiklin direnç kaseti sayesinde plazmidi alan koloniler seçici besiyerinde elde edilmiştir.



Şekil 4.2. pACYC184 plazmid vektörünün genetik haritası

BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

Escherichia coli DH5α ve BL21 suşları üretimi için 2xYT besiyeri kullanılmıştır. T7RNAP geni içeren pACYC184 vektör plazmidini alan transformant seçimi için 20 µg/mL final konsantrasyonunda Oksitetrasiklin içeren Lysogeny Broth (LB) katı besiyeri kullanılmıştır. GFP geni içeren pET28a vektör plazmidini alan transformant seçimi için 50 µg/mL final konsantrasyonunda Kanamisin içeren LB katı besiyeri kullanılmıştır. Her iki plazmidi barındıran hücrelerin seçilmesinde 20 µg/mL final konsantrasyonunda Oksitetrasiklin ve 50 µg/mL final konsantrasyonunda Kanamisin içeren katı besiyeri kullanılmıştır. Fenotipik heterojenitenin tetiklenmesinde kullanılan baz besiyeri ve tampon çözeltisi içerikleri Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Deney matrisi Ek-2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hazırlanan Besiyerlerinin İçerikleri

2xYT						
	Konsantrasyonlar			Hacim		
	Stok		Çalışan		250	ML
Trypton	toz		16 g/L		4	G
Maya özütü	toz		10 g/L		2,5	G
NaCl	5000	mM	8,6	mM	0,43	mL
H ₂ O					243,07	mL

LB OXT20 Katı Besiyeri						
	Konsantrasyonlar				Hacim	
	Stok		Çalışan		250,000	ML
Trypton	Toz		10,000 g/L		2,500	G
Maya Özütü	Toz		5,000 g/L		1,250	G
Agar	Toz		15,000 g/L		3,750	G
NaOH	1.000,000	mN	1,000	mN	250	µL
NaCl	5.000,000	mM	8,600	mM	430	µL
OXT	200.000,00	µg/mL	20,000	µg/mL	25	µL
H ₂ O					249,295	mL

LB KAN50 Katı Besiyeri						
	Konsantrasyonlar				Hacim	
	Stok		Çalışan		250,000	mL
Trypton	Toz		10,000 g/L		2,500	G
Maya Özütü	Toz		5,000 g/L		1,250	G
Agar	Toz		15,000 g/L		3,750	G
NaOH	1.000,000	mN	1,000	mN	250	µL
NaCl	5.000,000	mM	8,600	mM	430	µL
Kan	25.000,00	µg/mL	50,000	µg/mL	500	µL
H ₂ O					248,820	mL

LB OXT20 KAN50 Katı Besiyeri						
	Konsantrasyonlar				Hacim	
	Stok		Çalışan		250,000	mL
Tripton	Toz		10,000	g/L	2,500	G
Maya Özü	Toz		5,000	g/L	1,250	G
Agar*	Toz		15,000	g/L	3,750	G
NaOH	1.000,000	mN	1,000	mN	250	µL
NaCl**	5.000,000	mM	8,600	mM	430	µL
OXT	200.000,00	µg/mL	20,000	µg/mL	25	µL
Kan	25.000,00	µg/mL	50,000	µg/mL	50	mL
H ₂ O					249,245	mL

10x Tampon						
	Konsantrasyonlar				Hacim	
	Stok		Çalışan		10,000	µL
Na-Fosfat Tamponu pH7.2	1.000,00	mM	250	mM	2,500	µL
Glukoz	1.000,00	mM	27,80	mM	278	µL
MgSO ₄	1.000,00	mM	5,00	mM	50	µL
H ₃ BO ₃	100,000	mM	1,000	mM	200	µL
H ₂ O					6972	µL

Baz Besiyeri						
	Konsantrasyonlar				Hacim	
	Stok	Çalışan			25,000	MI
Maya Özü	Toz	250	mM		3	G
Tripton	Toz	27,80	mM		1,5	G
H ₂ O					23	mL

ESCHERİCHİA COLİ BL21 NÜKLEİK ASİT EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

T7 RNA Polimeraz geninin eldesi için *E. coli* BL21 (DE3) suşunun kromozomal DNA'sı izole edilmiştir. BL21 (DE3) hücreleri daha önce -80'de stoklanan pelletlerden elde

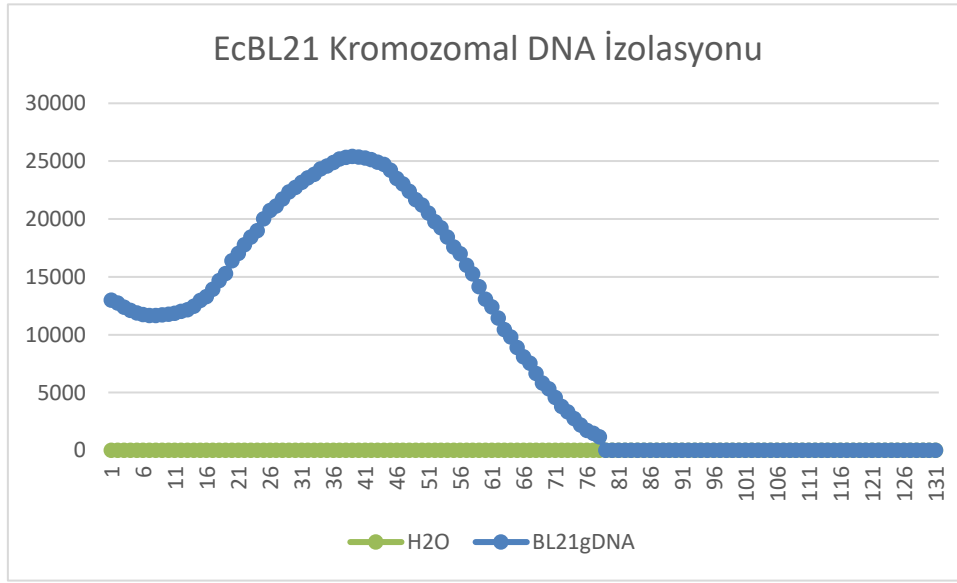
edilmiş ve Guanidin HCl ile lize edilmiştir. Lize edilen hücreler daha sonra saflaştırma amacı ile Sodyum asetat ve Kloroform solüsyonu ile vortekslenip santrifüj ile kromozomal DNA'yı barındıran pellet ayrılmıştır. Elde edilen pellet 600 µL 2-propanol ile vortekslenildikten sonra 13000 x g'de 15 dakika santrifüj edilip önce %99'luk, sonra %70'lik olmak üzere ikişer kez alkol ile yıkanmıştır. Saflaştırılan DNA, 45 µL 2.5 mM Tris pH8 ile sulandırılarak sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. Kromozomal DNA Lizis Tamponunda Kullanılan Kimyasallar ve Çalışan Konsantrasyonları

Guanidin HCl	4 M
Sodyum sitrat pH7	25 mM
Triton X-100	50 µL
β-Merkaptoetanol	3,4 µL
H ₂ O	
Sodyum asetat pH 4.6	33,33 µL
Fenol-Kloroform-IAA	500 µL

Çizelge 4.3. Kromozomal DNA Yıkamasında Kullanılan Solüsyon Kimyasalları ve Miktarları

EcBL21 Lizis Ürünü	450 µL
Sodyum asetat	50 µL
Kloroform	600 µL
H ₂ O	100 µL



Örnek	ng/uL	A260	A280	260/280	260/230
H₂O	-0.26	-0.005	-0.000	23.77	0.56
BL21gDNA	1263.48	25.270	12.405	2.04	2.13

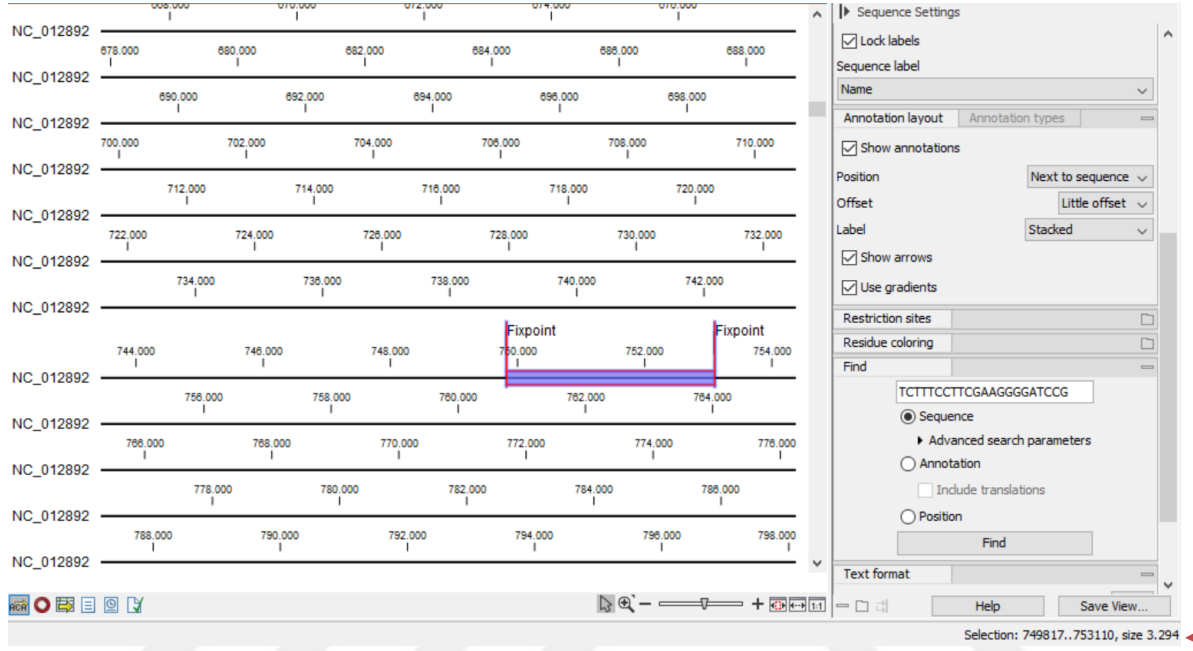
Şekil 4.3. *E. coli* BL21 kromozomal DNA izolasyonu spektrofotometrik analizi

***ESCHERİCHİA COLİ* BL21 KROMOZOMAL DNA'SINDAN T7 RNA POLİMERAZ GENİNİN PZT İLE ÇOĞALTILMASI**

Bu tez çalışmasında sentetik genetik devrenin oluşturulması için gereken T7 RNA Polimeraz gen bölgesi, *E. coli* BL21(DE3) suşundan PZT reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. PZT deneyleri için Phusion Taq Polimeraz™, GC Buffer, MgCl₂ 25mM (New England Biolabs), dNTP set (ThermoFischer Scientific) kullanılmıştır. Tepkimede kullanılan primer çifti Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. PZT ürün boyutu 3294 bp olarak CLC Sequence Viewer programında hesaplanmıştır (Şekil 7).

Çizelge 4.4. T7 RNA Polimeraz Gen Bölgesinin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler

T7-2	GCGCAACGCAATTAATGTAAG
T7-3	TCTTTCCTTCGAAGGGGATCCG



Şekil 4.4. T7 RNA Polimeraz gen bölgesinin PZT ürün büyüklüğü

T7 RNA POLİMERAZ PZT ÜRÜNÜ SİLİKA MATRİKS İLE SAFLAŞTIRILMASI

Polimeraz Zincir Tepkimesi ile çoğaltılan T7RNAP reaksiyon sonucu ortamda bulunan primer ve diğer kalıntıların uzaklaştırılması maksadı ile silika matriks kullanılarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla 100 µL T7RNAP PZT ürünü, Guanidin HCl içeren 500 µL bağlanma tamponu çözeltisi ile karıştırılmıştır (Çizelge 4.5.). Oluşturulan sarı karışım toplam 500 µL hacminde filtreye yüklenmiştir. Filtre altındaki toplama tüpü ile 5.7000 x g ile 20 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpü değiştirilmiş ve filtre 750 µL yıkama tamponu (Çizelge 4.6.) ile 5.7000 x g ile 20 saniye santrifüj edilerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işleminden sonra toplama tüpü temizlenip filtre 13000 x g ile 5 dakika santrifüj edilerek filtredeki tüm fazla sıvı toplama tüpünde toplanmıştır. Toplama tüpü temizlenerek filtre ile 5 dakika süre ile 37°C'lık etüvde kurutulmuştur. Kuruyan filtrenin toplama tüpü değiştirilerek 60 µl H₂O pH8-Tris-Cl pH8, 2,5 mM

eklenerek devamlı olarak 2000 x g ile 30 saniye, 4000 x g ile 30 saniye, 8000 x g ile 30 saniye ve 12000 x g ile 1 dakika santrifüj edilerek elüsyon işlemi tamamlanmıştır.

Çizelge 4.5. Guanidinli Saflaştırma Protokolü Bağlanma Tamponu Çözeltileri ve Kullanılan Miktarları

Guanidin-HCl 8M	312.5 µl
2-propanol %100	150 µl
Bromtimol Mavisi 50x	10 µl
Na-Asetat 3 M	3,33 µl
Plazmid DNA	100 µl
H ₂ O	24,17 µl

Çizelge 4.6. Guanidinli Saflaştırma Protokolü Yıkama Tamponu Çözeltileri ve Kullanılan Miktarları

Tris-Cl pH 7.0	59,4 µl
Etanol	4752 µl
H ₂ O	1128,6 µl

4.1.5. PACYC184 PLAZMİD VEKTÖRÜNÜN MİDİ – PREP ALKALEN LİZİS PLAZMİD EKSTRAKSİYONU

pACYC184 plazmid vektörünün izolasyonu “midi-prep” alkalen lizis metodu ile sağlanmıştır. 50 ng/μl OXT içeren 50 mL 2xYT besiyerine 20 μl *E. coli* inokule edilerek 37 °C’de 180 RPM’de bir gece çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür, 25’er μl hacminde 2 falkona bölünerek +4°C sıcaklıkta 5000 x g ivmesi ile 10 dakika santrifüj edilip çöktürülmüştür. Santrifüjden alınan falkondan hem dökülerek hem de pipet ile temizlenerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Daha sonra buz üzerine alınan pellet, yine buz üzerinde bekleyen 200 μl soğuk alkalen lizis I çözeltisi (Çizelge 4.6.) ile resüspanse edilerek 4 ependorf tüpüne bölüştürülmüştür. Ardından tüplere taze hazırlanmış 400 μl alkalen lizis II çözeltisi eklenmiştir (Çizelge 4.6). Çözeltiler ekledikten sonra tüpler 5 kez alt üst edilerek nazikçe karıştırılmıştır. Sonrasında 300 μl alkalen lizis III çözeltisi (Çizelge 4.6.) eklenen tüpler tekrar nazikçe karıştırılmış ve 5 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdiğinde tüpler 13000 x g ivme ile +4°C’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan tüp içerisindeki plazmid DNA’yı çözünür halde barındıran üst fazdan 600 μl alınarak temiz DNase, RNase içermeyen bir tüpe aktarılmış, aynı hacimde kloroform ile vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Ardından tüpler 13000 x g ivme ile santrifüj edilmiş daha sonra üst faz temiz bir tüpe aktararak 1:1 oranında 2-propanol ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım -20°C soğukta 40 dakika bekletilerek içerdiği plazmid DNA’sı çöktürülmüş ve 13000 x g ivme ile 20 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir. Tüpteki alkol pipet yardımı ile temizlendikten sonra DNA pelleti bir kez 900 μl %99 (hacim/hacim) etanol ve iki kez de 900 μl %70 (hacim/hacim) etanol ile yıkanmıştır. Yıkama basamakları 13000 x g ivme ile santrifüj edilip alkol uzaklaştırılarak tamamlanmıştır. Sonrasında etanolün kurutularak uzaklaştırılması için tüpler 37° C’de etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Kuruyan ve opaklığını kaybeden pellet 50 μl RNaz’lı su ile çözülmüştür. İleri aşamalarda daha yüksek miktarlarda plazmid DNA kullanmak üzere RNaz’lı su ile çözülen pellet bir diğer tüpteki pellet üzerine eklenerek diğer pellet de 50 μL toplam hacimde çözülmüştür.

Çizelge 4.6. Alkalen Lizis I, II ve III Çözeltileri ve Çalışan Konsantrasyonları

Alkalen Lizis I		Alkalen Lizis II		Alkalen Lizis III	
Glukoz	50 mM	NaOH	200 mM	K-Asetat	242.42 g/L
Tris-Cl pH8	25 mM	SDS	1%	Glasiyel Asetik Asit	2 M
EDTA pH8	10 mM	H ₂ O		H ₂ O	
H ₂ O					

SİLİKA MATRİKS İLE PACYC184 PLAZMİD VEKTÖRÜNÜN SAFLAŞTIRMASI

Elde edilen plazmid DNA'sının ileriki reaksiyonlara daha yüksek verimde girebilmesi için Guanidin'li çözelti ile silika filtreden geçirilip yıkanmıştır. Saflaştırma protokolüne daha uygun olması ve ürün kaybını azaltmak için elde edilen plazmid DNA-RNaz'lı su çözeltisine 50 µL daha RNaz'lı su eklenerek toplam hacim 100 µL yapılmıştır. Bu protokolde kullanılan çözelti içeriği Çizelge 4.7.'te verilmiştir. 100 µL plazmid DNA ürünü 500 µL bağlanma tamponu çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım renginin sarı olduğu kontrol edilip toplam 500 µL karışım filtreye yüklenmiştir. Filtre altındaki toplama tüpü ile 5.7000 x g ile 20 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpü değiştirilmiş ve filtre 750 µl yıkama tamponu (Çizelge 4.8.) ile 5.7000 x g ile 20 saniye santrifüj edilerek yıkanmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Yıkama işlemini takiben toplama tüpü temizlenip filtre 13000 x g ile 5 dakika santrifüj edilerek filtredeki tüm fazla sıvı toplama tüpünde toplanmıştır. Toplama tüpü temizlenerek filtre ile 5 dakika süre ile 37°C'lik etüvde kurutulmuştur. Kuruyan filtrenin toplama tüpü değiştirilerek 81 µl H₂O pH8-Tris-Cl pH8, 2,5 mM eklenerek devamlı olarak 2000 x g ile 30 saniye, 4000 x g ile 30 saniye, 8000 x g ile 30 saniye ve 12000 x g ile 1 dakika santrifüj edilerek elüsyon işlemi tamamlanmıştır.

Çizelge 4.7. Guanidinli Saflaştırma Protokolü Bağlanma Tamponu Çözeltileri ve Kullanılan Miktarları

Guanidin-HCl 8M	312,5 µl
2-propanol %100	150 µl
Bromtimol Mavisi 50x	10 µl
Na-Asetat 3 M	3,33 µl
Plazmid DNA	100 µl
H ₂ O	24,17 µl

Çizelge 4.8. Guanidinli Saflaştırma Protokolü Yıkama Tamponu Çözeltileri ve Kullanılan Miktarları

Tris-Cl pH 7.0	59,4 µl
Etanol	4752 µl
H ₂ O	1128,6 µl

PACYC184 PLAZMİD VEKTÖRÜNÜN RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ ENZİMİ İLE LİNNERİZASYONU

4.1.7.1. EcoRI restriksiyon enzimi ile kesim

SLICE protokolünde kullanılmak üzere saflaştırılan pACYC184 plazmid vektörü 20U/µl EcoRI restriksiyon endonükleazı ile kesilmiştir. Kesim protokolünde kullanılan malzemeler Çizelge 4.9.'da verilmiştir. Toplam 100 µl'lik reaksiyon tüpünde 10 µl 10 µg/ml EcoRI Tamponu, 1 µl 20 U/µl EcoRI, 1 µl 100 µg/ml sığır serum albümini (BSA), 1 µl 1U/µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) karışımına 80,91 µl 110 ng/µl pACYC184 plazmid vektörü eklenerek toplam hacim 100 µl olacak şekilde DNaz-RNaz içermeyen H₂O ile hazırlanmıştır.

Çizelge 4.9. pACYC184 Plazmid Vektörünün EcoRI Restriksiyon Enzimi ile Lineerizasyonunda Kullanılan Malzemeler ve Çalışan Konsantrasyonları

pACYC184	8.900 ng
EcoRI Tamponu (ThermoScientific)	1 µg/ml
BSA (ThermoScientific)	1 µg/ml
EcoRI (ThermoScientific)	20 U
SAP (ThermoScientific)	1 U
H ₂ O	

4.1.7.2. End-Filling

Bu tez çalışmasında EcoRI restriksiyon nükleaz enzimi kullanılmıştır. Bu enzimle kesim sonucu ürün 5' ucuna 4 nükleotidlik tek zincirli fazladan uç alarak reaksiyondan çıktığından, daha verimli bir klonlama için bu uçlar "End-Filling" yöntemi ile elimine edilmiştir. End-Filling reaksiyonunda kullanılan malzeme ve çalışan konsantrasyonları Çizelge 4.10.'de verilmiştir. 1,2 µl 10 mM dNTP, 12 µl 10 µg/ml Dream Taq Tampon, 0,6 µl 5 U/µl Taq DNA Polimeraz karışımına 100 µl 100 ng/µl pACYC184-EcoRI kesim ürünü eklenmiş, toplam hacim 120 µl olacak şekilde DNaz-RNaz içermeyen H₂O ile tamamlanmıştır. Reaksiyonu takip eden termal döngü (Çizelge 4.11.) için Bio-Rad T100 Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 4.10. End-Filling Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler Ve Çalışan Konsantrasyonları

dNTP (ThermoScientific)	0.1 mM
Dream Taq Tampon (New England Biolabs)	1 µg/ml
Taq DNA Polimeraz (ThermoScientific)	2.5 U
pACYC184–EcoRI kesim ürünü	5000 ng
H ₂ O	

Çizelge 4.11. End-Filling Reaksiyonu Termal Döngü

94°C	60 saniye
55°C	60 saniye
72°C	30 dakika
10°C	Sonsuz

4.1.7.3. Kloroform ile saflaştırma

Kesim ürününün saflaştırılması için kloroform ile saflaştırma yöntemi kullanılmıştır. Bu amaç ile ürün Sodyum asetat ve Kloroform solüsyonu ile vortekslenmiş, 13000 x g’de 15 dakika santrifüj ile pellet çöktürülmüştür. Elde edilen pellet 600 µl 2-propanol ile vortekslenildikten sonra 13000 x g’de 15 dakika santrifüj edilip ardından önce %99’luk, sonra %70’lik alkol ile yıkanmıştır. Saflaştırılan kesim ürünü, 30 µl 2.5 mM Tris pH8 ile sulandırılarak sonraki çalışmalarda kullanılmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Pacyc184-EcorI Kesim Ürününün Kloroform İle Saflaştırılmasında Kullanılan Malzemeler Ve Miktarları

pACYC184-EcoRI kesim ürünü	120 µl
Sodyum asetat	120 µl
Kloroform	600 µl
2-propanol	600 µl
H ₂ O	360 µl

SAFLAŞTIRILMIŞ PACYCY184-ECORI KESİM VE T7 RNA POLİMERAZ PZT ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JELDEN KANTİTASYONU

Klonlamada kullanılmak üzere elde edilen saf pACYC184 plazmid vektörünün ve saf T7RNAP PZT ürününün hangi oranda tepkimeye gireceğini belirlemek için ürünlerin konsantrasyonlarının bilinmesi gerekmektedir. Ürünler 1.6% (w/v) agaroz jele yüklenerek sabit 65 V olarak yürütülmüştür. Jel hazırlama ve yürütme tamponu olarak 50 x stoklu tris – asetik asit – EDTA (TAE), 1 x olarak kullanılmıştır. (Çizelge 4.13) Biorad VersaDoc Imaging System™ ve PDQuest 2-D™ yazılımı kullanılarak alınan jel görüntüsü Gel Analyzer programı ile analiz edilerek ürünlerin konsantrasyonları belirlenmiştir. Analiz esnasında kontrol için önceden konsantrasyonu doğrulanmış pdV2-1 PZT saf ürünü kullanılmıştır. Ürünlerin jele yüklenme miktarları Çizelge 4.13.'te verilmiştir. Agaroz jele yüklenen ürünler, yükleme öncesinde 2 µl %30'luk 6x Yükleme Taponu ile boyanmıştır.

Çizelge 4.13. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon Stok Çözeltileri

Tris-Baz	242 gr / L
Glasiyel Asetik Asit	54,1 ml / L
EDTA 0,5 M pH8	100 ml / L

Çizelge 4.14. pACYC184-EcoRI Kesim Ve T/RNAP PZT Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklene Miktarları

Markör 2000 bp	10 µl
pdV2-1	2 µl
T7RNAP PZT Saf Ürün	0,5 µl
pACYC184-EcoRI Kesim Ürünü	0,5 µl

T7 RNA POLİMERAZ PCR ÜRÜNÜNÜN PACYC184 PLAZMİD VEKTÖRÜNE SLICE YÖNTEMİ İLE LİGASYONU

Bu tez çalışmasında insert DNA'nın (T7RNAP) ve vektör DNA'nın (pACYC184) klonlanması için SLiCE protokolü kullanılmıştır. Protokolde daha önce hazırlanıp -40°C'de depolanan DH5α SLiCE lizati ve 10mM ATP içeren 10X T4 Ligaz Tamponu (New England Biolabs™) kullanılmıştır. Vektör:İnsert oranı, kantitasyon sonuçlarına dayanarak 1:2 oranında kullanılmıştır. Klonlama Biorad T100 Thermal Cycler cihazında 37°C'de 40 dakika inkübasyon gerçekleştirilerek tamamlanmıştır.

PACYC184-T7RNAP SLICE ÜRÜNÜNÜN *ESCHERİCHİA COLİ* / DH5A HÜCRELERİNE TRANSFORMASYONU

Elde edilen ligasyon ürününün *E. coli* DH5 α hücrelerine transformasyonu için TSS ile kimyasal transformasyon yönteminden yararlanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan TSS (transformation & storage solution), 10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂, ve hacimce %10' PEG 6k içermektedir. Solüsyon filtrasyon işleminden sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir. Transformasyonda kullanılacak TSS + DMSO solüsyonu 425 μ l TSS stoğuna 25 μ l DMSO eklenerek hazırlanmış ve transformasyon protokolünde kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bir gece 37°C'de inkübe edilen *E. coli* DH5 α hücrelerinden 80 μ l alınarak (OD₆₀₀=0.1) 20mL 2xYT besiyeri içerisinde OD₆₀₀=0.5 ulaşana kadar üretilmiştir. Üretilen kültür 50 mL'lik falkona alınarak 3500 x g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden alınan falkon içerisindeki besiyeri pipet yardımı ile pellete dokunmaksızın temizlenmiştir. Ucu kor haline getirilmiş bisturi ile kesilen 1000 μ l'lik pipet ucu yardımı ile 200 μ l TSS+DMSO çözeltisi kalan pellete eklenerek pellet nazikçe resüspanse edilmiştir. Elde edilen süspansiyon 100'er μ l olarak iki ependorfa bölünerek her iki ependorfa da 4'er μ l SLiCE ürünü eklenmiştir. Tüpler 30 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bittiğinde hücreler 42°C'de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Daha sonra her bir tüpe 900 μ l 2xYT eklenmiş ve tüpler 37°C'de 120 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda hücreler 10.000 x g'de 3 dakika santrifüj edilerek pellet çöktürülmüş ve üstte kalan besiyeri kabaca dökülmüştür. Steril bisturi ile kesilen 1000 μ l'lik pipet yardımıyla kalan besiyeri ile pelletler ayrı ayrı tekrar resüspanse edilmiş ve hazırlanan LB-OXT20 besiyerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. Ekilen plaklar 20 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiş ve oluşan koloniler toplanmıştır.

T7RNAP POZİTİF TRANSFORMANT KOLONİLERİN SEÇİLMESİ

Toplanan koloniler T7RNAP genini almış vektörlerin çoğaltılması için 2 mL'lik 20 ng/ μ l OXT içeren sıvı besiyerlerinde 37°C'de gece boyu üremeye bırakılmıştır. Bir gece üremenin ardından ependorflar 13000 x g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjden çıkan tüplerdeki besiyerleri pipet yardımı ile uzaklaştırılarak pellet 200 μ L alkalin lizis I çözeltisi ile resüspanse edilmiştir. Hemen sonrasında taze hazırlanmış 400 L alkalin lizis II ve 300 μ l alkalin lizis III çözeltisi eklenmiştir. Eklenen her çözelti

sonrasında tüpler nazikçe karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 5 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında tüpler +4°C’de 13.000 x g’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. 600 µL süpernetant DNaz, RNaz içermeyen uçlarla DNaz, RNaz içermeyen tüplere alınmış, aynı hacimde kloroform ile vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Vortekslenen tüpler 13000 x g ivme ile santrifüj edilmiş daha sonra üst faz temiz bir tüpe aktarılmış ve 1:1 oranında 2-propanol ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım içerisindeki plazmid DNA’nın çöktürülmesi amacı ile -20°C soğukta 40 dakika bekletilmiş ve ardından 13000 x g ivme ile 10 dakika santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir. Tüpteki 2-propanol pipet yardımı ile temizlenip DNA pelleti bir kez 900 µl %99 (hacim/hacim) etanol ve iki kez de 900 µl %70 (hacim/hacim) etanol ile 13000 x g ivme ile santrifüj edilerek yıkanmıştır. Daha sonra tüpler 37°C’de etüvde 30 dakika bekletilerek etanolün uzaklaştırılmıştır. Alkolden arınan pellet 30 µl RNazlı su ile çözülmüştür. Toplamda 17 koloniden 17 plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmidler orijinal pACYC184 plazmidıyla birlikte agaroz jelde görüntülenerek kıyaslanmıştır.

PET28A-GFP VE PACYC184-T7RNAP PLAZMİDLERİNİN DH5A VE HME63 HÜCRELERİNE TRANSFORMASYONU

10 ml 2xYT içeren iki falkona ayrı ayrı HME63 ve DH5α hücreleri eklenerek 37°C’de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün üremiş kültürlerden 130 µl alınarak ayrı falkonlarda 13 ml 2xYT içerisine inoküle edilmiş ve 4 saat boyunca üretilerek biyokütleleri OD₆₀₀=0.5 ulaştırılmıştır. Filtrasyon işleminden sonra +4°C’de muhafaza edilen 10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂, ve hacimce %10’ PEG 6k içeren TSS (transformation & storage solution) ‘ten 425 µl alınarak 25 µl DMSO ile karıştırılmıştır. Karışım, transformasyon protokolünde kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üretilen kültürler 50 mL’lik falkonlara alınarak 3500 x g’de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj bittiğinde falkon içerisindeki besiyeri pipet yardımı ile pellete dokunmaksızın temizlenmiştir. Ucu kor haline getirilmiş bisturi ile kesilen 1000 µl’lik pipet ucu yardımı ile 200 µl TSS+DMSO çözeltisi kalan pellete eklenerek pellet nazikçe resüspanse edilmiştir. Her bir falkon 2 eşit hacimde (100’er µl) bölünerek 4 ependorf ile devam edilmiştir. Daha önce üretilmiş, pET28a-GFP plazmidini içeren ve -80°C’de %50 gliserollü 2xYT içerisinde saklanmış BL21-GFP1.1 hücrelerinden daha önce elde edilip -80°C’de saklanan pET28a-GFP plazmidi ve bu tez çalışması gereği elde edilen pACYC184-T7RNAP plazmidi 2’şer

μ l olarak elde edilen süspansiyonlara eklenmiştir. Tüpler 30 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon bittiğinde tüpler 42°C’de 90 saniye ısı şokuna maruz bırakılmıştır. Daha sonra her bir tüpe 900 μ l 2xYT eklenmiş ve tüpler 37°C’de 120 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda hücreler 10000 x g’de 3 dakika santrifüj edilerek pellet çöktürülmüş ve üstte kalan besiyeri kabaca dökülmüştür. Ucu ısıtılmış bistüri ile kesilen 1000 μ l’lik pipet yardımıyla kalan besiyeri ile pelletler ayrı ayrı tekrar resüspanse edilmiş ve hazırlanan LB-OXT20KAN50 besiyerine yayma yöntemi ile ekilmiştir.

PET28A-GFP VE PACYC184-T7RNAP POZİTİF TRANSFORMANTLARIN KONTROLÜ VE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

Elde edilen plaklardan alınan koloniler 50 μ g/ml Kanamisin ve 20 μ g/ml Oksitetrasiklin içeren 2xYT besiyeri içerisinde üretilmiştir. Stabilizasyon sorunu yaşayan bakteriler sıvı besiyerinde üreyemediklerinden elimine edilmiş ve üreyen kültürlerden 2’şer ml örnek alınarak 0,5 mM IPTG ile indüklenmiştir. İndüklenen kültürler bir gece 37°C’de etüvde inkübe edilmiş ve ertesi gün floresan ışımaları floresan mikroskobu altında, FITC filtresi ve 40x objektif lensi ile incelenmiştir. İndüklenen kültürlerde ışımaya görülürken indüklenmeyen hücrelerde herhangi bir floresan ışıması görülmemiştir. Bu şekilde IPTG ile indüklenen T7 RNA Polimeraz mekanizması ve GFP ekspresyonunun varlığı kontrol edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda en fazla sayıda GFP eksprese edebilen bireye sahip koloniler çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçilmiştir. Fermantasyon koşullarına eklenen değişken faktörler, Terrific Broth (TB) olarak adlandırılan zengin besiyeri esas alınarak hazırlanmış baz besiyeri içerisine karıştırılmıştır. TB, karbon kaynağı olarak içerisinde 1:2 oranında tripton ve maya özütünün yanında gliserol içermektedir. Besiyeri pH’si fosfat tamponu ile 7,2 olarak ayarlanmaktadır. Bu tez çalışmasında pH düzenlemesi için 10x stok tampon çözeltisi hazırlanmıştır (Çizelge 4.15.). Seçilen koloniler bir gece 10 ml OXT20KAN50 içeren 2xYT içerisinde ayrı iki ependorfta üretilmiştir. Üretilen kültürler OD₆₀₀=1,5 olarak ölçülmüştür. Kültürlerden 1’er ml örnek alınarak 6000 x g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelletler 450 μ l 1xPBS ile resüspanse edilerek OD₆₀₀=0.04 olacak şekilde deney matrisine eklenmiştir. Her bir deney koşulu 3 tekrarla mikropilaya kuyularında başlatılmıştır.

Çizelge 4.15. 10x Tampon Çözeltisi İçerik ve Stok Konsantrasyonları

Sodyum Fosfat Tamponu pH 7,2	1000 mM
Glukoz	1000 mM
MgSO ₄	1000 mM
H ₃ BO ₃	100 mM
H ₂ O	

EN ETKİLİ FAKTÖRLERİN SEÇİLMESİ VE HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Mikroplakalarda deney matrisine uygun olarak inkübe edilen hücreler ilk 10 saat 90 dakikalık aralıklarla spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve OD₆₀₀ değerleri toplanmıştır. Son ölçümleri ise 24. saatte yapılarak GFP ekspresyon görüntülenmesi için floresan mikroskobu altında incelenmek üzere fermantasyon sona erdirilmiştir. Toplanan OD₆₀₀ değerleri üreme eğrisi oluşturmak üzere kullanılmıştır. GFP ekspresyonlarının görüntülenmesi için birbirinin tekrarı olan her 3 kuyudan 4'er µl kültür pipetlenmiş ve steril bir mikro kuyuda karıştırılmıştır. Daha sonra karıştırılan kültürden 2 µl alınarak lam ve lamel arasına damlatılmıştır. Hücreler 40x oranında büyütülerek FITC filtresi ile görüntülenmiş ve görüntüler, mikroskop entegre kamera sistemi ile fotoğraflanmıştır. Fotoğraflar yüzey yanıtları toplanmak üzere analiz edilmiştir. Faktörlerin birbiri ile ilişkisi bu analizlerle belirlenmiş ve hücreler belirlenen faktörler ile pasajlar boyunca indüklenmiştir. Analiz sonucu en düşük heterojenite ve en yüksek heterojenitenin elde edildiği koşullar not edilmiştir. Her iki suş da belirlenen iki koşulda indüklenmiştir (Çizelge 5.1.). İndüklenen pasajlar 24 saat boyunca toplam 4'er kez spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve üreme eğrisi oluşturmak üzere veriler toplanmıştır. Hücreler toplamda 4 gün pasajlanmıştır.

HÜCRELERİN MOLEKÜLER VE PROTEİN YAPILARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Pasajlanan *E. coli* DH5α ve HME63 suşları 24 saatlik inkübasyonları sonunda floresan mikroskobu ile görüntülenmiş ve GFP ekspresyonları fotoğraflanmıştır. Daha sonra toplamda 1000 µl kültür toplanmış ve 400 µl kültür DNA ekstraksiyonunda, 400 µl kültür

protein ekstraksiyonunda ve 200 µl kültür stoklamada kullanılmak üzere farklı tüplere ayrılmıştır.

4.1.1.1. HÜCRELERİN DNA PARMAK İZİNİN ÇIKARILMASI

Hücrelerin DNA ekstraksiyonu için kullanılan lizis solüsyonunda kullanılan stok bileşenler Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Başlangıç olarak her bir koşulda indüklenen hücrelerden 400 µl kültür ependorflara aktarılmıştır. İki koşulda indüklenmiş DH5α ve HME63 suşlarından toplamda 4 tüp kültür 6 k x g'de 90 sn santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki besiyerleri pipetlenerek temizlenmiştir. Her bir pellete 500'er µl lizis solüsyonu eklenmiştir. Hücreler nazıkçe karıştırılarak resüspanse edilmiş ve üstlerine 34'er µl sodyum asetat (3M) eklenmiş ve tüpler tekrar nazıkçe alt üst edilmiştir. Resüspanse olan pelletler 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 13 k x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen 500 µl'lik süpernetan 50 µl sodyum asetat, 50 µl H₂O ve 500 µl kloroform içeren yıkama solüsyonuna eklenerek vortekslenmiştir. Vortekslenen karışım bekletilmeden 4°C'de 13 k x g'de 15 dk boyunca santrifüj edilerek yıkanmıştır. Santrifüj sonunda üst faz yeni bir tüpe alınarak sodyum asetat ve kloroformlu yıkama solüsyonu ile 2 kez daha yıkanmıştır. Yıkama solüsyonu Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Yıkama sonrası elde edilen süpernetana 500 µl izopropanol eklenmiş ve karışım vortekslenerek -20 °C'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün karışım 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 13 k x g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Süpernetan toplanmış ve 300 µl %100'lük etanol ile vortekslenerek 4°C'de 13 k x g'de 10 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Santrifüj bittiğinde pellet pipet ile alkolden arındırılmış ve tüp içerisine 300 µl %70'lik etanol eklenmiştir. Etanol ile vortekslenen ependorf son kez 4°C'de 13 k x g'de 10 dk santrifüj edilerek yıkanmıştır. Alkolü uzaklaştırılan pellet 5 dk boyunca 37°C'lik etüvde ağzı açık olarak kurutulmuştur. Kuruyan pellet 20 µl 2.5 mM Tris8 ile sulandırılarak 10 dk boyunca 50 °C'lik su banyosunda çözünmüştür. Çözünen pelletler -20 °C'de saklanmıştır. Elde edilen DNA'lar spektrofotometre ile kantite edilmiştir (Şekil 4.5.). Daha sonra DNA'lar 1283 primeri kullanılarak Arbitrary PCR (AP) ile çoğaltıldıktan sonra %1,6'lık agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Çizelge 4.16.).

Çizelge 4.16. AP PCR Reaksiyonunda Kullanılan Stok ve Çalışan Malzemeler, Kullanılan Primerler ve Termal Döngü

Malzeme	Stok		Çalışan		25	µl	18	x
H ₂ O					15,68	µl	282,15	µl
dNTP (dA+dT+dG+dC)	10	mM	0,25	mM	0,625	µl	11,25	µl
Primer 1: 1247/1283	100	µM	2	µM	0,5	µl	9	µl
MgCl ₂	25	mM	3	mM	3	µl	54	µl
Tampon STD (-MgCl ₂)	10	x	1	x	2,5	µl	45	µl
Taq Polimeraz	5	u/µl	1	u	0,2	µl	3,6	µl
Kalıp DNA	20	ng/µl	50	ng	2,5	µl		

1247	AAGAGCCCGT
1283	GCGATCCCCA

4.1.1.2. HÜCRELERİN PROTEİN PARMAK İZİNİN ÇIKARILMASI

Hücrelerin protein ekstraksiyonu için kullanılan protein izolasyon solüsyonu stok bileşenler içeriği Çizelge 4.17.'de verilmiştir. Başlangıç olarak her bir koşulda indüklenen hücrelerden 400 µl kültür ependorflara aktarılmıştır. İki koşulda indüklenmiş DH5α ve HME63 suşlarından toplamda 4 tüp kültür 6 k x g'de 90 sn santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki besiyerleri pipetlenerek temizlenmiştir. Her bir pellete 230'ar µl protein izolasyon solüsyonu eklenmiştir (Çizelge 4.17.). Hücreler vortekslenerek resüspanse edilmiştir. Karışım 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 13 k x g'de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernetan yeni ependorflara aktararak -20 °C'de saklanmıştır. Elde edilen ürünler Bradford metodu ile kantite edilmiş ve 4x Laemmli yükleme tamponu (Çizelge 4.18.) ile 5 dk 95°C'de bekletilerek SDS-PAGE jelinde yürütölüp görüntülenmiştir. SDS-PAGE jellerinin içeriği Çizelge 4.19.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Protein İzolasyonu Solüsyonunu Oluşturan Stok Miktarlar

SDS	%20
NaCl	5 M
H ₂ O	

Çizelge 4.18. 4x Laemmli Yükleme Tamponu Bileşenleri Stok Konsantrasyonları

Tris-Cl pH 6,8	1 M
Gliserol	%100
SDS	%20
β-Merkaptoetanol	100%
Bromfenol Mavisi	%1
H ₂ O	

Çizelge 4.19. SDS-PAGE Jel Bileşenleri Stok Konsantrasyonları

Ayrıcı Jel		Toplayıcı Jel	
Tris-Cl pH 8.8	1 M	Tris-Cl pH 6.8	1 M
Akrilamid:Bisakrilamid (30:0.8)	%30	Akrilamid:Bisakrilamid (30:0.8)	%30
SDS	%20	SDS	%20
TEMED	%100	TEMED	%100
APS	%10	APS	%10
H ₂ O		H ₂ O	

4.2. YÖNTEM

Bu tez çalışmasında tüm cam ve plastik malzemeler steril olacak şekilde tercih edilmiştir. Kullanılan tüm pipet uçları, 50ml ve 15ml'lik falkonlar, 2ml'lik eppendorf tüpler, 0.2ml'lik PZT tüpleri steril ve tek kullanımlık olarak tercih edilmiştir. Besiyeri hazırlanması için kullanılan cam malzemeler kullanım öncesi çamaşır suyu ve Alchonox® ile yıkayıp distile su ile durulandıktan sonra otoklavlanarak steril edilmiştir. Plağa yayma ekim yönteminde kullanılan cam yayıcılar %96,6'lık etil alkolle yıkayıp ateşten geçirilerek sterilize edilmiştir. Tüm deneyler öncesi çalışma ortamı %70'lik etil alkol ile sterilize edilmiş ve tüm mikrobiyolojik çalışmalar bek alevi eşliğinde gerçekleştirilmiştir.

BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI

Bu tez çalışmasında mikrobiyal hücreler çalışılmıştır. Bu hücrelerin üretilmesi ve sonrasında saklanabilmesi için besiyeri çözeltilerinden yararlanılmıştır. Kullanılan besiyerlerinde sıvı besiyeri için TB ve 2xYT besiyerleri ve katı besiyeri için LB Agar besiyeri baz olarak alınmış ve ek olarak antibiyotik, gliserol, etanol gibi bileşenler eklenmiştir.

2xYT besiyerini hazırlamak için 250 ml toplam hacimde 4gr tripton, 2,5gr maya özütü ve 0,43 ml NaCl bulunacak şekilde tek distile suya eklendikten sonra besi yeri otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Çalışmalarda kullanılmak üzere 50 ml'lik falkonlara pay edilen 2xYT'nin kontaminasyon kontrolü tüm çalışma boyunca sağlanmıştır. Hücrelerin üremesi için gerekli Kanamisin ve Oksitetrasiklin antibiyotikleri Kanamisin 50 µg/ml ve Oksitetrasiklin 20 µg/olacak şekilde 50 ml'lik falkonlarda hazırlanmıştır. Kanamisin antibiyotiğinin stok konsantrasyonu 25 µg/ml ve Oksitetrasiklin antibiyotiğinin stok konsantrasyonu 200 µg/ml olarak kullanılmıştır.

LB gliserol stok besiyerinde 10 g/L tripton, 5 g/L maya özütü, 0.5 g/L NaCl, 0.001N NaOH kullanılmış ve %30 gliserollü tek distile suya eklendikten sonra otoklavlanarak hazırlanmıştır.

Fenotipik heterojenitenin tetiklendiği besiyeri içerisinde baz besiyeri ve tampon çözelti kullanılmıştır.

Baz besiyeri 25 ml otoklavlanmış çift distile suyun içerisinde 1,5 gr tripton ve 3 gr maya özütü çözdürüldükten sonra ateş yanında 0,2 µm şırınga filtresinden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Kullanılan tampon çözelti içerisinde kullanılmak üzere 1 M NaH₂PO₄ ve 1 M Na₂HPO₄'dan oluşan 1M sodyum fosfat tamponu (pH: 7.2) ayrı bir cam şişede hazırlanarak kullanılmıştır.

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ

Üretilen hücre fabrikalarının antibiyotik duyarlılıklarını ölçmek için Kloramfenikol, Oksitetrasiklin ve Kanamisin'e karşı dirençleri minimum inhibisyon konstanstrasyonu

(MIC) testi ile saptanmıştır. Bu test için başlangıç konsantrasyonları 200 ng/μl olarak eklenen antibiyotikler 2⁹ kez seyreltilmiştir. Her bir MIC testi 3 tekrarla toplamda 12’şer mikropkaya kuyusundan 36 kuyuda tamamlanmıştır. Tüm kuyular 100 μl 2 xYT besiyeri içermektedir. İlk iki kuyu negatif ve pozitif kontrole ayrılmıştır. Negatif ve pozitif kontrol kuyuları antibiyotik içermemektedir. Daha sonraki kuyu 200 ng/μl antibiyotik içermektedir. 4. kuyu içerisine 100 ng/μl antibiyotik eklendikten sonra diğer kuyulara seri dilüsyon yöntemi ile 100’er μl antibiyotikli besiyeri 4. kuyudan pipetajla aktarılmıştır. Aktarım sırasında pipet ucu değiştirilmemiştir. Son kuyuda 100 μl besiyeri pipetajdan sonra atılmıştır. Böylece tüm kuyular 100’er μl besiyeri içermiştir. MIC testi sonunda minimum inhibisyon konsantrasyonları Kloramfenikol için 32 ng/μl, Kanamisin için, 50 ng/μl ve Oksitetrasiklin için 20 ng/μl olarak belirlenmiştir.

GÖRÜNTÜ ANALİZİ

Elde edilen floresan mikroskop altındaki fotoğrafların analizi için ImageJ programı ve Computer Vision 2 yazılım geliştirme kütüphanesi ile Python dili kullanılarak “Jupyter Lab” programı kullanılmıştır. Bu sayede RGB değerleri HSV değerlerine dönüştürülmüş ve HSV analizi gerçekleştirilmiştir. Analizlerde RGB ve HSV değerleri elde edildikten sonra saturation-hue, saturation-value ve hue-value 2D histogram grafikleri oluşturularak piksel dağılımı ve yoğunlukları incelenmiştir. Analizin daha sağlıklı gerçekleşebilmesi için “background subtraction” (arkaplan çıkartma) yapılarak görüntülerdeki arkaplan gürültüsü elimine edilmiştir.

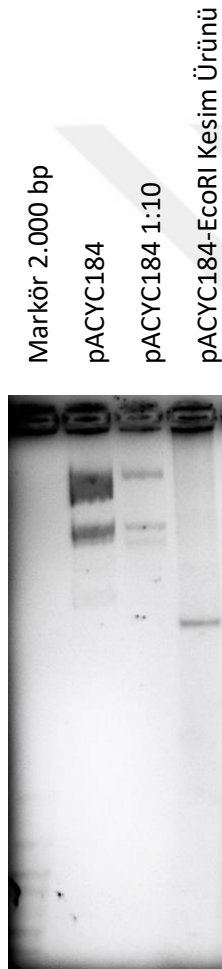
RASTGELE ÇOĞALTILMIŞ POLİMORFİK DNA ANALİZİ (AP-PCR)

İzole edilen DNA’lar rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA PZT metodu ile 1283 primeri kullanılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen bant profilleri arasındaki değişimler ile suşlar arasındaki adaptasyon hızı karşılaştırılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. PACYC184-ECORI KESİM ÜRÜNÜ AGAROZ JEL GÖRÜNTÜSÜ

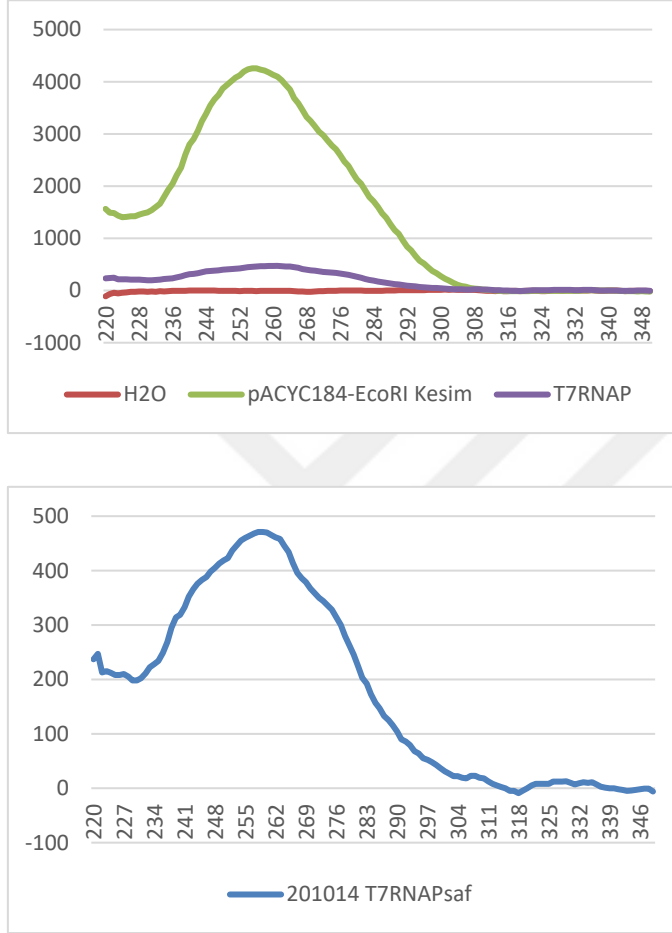
T7RNAP geninin pACYC184 vektör plazmidine aktarılabilmesi için plazmid EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim ürünü kesilmemiş plazmid ile kontrol edilerek %1,6'lık agaroz jelde 80 V akımla yürütülmüş ve görüntülenmiştir. Elde edilen ürünün 4245 bp uzunluğunda olduğu 2000 bp içeren DNA markörü ile kontrol edilmiştir (Şekil 5.1.).



Şekil 5.1. Saflaştırılmış pACYC184 plazmid vektörü, 1:10 seyreltilmiş saf pACYC184 plazmid vektörü ve pACYC184-EcoRI kesim ürünü agaroz jel görüntüsü

5.2. PACYC184-ECORI KESİM ÜRÜNÜ VE T7 RNA POLİMERAZ PZT ÜRÜNÜ SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZİ

Ürünler spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve vekör plazmid olan pACYC184 kesim ürünü saflık oranı A260/280 1,94 ve A260/230 2,76 olarak ölçülmüştür. Klonlanacak T7RNAP PZT ürünü saflığı ise A260/280 1,8 ve A260/230 2,38 olarak ölçülmüştür. (Şekil 5.2.).

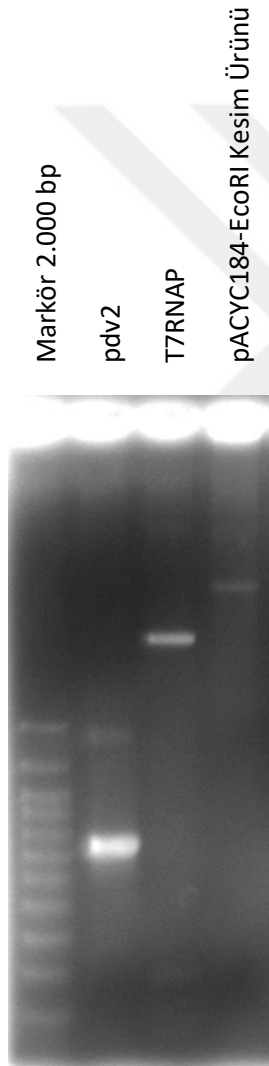


Örnek	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	340 raw
H2O	-0.21	-4	0	28.00	0.19	-11
pACYC184EcoRIKesimsaf	206.65	4133	2129	1.94	2.76	10
201014 T7RNAPsaf	23.54	471	262	1.80	2.38	21

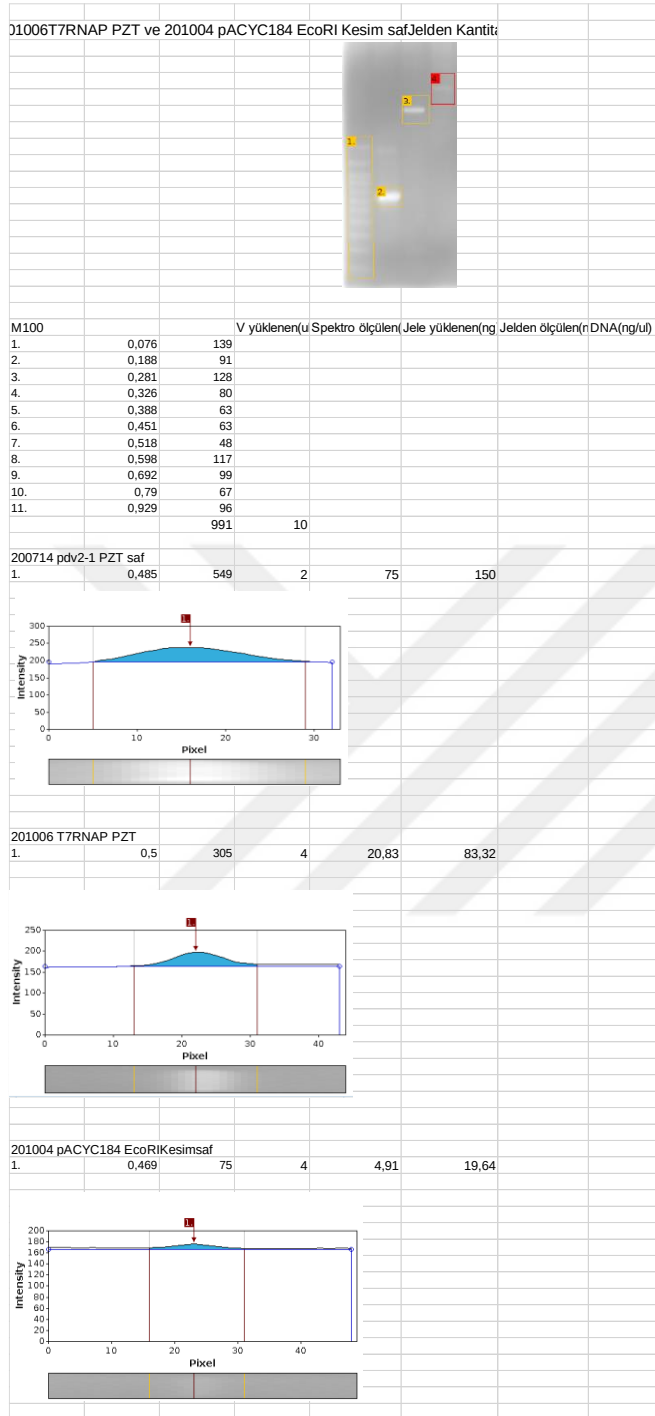
Şekil 5.2. Saflaştırılmış pACYC184-EcoRI kesim ürünü ve T7RNAP PZT ürünü spektrofotometrik analiz sonucu

5.3. T7 RNA POLİMERAZ GENİ PZT ÜRÜNÜ VE PACYCY184-ECORI KESİM ÜRÜNÜ AGAROZ JEL GÖRÜNTÜSÜ

Moleküler klonlama metotlarında vektör ve insert oranı kritik önem taşımaktadır. Bu oranın belirlenmesi için ürünlerin kantite edilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, çoğaltılan T7RNAP gen bölgesi ve kesilip saflaştırılmış plazmid vektörünün kantitasyon analizinin yapılması amacı ile ürünler %1,6'lık agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.3.). Jelden kantitasyon metotunda referans kantitasyon olarak önceden kantitasyonu yapılmış pdv2 PZT ürünü kullanılmıştır (Şekil 5.4.).



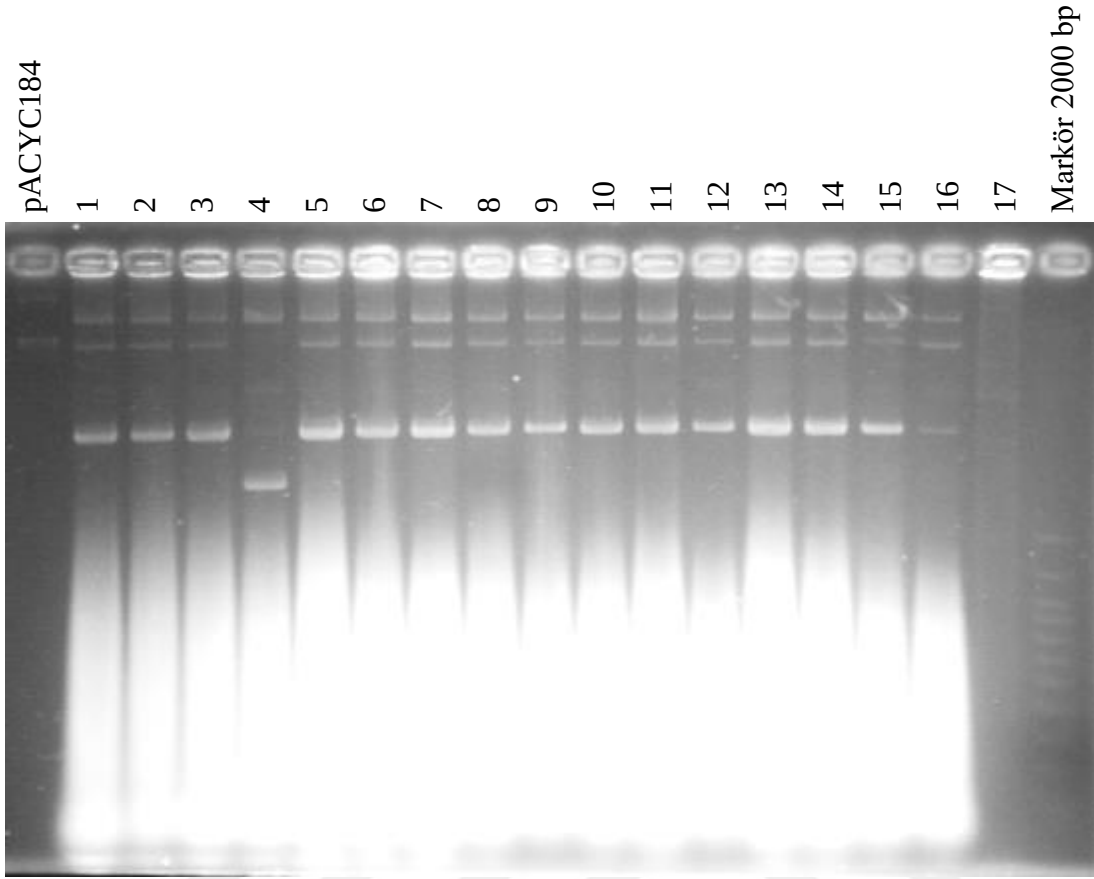
Şekil 5.3. T7 RNA Polimeraz geni PZT ürünü ve pACYC184-EcoRI kesim ürünü kantitasyonu agaroz jel görüntüsü



Şekil 5.4. pACYC184-EcoRI Kesim Ürünü ve T7RNAP PZT Ürünü Jelden Kantitasyon

5.4. ESCHERİCHİA COLİ / DH5A TRANSFORMANT HÜCRELERİNDEN PLAZMİD İZOLASYONU AGAROZ JEL GÖRÜNTÜSÜ

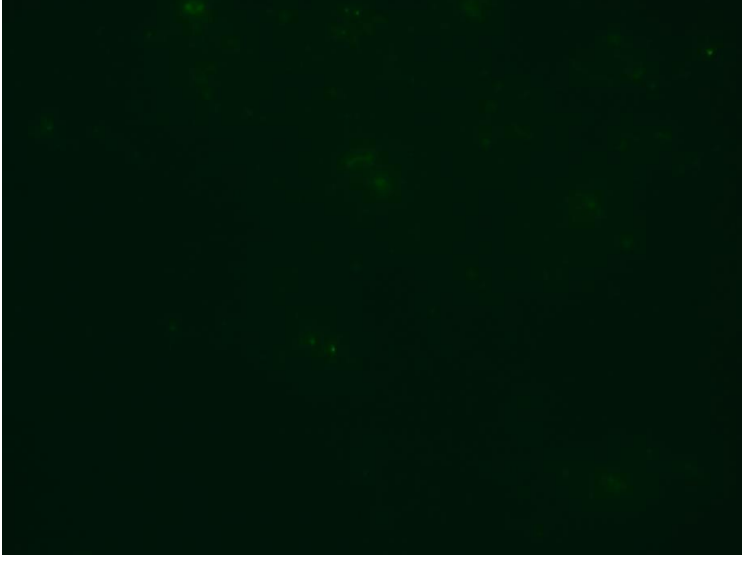
Düşük kopya sayılı pACYC184 plazmid vektörü ile klonlamadan elde edilen 17 koloniden plazmid izolasyonu yapılmış ve pET28a-GFP plazmidi ile DH5α hücrelerine transforme edilmiştir. Mekanizmanın kontrolü için 20 ng/μl Oksitetrasiklin ve 50 ng/μl Kanamisin içeren sıvı besiyerlerinde 2 mL toplam hacim ile 2'şer falkonda üretilerek 1'er falkon kültür 0,5 mM IPTG ile indüklenmiştir. İndükemenin ardından indüklenen ve indüklenmeyen kültürler 20. Saatte floresan mikroskobu altında FITC filtresi ile karşılaştırılmış ve GFP ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. Yalnız 4 numaralı transformantın IPTG ile indüklenerek GFP ekspresyonu gerçekleştirdiği görülmüş ve diğer transformantlarla arasındaki farkın gözlemlenebilmesi için plazmid izolasyonu yapılarak %1,6'lık agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 5.5.). Çalışmanın sonraki aşamalarında 4 numaralı plazmid kullanılmıştır.



Şekil 5.5. GFP ve T7RNAP geni içeren DH5 α hücre transformantlarından izole edilen plazmidler

5.5. DH5A HÜCRELERİNDE İNDÜKLENEN GFP EKSPRESYONU

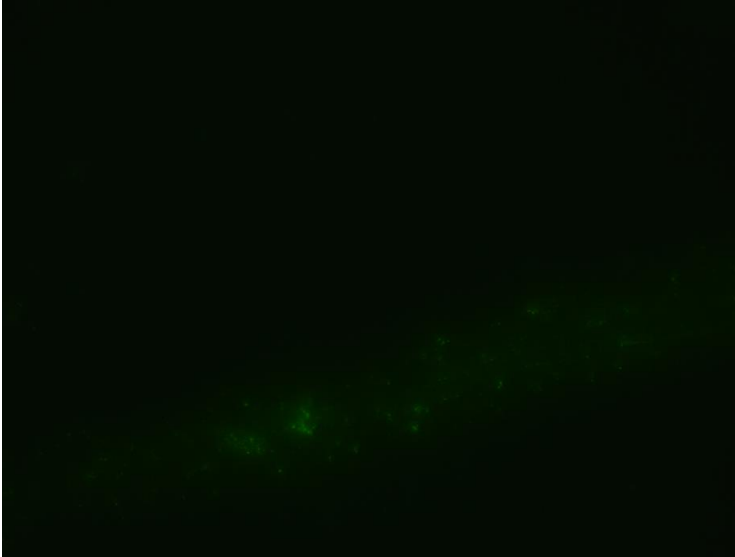
DH5 α suşu içerisine önce pET28a-GFP plazmidinin sonra pACYCY184-T7RNAP plazmidi transforme edilmiştir. Elde edilen koloniler 0,5 mM IPTG ile indüklendikten 20 saat sonra, mikroskop altında FITC filtresi ile 40 x büyütürak fotoğraflanmıştır. Aralarından en fazla GFP eksprese eden hücreye sahip olan DH-GP1 kolonisi seçilmiştir.



Şekil 5.6. GFP ve T7RNAP geni içeren DH-GP1 hücrelerinin floresan mikroskobu altında FITC filtresi ile 40 x büyütülerek çekilmiş fotoğrafı

5.6. HME63 HÜCRELERİNDE İNDÜKLENEN GFP EKSPRESYONU

HME63 suşuna önce pET28a-GFP plazmidinin sonra pACYCY184-T7RNAP plazmidi kotransforme edilmiştir. Elde edilen koloniler 0,5 mM IPTG ile indüklendikten 20 saat sonra, mikroskop altında FITC filtresi ile 40 x büyütülerek fotoğraflanmıştır. Aralarından en fazla GFP eksprese eden hücreye sahip olan HM-GP1 kolonisi seçilmiştir (Şekil 5.7.).



Şekil 5.7. GFP ve T7RNAP geni içeren HM-GP1 hücrelerinin floresan mikroskobu altında FITC filtresi ile 40 x büyütülerek çekilmiş fotoğrafı

5.7. GFP ÜRETİMİ VE ANALİZİ

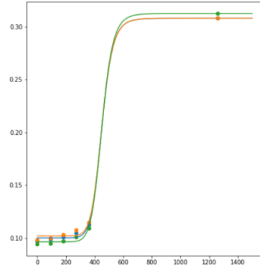
ÜREME EĞRİSİ

Deney matrisine göre indüklenen hücreler başlangıçtan itibaren ilk 10 saat 90 dakika arayla ölçülmüş ve son 25. Saatte alınarak sonlandırılmıştır. Birbirinin tekrarı olan her üç kuyudan elde edilen OD₆₀₀ ölçümlerinin ortalaması alınarak üreme eğrileri oluşturulmuştur. Tüm sıvı kültür üretimleri OD₆₀₀ 0.04 ile başlatılmıştır.

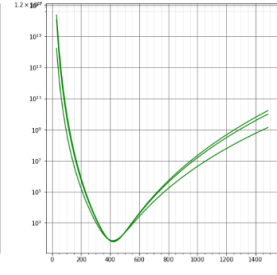
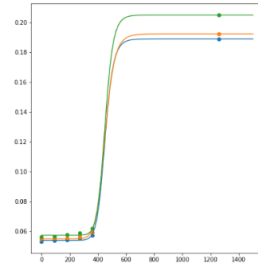
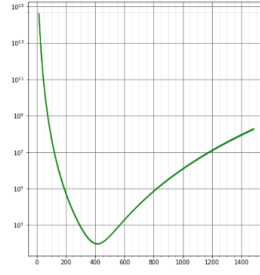
Escherichia coli BL21

Üretilen deney matrisinin uygunluğu pET28a-GFP plazmidi içeren, GFP eksprese edebilen *E.coli* BL21 hücrelerinde test edilmiştir. Hücrelerin indüklendiği deney matrisi EK 1’de verilmiştir. Elde edilen örnek üreme eğrileri Şekil 5.8.’de verilmiştir.

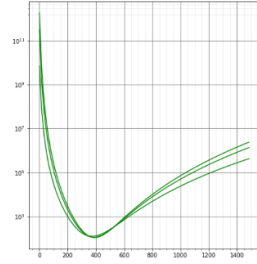
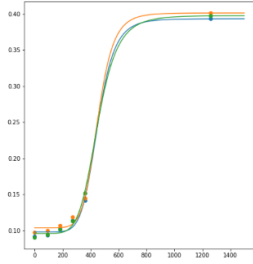
Deney Matrisi C1



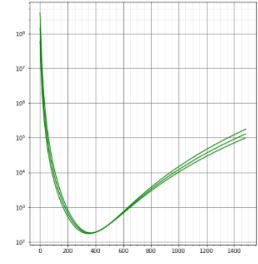
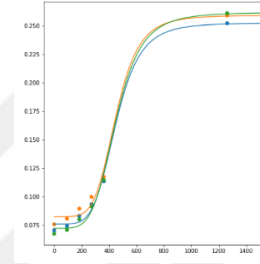
Deney Matrisi C4



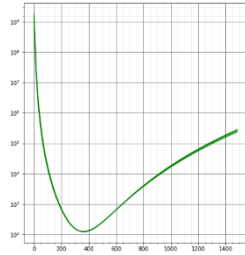
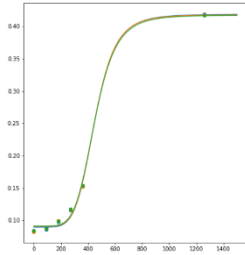
Deney Matrisi C17



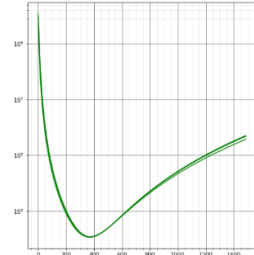
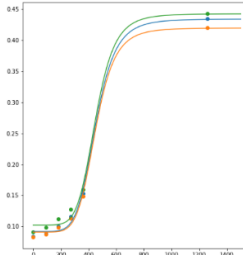
Deney Matrisi S1



Deney Matrisi S7



Deney Matrisi S9

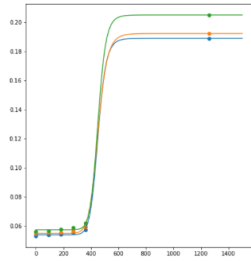


Şekil 5.8. Deney matrisine uygun indüklenmiş GFP eksprese edebilen BL21 hücrelerinden elde edilen örnek üreme eğrileri

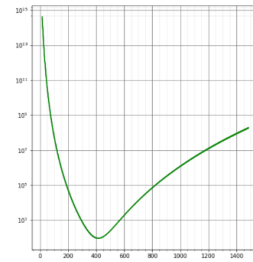
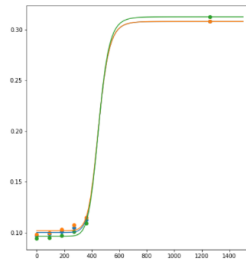
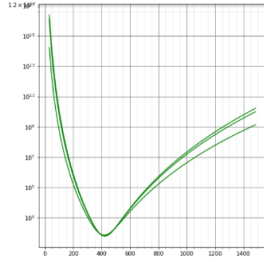
DH-GP1

Uygulanabilirliği doğrulanan deney matrisine 20 ng/μl Oksitetrasiklin ve 50 ng/μl Kanamisin eklenerek DH-GP1 hücreleri bu matris ile indüklenmiştir (EK 2). İndüklenen hücrelerden elde edilen örnek üreme eğrileri Şekil 5.9.'da verilmiştir.

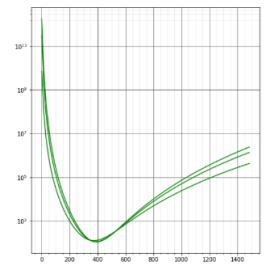
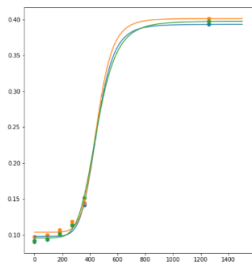
Deney Matrisi C1



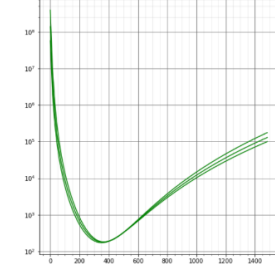
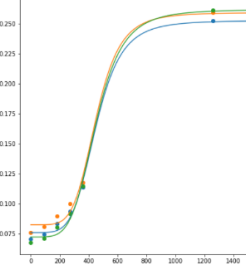
Deney Matrisi C4



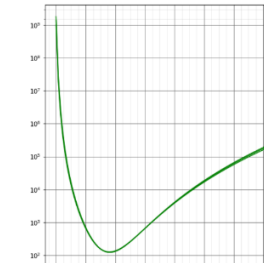
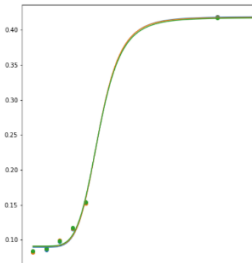
Deney Matrisi C17



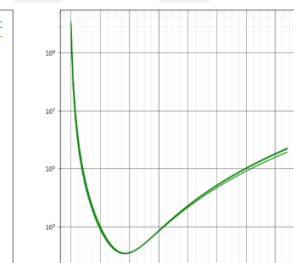
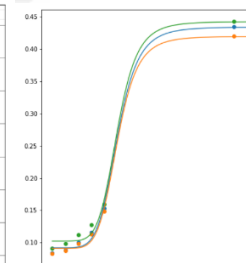
Deney Matrisi S1



Deney Matrisi S7



Deney Matrisi S9

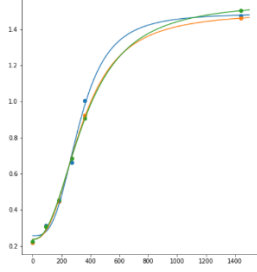


Şekil 5.9. Deney matrisine uygun indüklenmiş DH-GP1 hücrelerinden elde edilen örnek üreme eğrileri

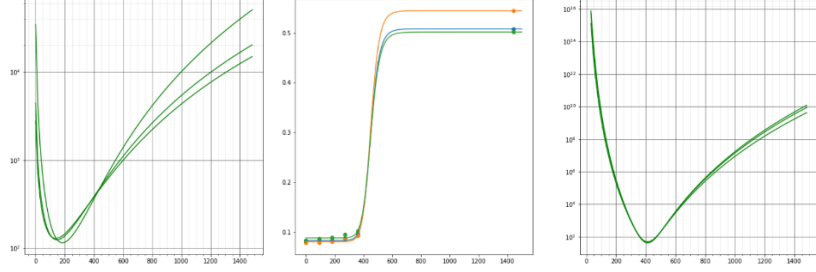
HM-GP1

Deney matrisine 20 ng/μl Oksitetrasiklin ve 50 ng/μl Kanamisin eklenerek HM-GP1 hücreleri bu matris ile indüklenmiştir (EK 2). İndüklenen hücrelerden elde edilen örnek üreme eğrileri Şekil 5.10.'da verilmiştir.

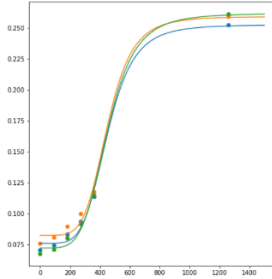
Deney Matrisi C1



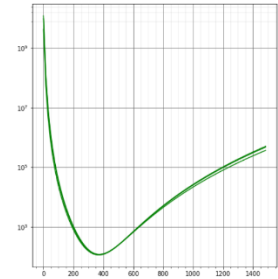
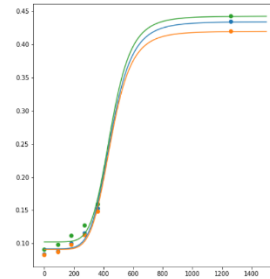
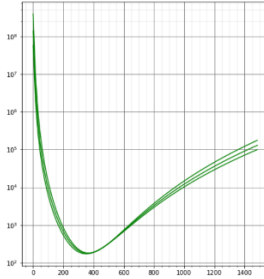
Deney Matrisi C4



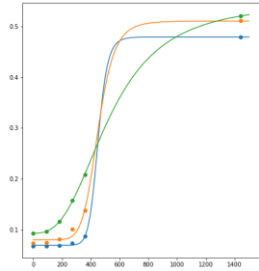
Deney Matrisi C17



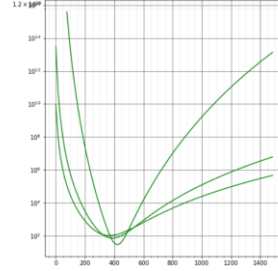
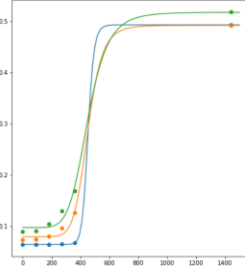
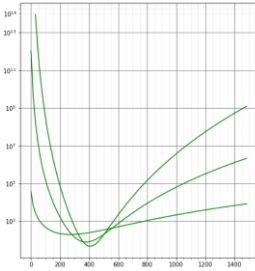
Deney Matrisi S1



Deney Matrisi S7



Deney Matrisi S9



Şekil 5.10. Deney matrisine uygun indüklenmiş HM-GP1 hücrelerinden elde edilen örnek üreme eğrileri

HÜCRELERİN GÖRÜNTÜLENMESİ VE GÖRÜNTÜ ANALİZİ

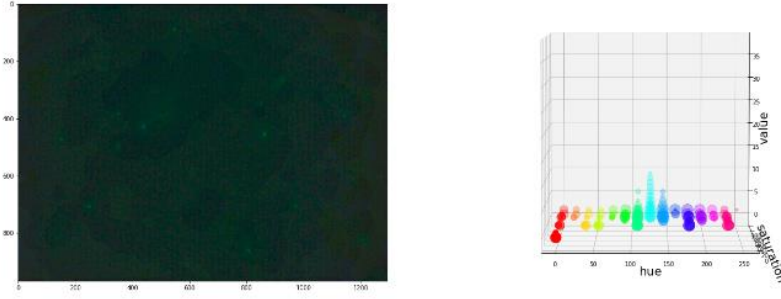
HSV (Hue Saturation Value) Analizi

Python programlama dili kullanılarak yazılan kod ile mikroskop görüntülerinin HSV piksel analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen analizler sonucunda hue, saturation ve value değerleri için histogramlar oluşturulmuştur. Oluşturulan histogramlar her deney seti için, Earth Mover's Distance yöntemi ile karşılaştırılarak indüklenen hücrelerin birbirine uzaklığı incelenmiştir. Her bir analiz DH-GP1 ve HM-GP1 hücreleri için kendi alt başlıklarında gösterilmiştir (Şekil 5.11.) (Şekil 5.12.) (Şekil 5.13.) (Şekil 5.14.).

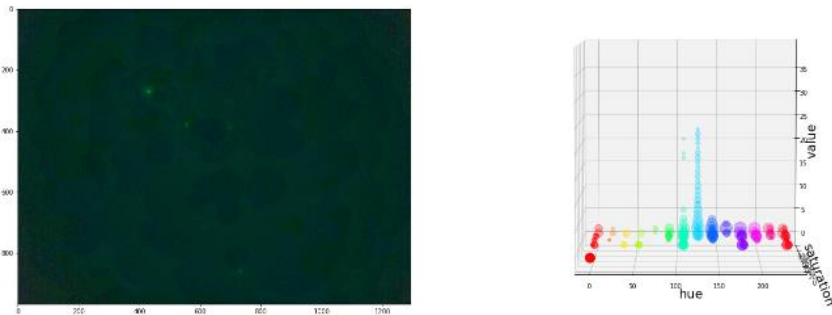
DH-GP1

Deney matrisine göre indüklenen DH-GP1 hücreler 25. saatte sonlandırılmış ve birbirinin tekrarı olan her üç kuyudan 4'er µl kültür alınarak karıştırıldıktan sonra karışımdan 2 µl lam ve lamel arasına damlatılarak floresan mikroskobu altında 40 x büyütülerek FITC filtresi ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler yazılan kod ile analiz edilerek HSV verileri elde edilmiştir. Bu verilerden bazıları örnek olarak Şekil 5.11. ve Şekil 5.12.'de verilmiştir.

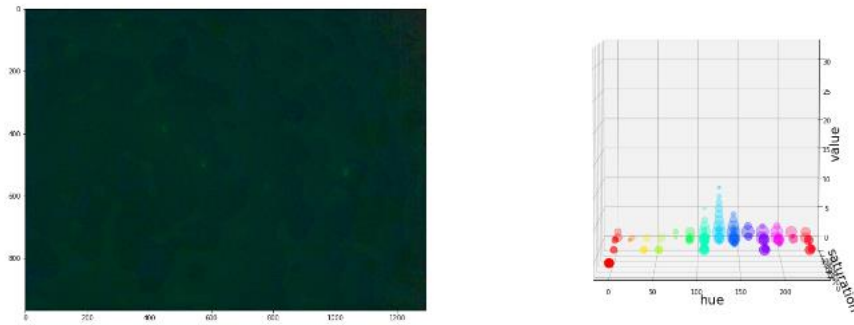
Deney Matrisi C1



Deney Matrisi C4

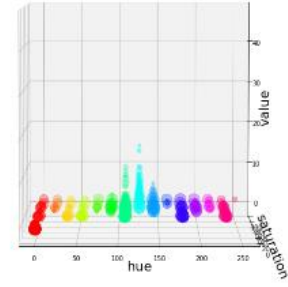
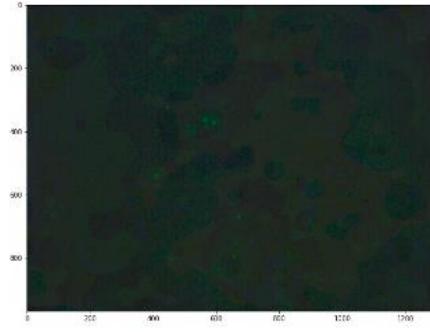


Deney Matrisi C17

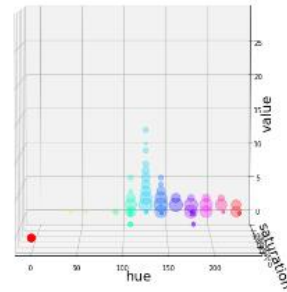
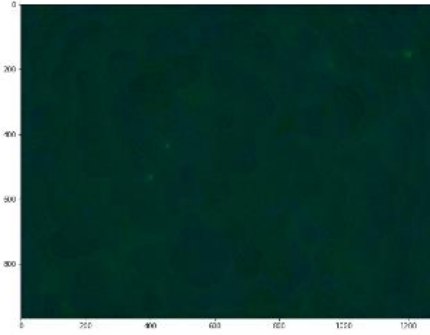


Şekil 5.11. Deney matrisine indüklenen DH-GP1 hücrelerinin GFP ekspresyon HSV analiz örnek sonuçları

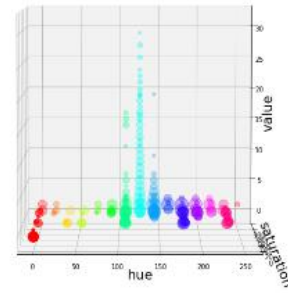
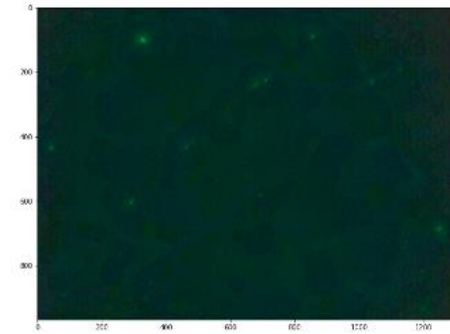
Deney Matrisi S1



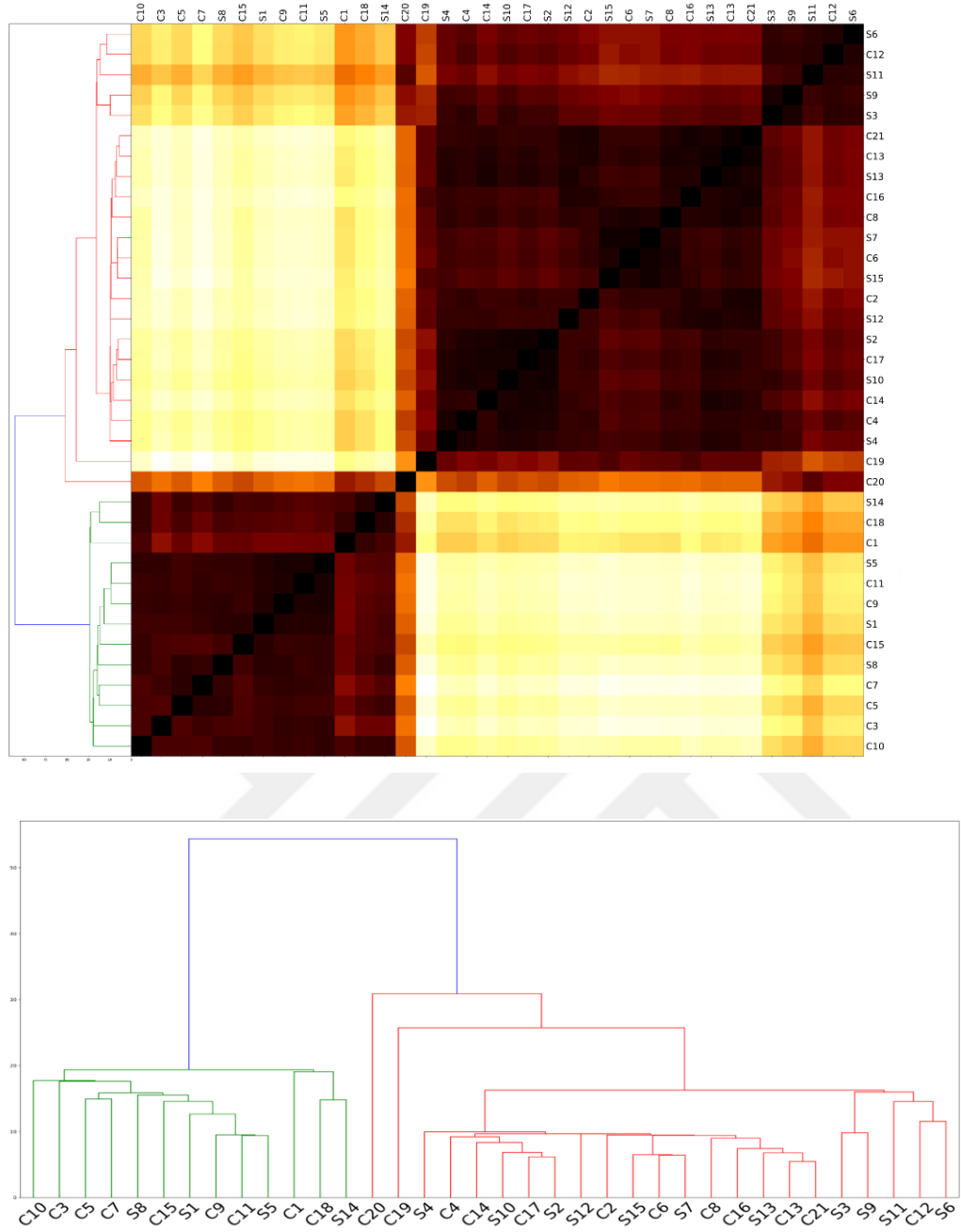
Deney Matrisi S7



Deney Matrisi S9



Şekil 5.12. Deney matrisine indüklenen DH-GP1 hücrelerinin GFP ekspresyon HSV analiz örnek sonuçları



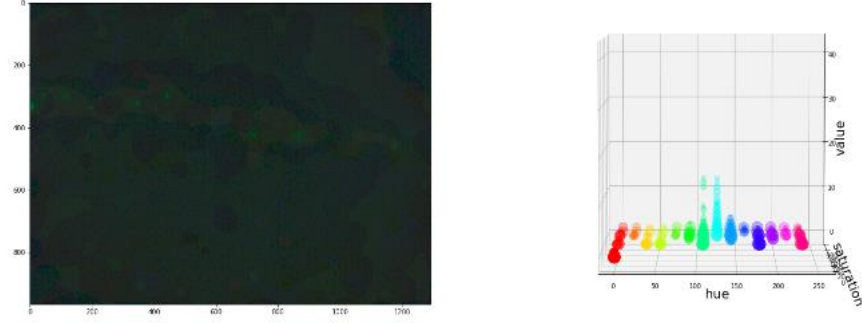
Şekil 5.13. Deney matrisine uygun olarak indüklenen DH-GP1 hücrelerine ait 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası ve dendogramı

HM-GP1

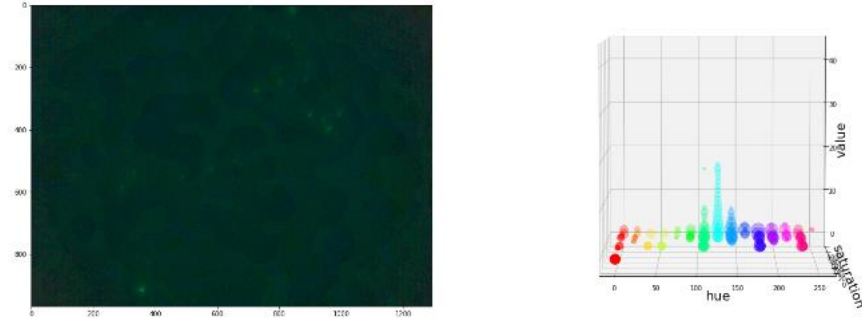
Deney matrisine göre indüklenen HM-GP1 hücreleri 25. saatte sonlandırılmış ve birbirinin tekrarı olan her üç kuyudan 4'er μ l kültür alınarak karıştırıldıktan sonra karışımdan 2 μ l lam ve lamel arasına damlatılarak floresan mikroskobu altında 40 x büyütülerek FITC filtresi ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler yazılan kod ile analiz edilerek HSV

verileri elde edilmiştir. Bu verilerden bazıları örnek olarak Şekil 5.14. ve Şekil 5.15.'de verilmiştir.

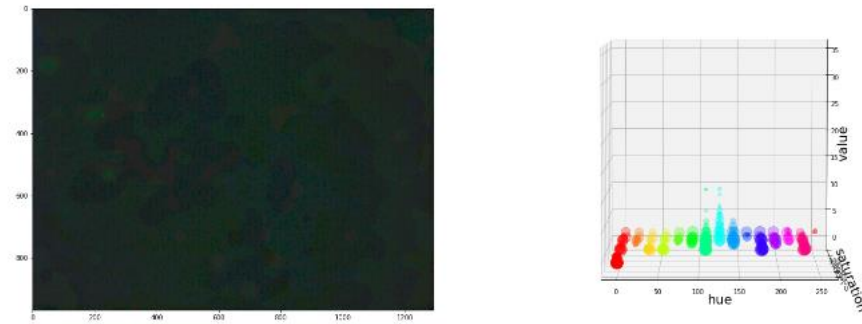
Deney Matrisi C1



Deney Matrisi C4

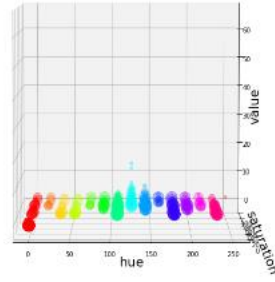
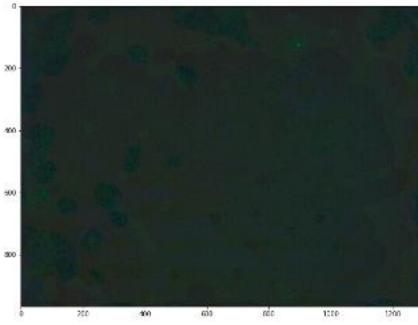


Deney Matrisi C17

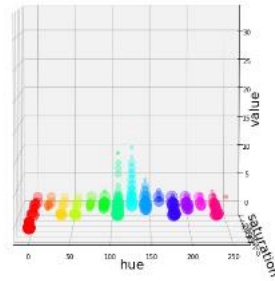
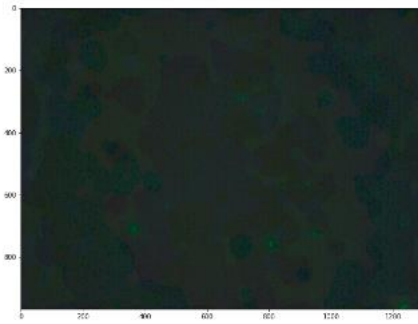


Şekil 5.14. Deney matrisine indüklenen HM-GP1 hücrelerinin GFP ekspresyon HSV analiz örnek sonuçları

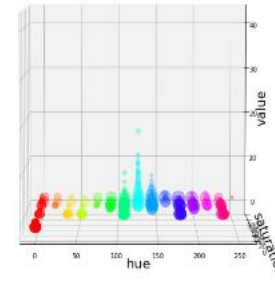
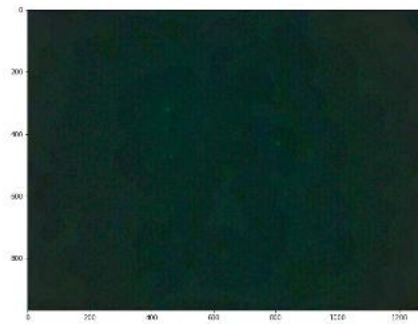
Deney Matrisi S1



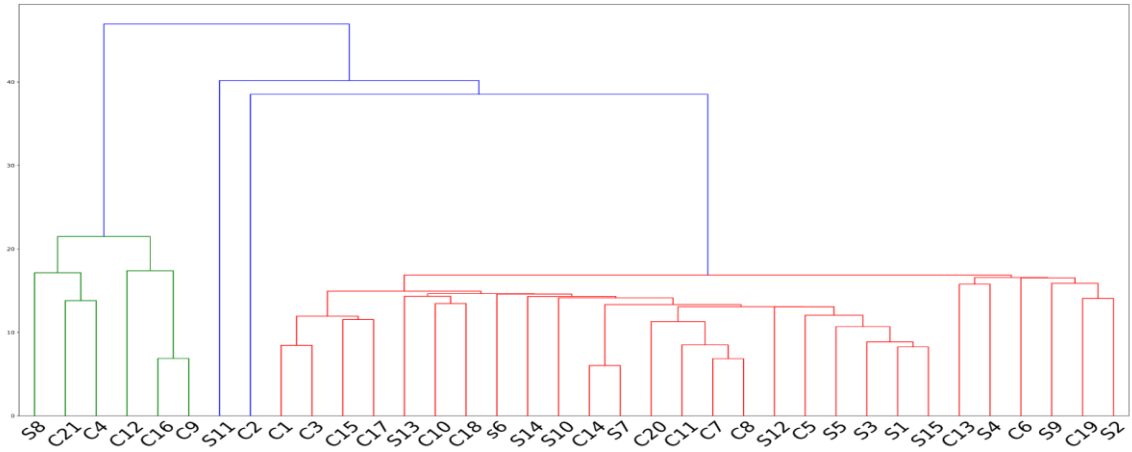
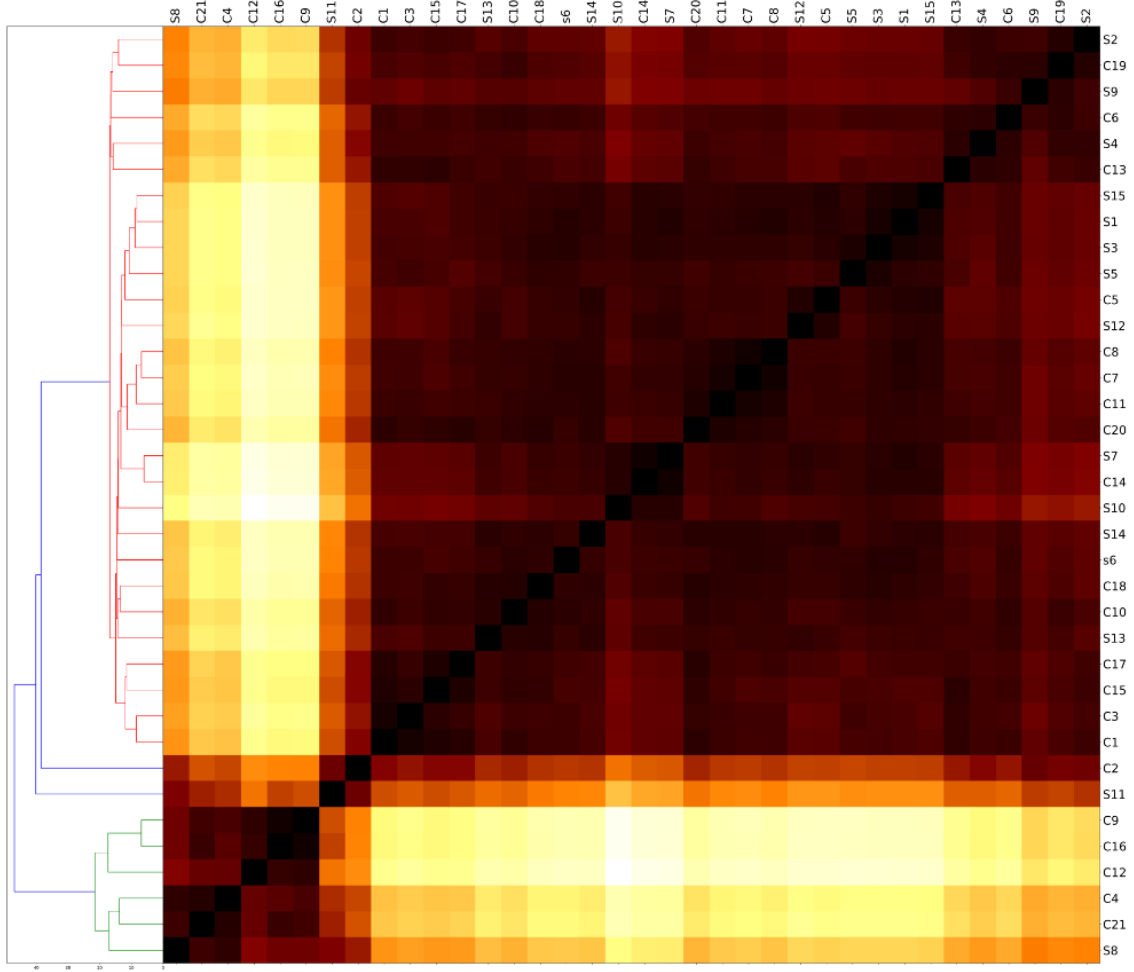
Deney Matrisi S7



Deney Matrisi S9



Şekil 5.15. Deney matrisine indüklenen HM-GP1 hücrelerinin GFP ekspresyon HSV analiz örnek sonuçları

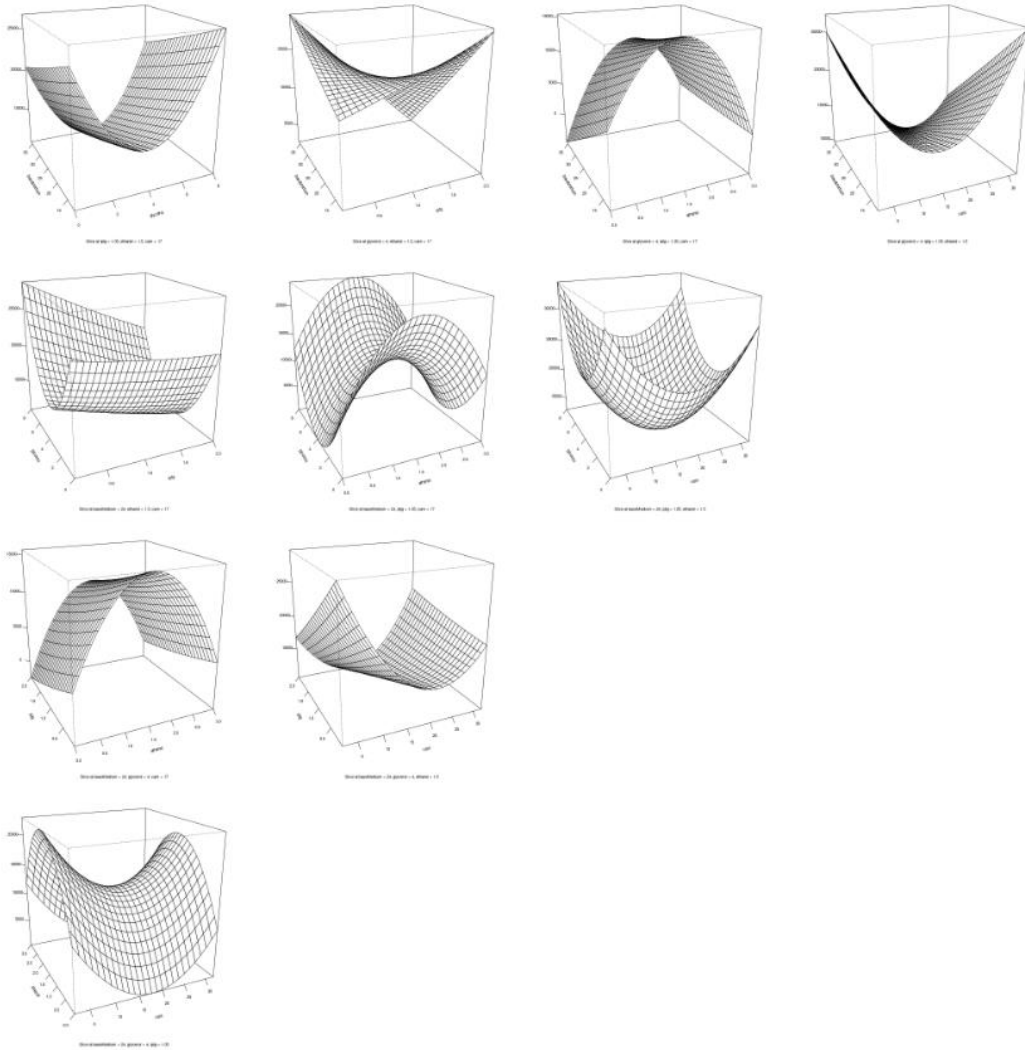


Şekil 5.16. Deney matrisine uygun olarak indüklenen HM-GP1 hücrelerine ait 2D histogramların birbirlerine uzaklıklarını gösteren ısı haritası ve dendogramı

DENEY KOŞULLARINA EN ETKİLİ FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

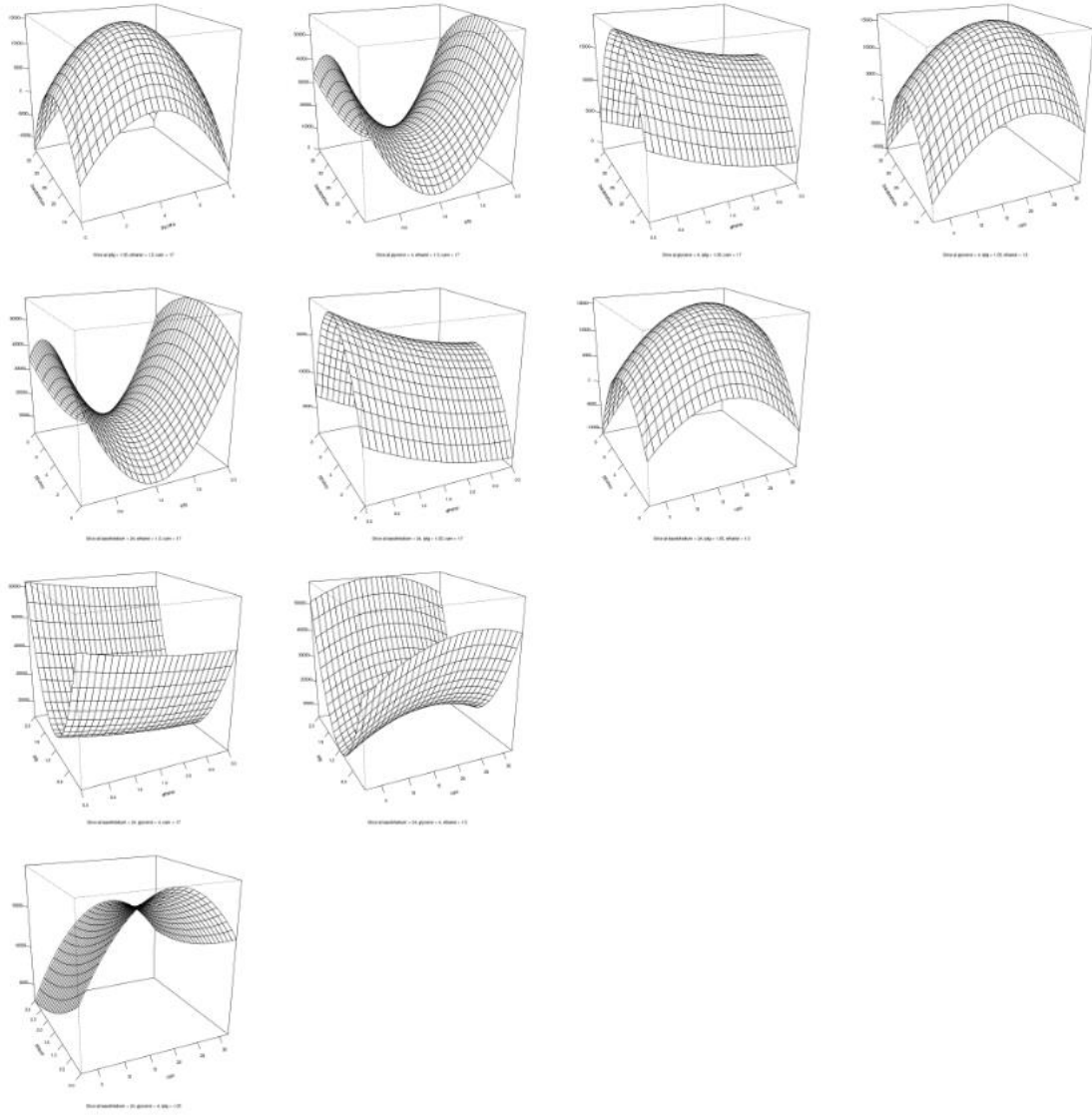
Elde edilen veriler sonucunda faktörlerin DH-GP1 ve HM-GP1 hücrelerinde meydana getirdiği yüzey yanıtları toplanmış ve faktörlerin birbiri ile olan ilişkileri analiz edilmiştir. Yüzey yanıtları değerlendirilerek fenotipik heterojenitenin en yüksek ve en düşük olduğu iki koşul belirlenmiş ve hücreler bu koşullarda 4 kez pasajlanmışlardır. Yüzey yanıtları Şekil 5.15. ve Şekil 5.16.'da gösterilmiştir. Bu yanıtlar incelendiğinde en yüksek fenotipik heterojenitenin elde edildiği koşullar ve en düşük fenotipik heterojenitenin elde edildiği koşullar Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

DH-GP1



Şekil 5.17. DH-GP1 hücrelerinden elde edilen yanıt yüzeyleri

HM-GP1



Şekil 5.18. HM-GP1 hücrelerinden elde edilen yanıt yüzeyleri

Çizelge 5.1. En Yüksek Fenotipik Heterojenite Ve En Düşük Fenotipik Heterojenitenin Gözlemlendiği Koşullar

	En yüksek fenotipik heterojenite koşulu (Koşul 1)	En düşük fenotipik heterojenite koşulu (Koşul 2)
İçerik	Miktar	Miktar
Baz Besiyeri	24 g/L	36 g/L
Gliserol	%4	0
Kloramfenikol	1,7 µg/mL	0,2 µg/mL
Etanol	%3	1,5
IPTG	2,0	1,0
Oksitetrasiklin	20 ng/µl	20 ng/µl
Kanamisin	50 ng/µl	50 ng/µl
Tampon Çözeltisi	1 x	1 x

5.8. HÜCRELERİN PASAJLANMASI

En etkili faktörler ile en yüksek ve en düşük heterojenite göstermeleri üzerine indüklenen hücreler 4 gün boyunca pasajlanmıştır (Çizelge 5.1.). Her pasajlama ardından ilk OD₆₀₀ ölçümü 0 noktasında ve sonraki ölçümler 1. saat, 2. saat, 5.saat ve 24. saatlerde yapılmıştır. Her bir pasaj, ölçümleri sonlandığında 200 µl hacminde kültür stoklanırken kalan kültürlerden DNA ve protein izolasyonları yapılmıştır. İzole ve kantite edilen DNA'lar AP-PCR metodunda kullanılırken proteinler SDS-PAGE jelinde görüntülenmiştir. Böylece pasajlar arasındaki genomik ve proteomik profiller karşılaştırılarak hücrelerin adaptasyon hızları yorumlanmıştır.

ÜREME EĞRİSİ

Pasajlarda kullanılan hücrelerin adlandırılması Çizelge 5.2.'de verilmiştir. İlk pasaj OD₆₀₀ 0.04 ile başlatılmıştır. 1. saat, 2. saat, 5.saat ve 24. Saatlerde OD₆₀₀ ölçümleri gerçekleştirilmiş ve bu verilerden üreme eğrisi elde edilmiştir (Şekil 5.17.).

Çizelge 5.2. Üreme Koşulları ve Pasajlanan Hücre Adları

DH-GP1, Koşul 1	D1
DH-GP1, Koşul 2	D2
HM-GP1, Koşul 1	H1
HM-GP1, Koşul 2	H2

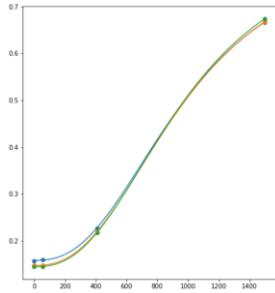
ISI HARİTASI VE DENDOGRAM

DH-GP1

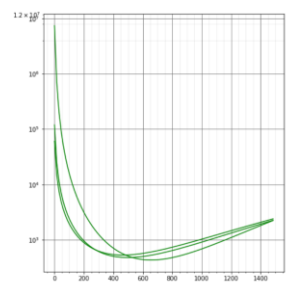
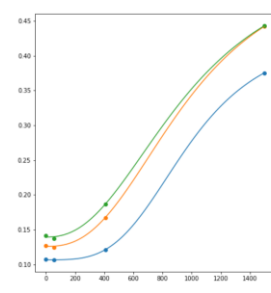
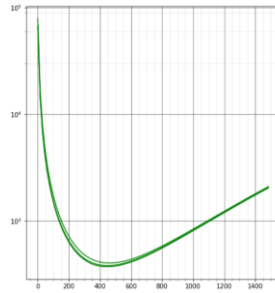
Pasajlanan DP-GP1 hücrelerinden alınan GFP ekspresyon görüntüleri ham verileri Ek 6'da verilmiştir. İşlenmiş üreme eğirleri Şekil 5.17.'de verilmiştir. 4 gün boyunca pasajlanan hücreler arasındaki ilişki ısı haritası ve dendogram çıkartılarak incelenmiştir (Şekil 5.18.).

Pasaj 1

D1

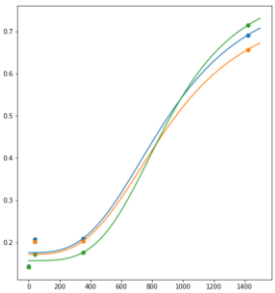


D2

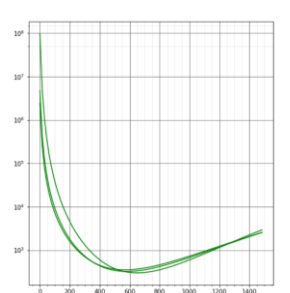
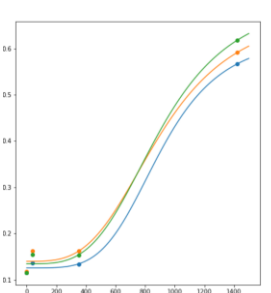
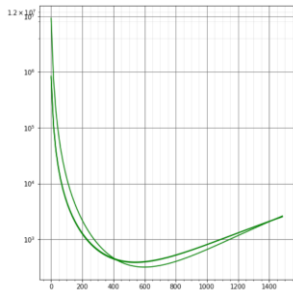


Pasaj 2

D1

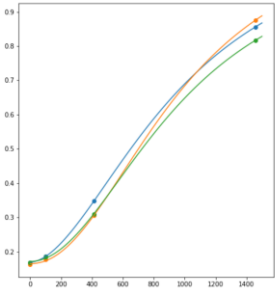


D2

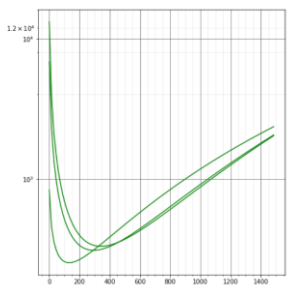
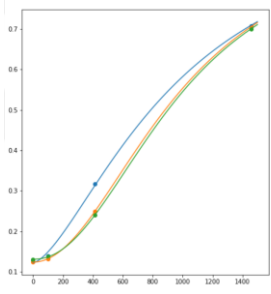
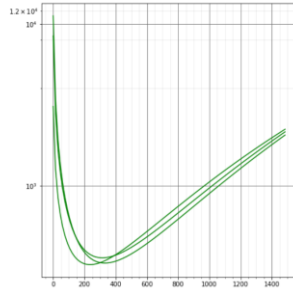


Pasaj 3

D1

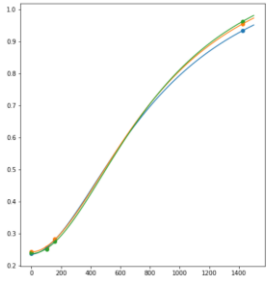


D2

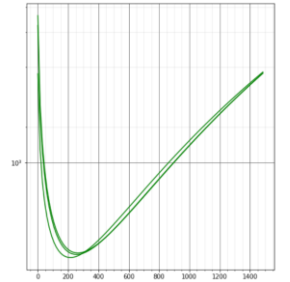
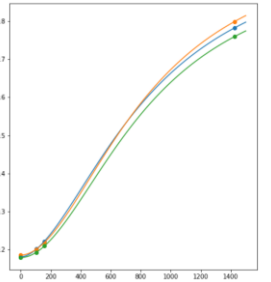
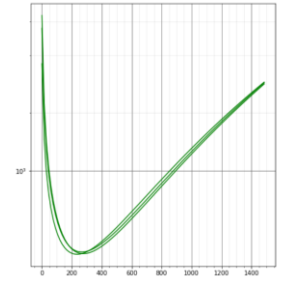


Pasaj 4

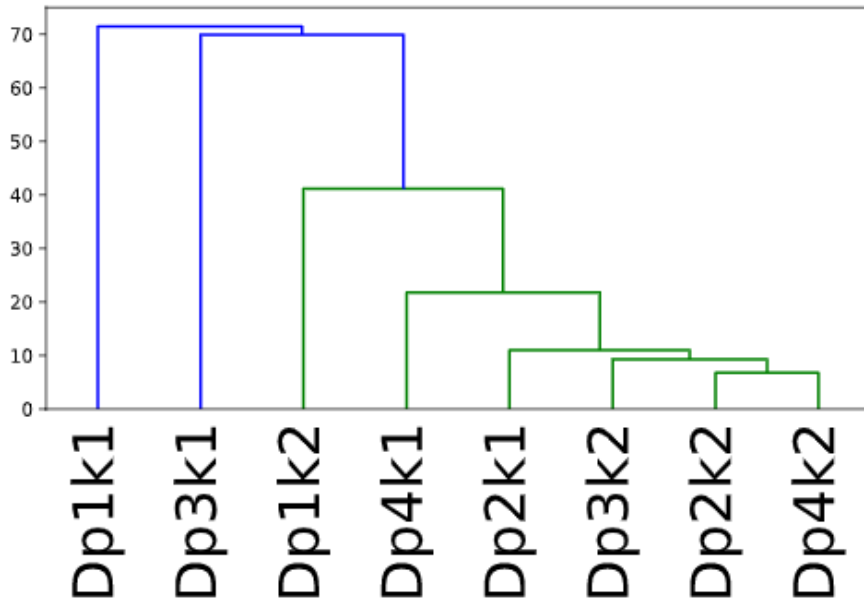
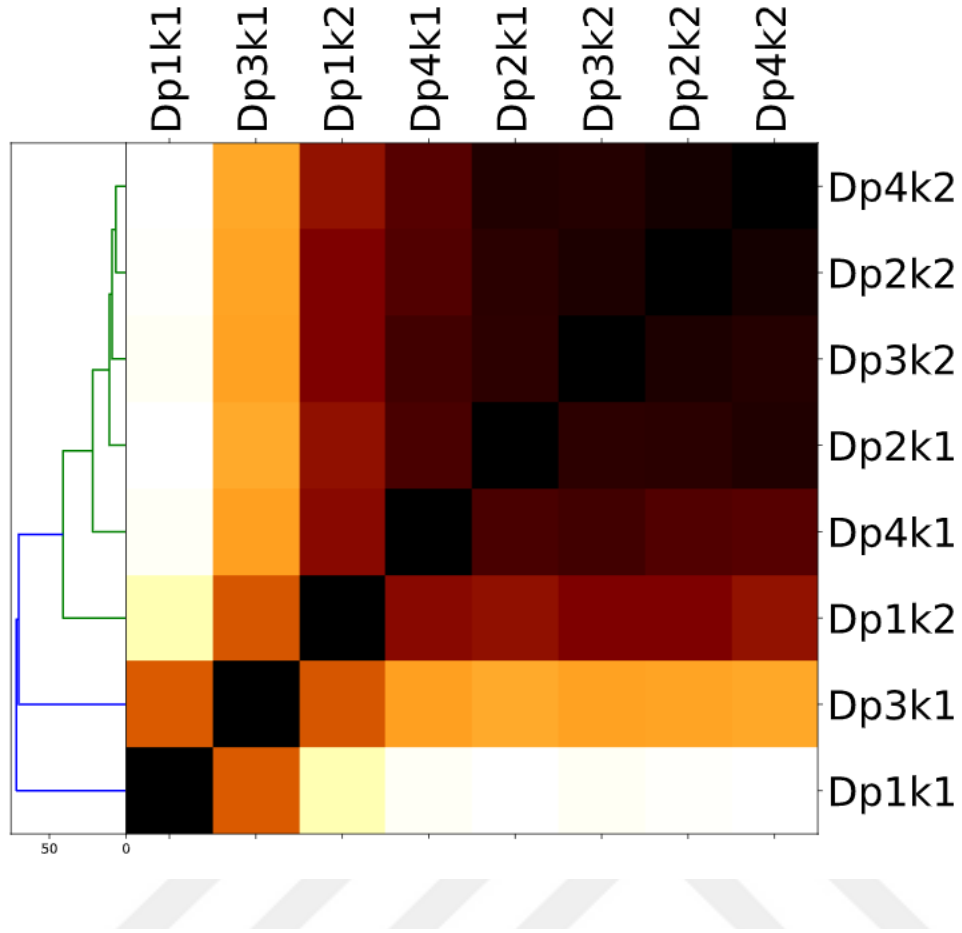
D1



D2



Şekil 5.19. Pasajlanan D1 ve D2 hücrelerinde üreme eğrisi değişimi



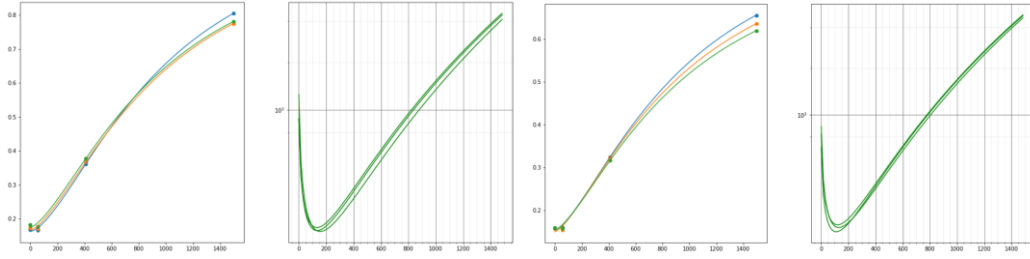
Şekil 5.20. DP-GP1 hücre pasajları arasındaki ilişki

HM-GP1

Pasajlanan HM-GP1 hücrelerinden alınan GFP ekspresyon görüntüleri ham verileri Ek 6'da verilmiştir. İşlenmiş üreme eğirleri Şekil 5.19.'de verilmiştir. 4 gün boyunca pasajlanan hücreler arasındaki ilişki ısı haritası ve dendogram çıkartılarak incelenmiştir (Şekil 5.20.).



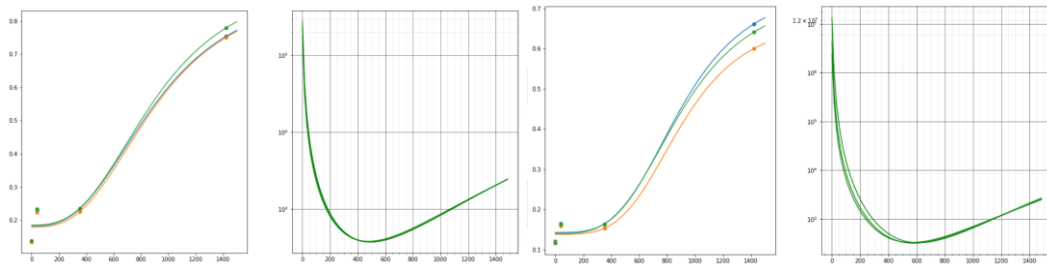
H2



Pasaj 2

H1

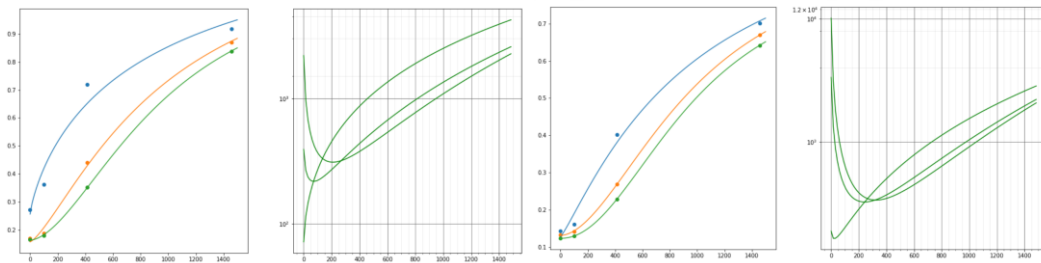
H2



Pasaj 3

H1

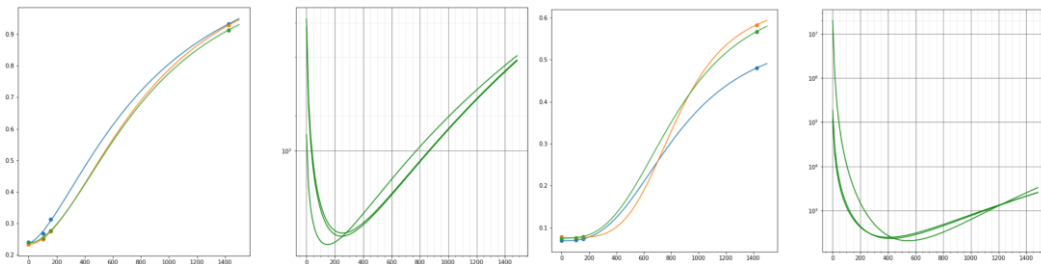
H2



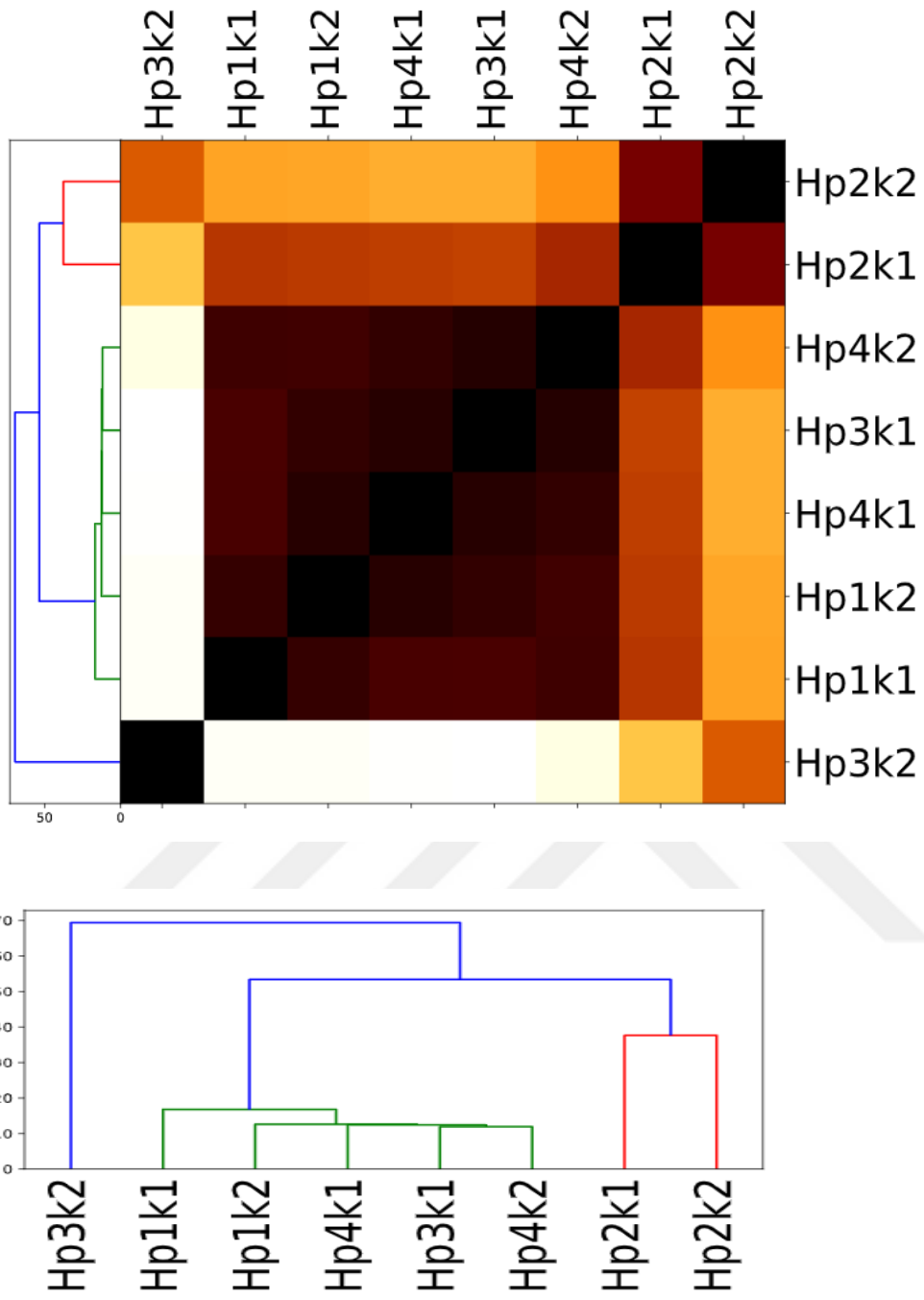
Pasaj 4

H1

H2



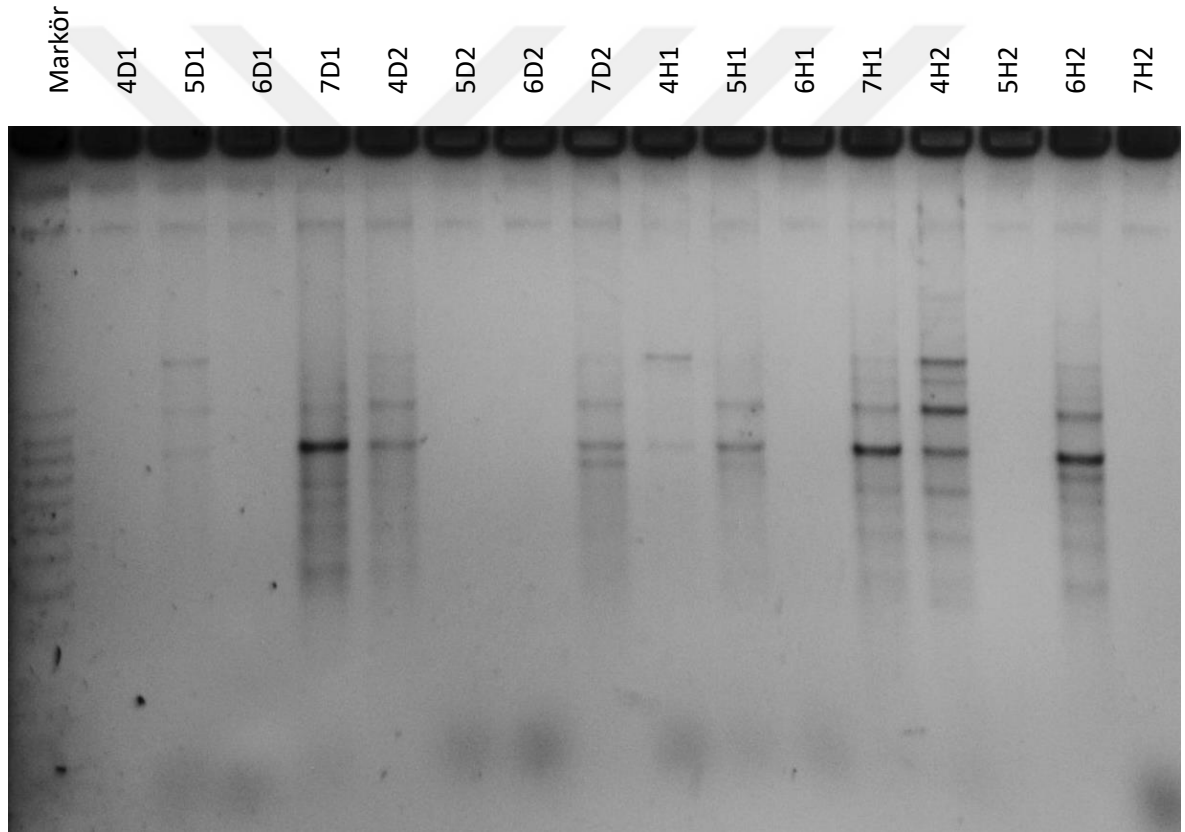
Şekil 5.21. Pasajlanan H1 ve H2 hücrelerinde üreme eğrisi değişimi



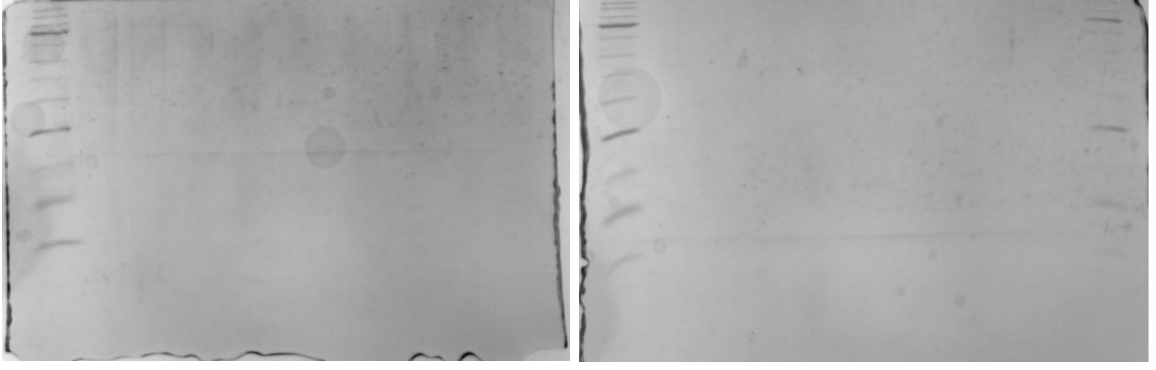
Şekil 5.22. HM-GP1 hücre pasajları arasındaki ilişki

5.9. PROTEOMİK VE GENOMİK PARMAK İZİ ÇIKARILMASI

Pasajlanan hücreler 24. saatte OD₆₀₀ değerleri alındıktan sonra sonlandırılarak 400'er µl hacim DNA ve protein izolasyonu için ayrılmıştır. İzole edilen DNA'lar spektrofotometrik ölçümlerle kantite edilmiş ve eşit miktarlarda AP-PCR reaksiyonuna katılmıştır. Çoğaltılan primerler %1,6'lık jelde yürütülerek görüntülenmiş ve hücreler arası genomik parmak izi değişimi incelenmiştir (Şekil 5.20.). Protein parmak izi çıkarımı öncesinde izolatlar Bradford testi ile spektrofotometrik ölçümler yapılarak kantite edilmiş ve bu kantitasyona uygun olarak SDS-PAGE jelinde yürütülerek kumasi boyama ile görüntülenmiştir (Şekil 5.22.).



Şekil 5.23. Genomik parmak izi



Şekil 5.24. Proteomik parmak izi, SDS-PAGE

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrobiyal hücre fabrikaları oluşturulurken kullanılan hücrelerin arzu edilen gürbüzlukte, verimlilikte ve fonksiyonellikte olmaları evrimsel süreçlerle gerçekleşmektedir. Bu süreçle müdahale edebilmek için genetik mühendisliği ve sentetik biyoloji metotları sıkça kullanılmaktadır. *E. coli* en sık kullanılan, hücresel yolları ve genetik yapısı en iyi bilinen hücrelerden biridir (46). Sentetik devrelerin kurulması ve çevresel faktörlerle stokastik gen ekspresyonlarının tetiklenmesi ile hücrelerin fenotipik fluktuasyon oranlarının ve bununla birlikte mutasyon hızlarının arttığı raporlanmıştır (16, 18). T7 ekspresyon sistemi kontrollü protein ekspresyonu sağlamak amacı ile araştırmalarda da sıkça kullanılmaktadır. Bu araştırmalarda T7 Promotörü gibi güçlü promotörlerin hücreye metabolik bir yük getirerek hücrelerde stres yarattığı bildirilmiştir (4). Bunu gibi ve benzer sentetik devreler kurularak ve hücresel yollara müdahale edilerek hücresel çeşitliliğin ve protein üretiminin kontrolü sağlanmak istenmektedir (9, 14, 15, 20, 27, 30, 34, 38). Bu tez çalışmasında kurulan sentetik devrelerin ve fermantasyon koşullarının farklı genotipe sahip hücrelerde meydana getirdiği fenotipik, genomik ve proteomik değişimler incelenerek suşların adaptasyon hızları karşılaştırılmıştır. Kullanılan *E. coli* hücrelerinden DH5 α (Δ recA) stabil bir genotipte iken HME63 (Δ mutS) nokta mutasyonlar geçirmeye yatkındır (44, 45). Çalışmada iki farklı plazmid (pACYC184-T7RNAP ve pET28a-GFP) iki farklı *E. coli* suşuna (DH5 α ve HME63) klonlanmış ve farklı genotipte T7 sistemine sahip GFP eksprese edebilen iki *E. coli* hücre hattı üretilmiştir (Şekil 5.6.) (Şekil 5.7.). Bu sayede T7 ekspresyon sistemine sahip olmayan iki suşa bu sistem entegre edilmiş ve GFP ekspresyonunun bir indükleyici (IPTG) ile kontrolü sağlanmıştır. T7 ekspresyon mekanizmasının çalışması IPTG varlığında ve yokluğunda hücre üremeleri sağlanarak kontrol edilmiştir ve indüklenmeyen kültürlerde GFP ekspresyonu gözlemlenmemiştir. Çalışmada kullanılan üreme faktörleri, ön çalışma deneylerinde pET28a-GFP plazmidi içeren *E. coli* hücresi BL21 suşunda test edilmiş ve gerçekçi üreme eğrileri elde edilip fenotipik heterojenite gözlemlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak, elde edilen DH5 α ve HME63 transformant suşları da (DH-GP1 ve HM-GP1) aynı koşullar altında indüklenmiştir. İndükleme koşullarından C17, C18, C19, C20, C21, C14, S12, S11, S15, S13 ve S9 birebir aynı oranda, aynı faktörleri içermektedir. Her iki hücre hattı için eşit koşullar altında izogenik hücrelerde üreme eğrilerinin ve GFP ekspresyonlarının

birbirinden farklı olmaları önceki çalışmalarda da savunulduğu gibi izogenik hücrelerdeki fenotipik fluktuasyon gözlemini desteklemiştir (8, 9, 16). HM-GP1 hücreleri indüklendikleri S7, C17, C20, C2, S3, S4, S6, S10, S11, S13 ve S15 koşullarında üç tekrarlı kuyuda birbirinden farklı desende ve oranda üreme eğrileri çizmiştir. Bu farklılık DH-GP1 hücrelerinde gözlemlenmemiştir. DH-GP1 hücreleri sadece etanol konsantrasyonları bakımından birbirinden farklı S7 ve S8 koşulları altında tamamen aynı üreme eğrileri çizerken diğer koşullar altında küçük oranlarda farklılaşabilen üreme eğrileri göstermiştir (EK 4) (EK 5). Bu farklılığın HME63 suşunun mutasyona yatkın genotipinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. DH-GP1 hücreleri deney koşulu S9'da en fazla fenotipik heterojenite gösterirken HM-GP1 hücreleri en yüksek fenotipik heterojeniteyi deney koşulu S6'da göstermiştir. S9 koşulu bazı diğer deney koşulları ile aynı konsantrasyonlara sahiptir. DH5 α suşunun bu koşulda diğer benzer koşullardan fazla farklılaşmasının sebebinin stokastik gen ekspresyonu olduğu düşünülmektedir. S6 koşulu diğer S9 koşuluna göre daha yüksek IPTG ve Kloramfenikol konsantrasyonuna sahiptir. Bu koşulların HME63 suşunda daha farklı bir stres indüklemiş olabileceği düşünülmüştür. Hücrelerin GFP ekspresyon görüntülemeleri, inkübasyonları sonlandırıldığında floresan mikroskobu altında 40 x büyütülerek FITC filtresi ile elde edilmiştir. Görüntülerden elde edilen HSV analizlerinde hem DH-GP1 hem de HM-GP1 izogenik hücrelerinin eşit koşullar da dahil olmak üzere tüm koşullarda farklı oranlarda fenotipik fluktuasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. DH-GP1 hücrelerinden elde edilen 2D histogramların birbirine uzaklıkları iki kolda gözlemlenirken; HM-GP1 hücreleri üç kolda uzaklık göstermiştir. Her iki hücre hattında da aynı koşullar altında indüklenen hücreler arasındaki uzaklık, farklı koşullarda indüklenen hücreler arasındaki uzaklıktan fazla gözlemlenebilmiştir (Şekil 5.12) (Şekil 5.14). Pasajlanan hücrelere bakıldığında 1. ve 3. Pasaj Koşul 1 altında indüklenen DH-GP1 hücreleri diğerlerinden ve birbirinden ayrı kollarda benzerlik gösterirken diğer pasajlanan hücrelerin kendi içlerinde yakın bir ilişki içerisinde oldukları görülmüştür (Şekil 5.18.). HM-GP1 hücre pasajları incelendiğinde Koşul 2 altında indüklenen 3. Pasajın diğerlerinden ayrıldığı görülmüştür. 1. Ve 4. Pasaj hücrelerinin her iki koşul altında indüklenen hücreleri arasında yakın bir ilişki görülürken bunlardan ayrılan 2. Pasaj 1. ve 2. Koşul altında indüklenmiş hücreler birbirleri ile yakın bir ilişki göstermişlerdir. Pasajların proteomik parmak izinin çıkarılması için yapılan izolasyon sonucunda kaliteli ve yeteri miktarda protein elde edilemediğinden jelde görüntüleme analize uygun düşmemiştir.

Genomik parmak izi analizi için görüntülenen jel görüntüsünde koşul 1 altında indüklenen ilk 3 pasaja ait 1. Koşulda indüklenmiş DH-GP1 hücrelerinin primer 1283 ile çoğaltılabilmiş bantları çok silik veya mevcut değildir. 2. pasajda düşük miktarda görünen 1200 ve 900 bp büyüklüğünde bantlar 4. pasajda kuvvetlenerek görüntülenmiştir. 2. Koşul altında indüklenen DH-GP1 hücrelerinin 1. ve 4. pasajlarında 1200, 1000 ve 900 bp büyüklüğünde bantlar görülürken 4. pasajda 800 bp büyüklüğünde bir bant daha saptanmıştır. 2. ve 3. Pasajlarda ise bantlar çok siliktir ya da görüntülenememiştir. 1. Koşul altında indüklenen HM-GP1 hücreleri 1. pasajda 1200 ve 900 bp büyüklüğünde bantlar görünürken 2. Pasajda 1200 bp büyüklüğündeki bant kaybolmuş ve 1000 bp büyüklüğündeki bant görülmüştür. 3. pasajda bir bant görüntülenmezken 4. pasajda 1200, 1000 ve 900 bp büyüklüğündeki bantlar görülmüştür. Son pasajın 1. ve 2. Pasajda görülen bantların hepsini içermesi HME63 suşunun 1. Koşul altında adaptasyon hızının yüksek olduğunu göstermiştir. 2. Koşul altında indüklenen 1. Pasaj hücreleri 1500, 1200, 1100, 1000, 900, 800 ve 700 bp büyüklüğünde bantlar vermiş ve en geniş bant aralığına sahip ürün olarak görülmüştür. 2. ve 4. pasajda bant gözlemlenmezken 3. pasajda 1200 bp büyüklüğündeki bant silikleşmiş, 1100 bp büyüklüğündeki bant kaybolmuş, 1000, 900, 880, 800 ve 700 bp büyüklüğündeki bantlar görüntülenmiştir (Şekil 5.21.) (Şekil 5.22.). HME63 suşunun koşul 1 ve 2'deki adaptasyon hızı DH5 α 'nın adaptasyon hızından yüksek olduğu görülmüştür. HME63 suşunun koşul 2'de koşul 1'e göre daha çok farklılaştığı saptanmıştır. Kullandığımız yöntemde 1283 primeri kullanılmıştır. Bu metotla görülen farklılıklar gerçeği yansıtırken farklı görünmeyen hücre desenleri gerçekte farklılık gösterebilir. Bu farklılıkların daha detaylı incelenmesi için başka primerlerle reaksiyona sokulması bu karşılaştırmanın daha etkili olmasını sağlayabileceği düşünülmektedir (47).

Bu tez çalışmasında hücrelerin yüksek ve düşük fenotip geliştirebildikleri koşullar belirlenmiş ve gösterilmiştir. Bu çalışma ile DH5 α ve HME63 suşlarının adaptasyon hızları karşılaştırılmış ve HME63 suşunun daha yüksek adaptasyon hızına sahip olduğu ve adaptasyon hızının çevresel faktörlerle arttırılabildiği görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Kim K, Choe D, Lee D-H, Cho B-K. Engineering Biology to Construct Microbial Chassis for the Production of Difficult-to-Express Proteins. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):990. doi: 10.3390/ijms21030990. PubMed PMID: 32024292.
2. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology.* 2014;5(172). doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
3. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.* 2019;28(8):1412-22. Epub 2019/06/21. doi: 10.1002/pro.3668. PubMed PMID: 31219641; PubMed Central PMCID: PMCPMC6635841.
4. Tegel H, Ottosson J, Hober S. Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. *Febs j.* 2011;278(5):729-39. Epub 2011/01/06. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07991.x. PubMed PMID: 21205203.
5. Gong Z, Nielsen J, Zhou YJ. Engineering Robustness of Microbial Cell Factories. *Biotechnology Journal.* 2017;12(10):1700014. doi: <https://doi.org/10.1002/biot.201700014>.
6. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.* 2019;28(8):1412-22. Epub 2019/07/01. doi: 10.1002/pro.3668. PubMed PMID: 31219641.
7. Fulcrand G, Dages S, Zhi X, Chapagain P, Gerstman BS, Dunlap D, et al. DNA supercoiling, a critical signal regulating the basal expression of the lac operon in *Escherichia coli*. *Scientific Reports.* 2016;6(1):19243. doi: 10.1038/srep19243.
8. Lehner B, Kaneko K. Fluctuation and response in biology. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(6):1005-10. Epub 2010/11/30. doi: 10.1007/s00018-010-0589-y. PubMed PMID: 21116679.
9. Ito Y, Toyota H, Kaneko K, Yomo T. How selection affects phenotypic fluctuation. *Mol Syst Biol.* 2009;5:264-. Epub 2009/04/28. doi: 10.1038/msb.2009.23. PubMed PMID: 19401676.
10. Gustavsson M, Lee SY. Prospects of microbial cell factories developed through systems metabolic engineering. *Microbial Biotechnology.* 2016;9(5):610-7. doi: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12385>.
11. Delvigne F, Pêcheux H, Tarayre C. Fluorescent Reporter Libraries as Useful Tools for Optimizing Microbial Cell Factories: A Review of the Current Methods and Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:147-. doi: 10.3389/fbioe.2015.00147. PubMed PMID: 26442261.

12. Raj A, van Oudenaarden A. Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell*. 2008;135(2):216-26. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.050. PubMed PMID: 18957198.
13. Bennett AW. The Origin of Species by means of Natural Selection; or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. *Nature*. 1872;5(121):318-9. doi: 10.1038/005318a0.
14. Ryall B, Eydallin G, Ferenci T. Culture History and Population Heterogeneity as Determinants of Bacterial Adaptation: the Adaptomics of a Single Environmental Transition. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2012;76(3):597. doi: 10.1128/MMBR.05028-11.
15. Bervoets I, Charlier D. Diversity, versatility and complexity of bacterial gene regulation mechanisms: opportunities and drawbacks for applications in synthetic biology. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(3):304-39. Epub 2019/02/06. doi: 10.1093/femsre/fuz001. PubMed PMID: 30721976; PubMed Central PMCID: PMC6524683.
16. Bürger R, Willensdorfer M, Nowak MA. Why are phenotypic mutation rates much higher than genotypic mutation rates? *Genetics*. 2006;172(1):197-206. Epub 2005/09/02. doi: 10.1534/genetics.105.046599. PubMed PMID: 16143614.
17. Sun M, Zhang J. Chromosome-wide co-fluctuation of stochastic gene expression in mammalian cells. *PLoS Genet*. 2019;15(9):e1008389-e. doi: 10.1371/journal.pgen.1008389. PubMed PMID: 31525198.
18. Sato K, Ito Y, Yomo T, Kaneko K. On the relation between fluctuation and response in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(24):14086-90. doi: 10.1073/pnas.2334996100.
19. Iida K, Obata N, Kimura Y. Quantifying heterogeneity of stochastic gene expression. *J Theor Biol*. 2019;465:56-62. Epub 2019/01/07. doi: 10.1016/j.jtbi.2019.01.003. PubMed PMID: 30611711.
20. Wang T, Dunlop MJ. Controlling and exploiting cell-to-cell variation in metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;57:10-6. Epub 2018/09/28. doi: 10.1016/j.copbio.2018.08.013. PubMed PMID: 30261323.
21. Raser JM, O'Shea EK. Noise in gene expression: origins, consequences, and control. *Science (New York, NY)*. 2005;309(5743):2010-3. doi: 10.1126/science.1105891. PubMed PMID: 16179466.
22. Xiao Y, Bowen CH, Liu D, Zhang F. Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis. *Nature Chemical Biology*. 2016;12(5):339-44. doi: 10.1038/nchembio.2046.
23. Thomas P. Intrinsic and extrinsic noise of gene expression in lineage trees. *Sci Rep*. 2019;9(1):474. Epub 2019/01/27. doi: 10.1038/s41598-018-35927-x. PubMed PMID: 30679440; PubMed Central PMCID: PMC6345792.

24. Freddolino PL, Yang J, Momen-Roknabadi A, Tavazoie S. Stochastic tuning of gene expression enables cellular adaptation in the absence of pre-existing regulatory circuitry. *Elife*. 2018;7. Epub 2018/04/06. doi: 10.7554/eLife.31867. PubMed PMID: 29620524; PubMed Central PMCID: PMC5919758.
25. Crook N, Abatemarco J, Sun J, Wagner JM, Schmitz A, Alper HS. In vivo continuous evolution of genes and pathways in yeast. *Nature Communications*. 2016;7(1):13051. doi: 10.1038/ncomms13051.
26. Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution -- principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact*. 2013;12:64-. doi: 10.1186/1475-2859-12-64. PubMed PMID: 23815749.
27. Van den Bergh B, Swings T, Fauvart M, Michiels J. Experimental Design, Population Dynamics, and Diversity in Microbial Experimental Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2018;82(3):e00008-18. doi: 10.1128/MMBR.00008-18. PubMed PMID: 30045954.
28. Kuhlman T, Zhang Z, Saier MH, Hwa T. Combinatorial transcriptional control of the lactose operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(14):6043-8. doi: 10.1073/pnas.0606717104.
29. Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*. 2002;297(5584):1183-6. Epub 2002/08/17. doi: 10.1126/science.1070919. PubMed PMID: 12183631.
30. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:172-. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172. PubMed PMID: 24860555.
31. Angius F, Ilioaia O, Amrani A, Suisse A, Rosset L, Legrand A, et al. A novel regulation mechanism of the T7 RNA polymerase based expression system improves overproduction and folding of membrane proteins. *Scientific Reports*. 2018;8(1):8572. doi: 10.1038/s41598-018-26668-y.
32. Campbell N, Taylor, M., Simon, E., Dickey, J., Hogan, K. and Reece. *Biology concepts and connections*. eight ed.
33. Jeong Y. Optimal designs for experiments with a large number of factors. *Journal of Statistical Planning and Inference*. 1995;46(3):381-93. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-3758\(94\)00110-H](https://doi.org/10.1016/0378-3758(94)00110-H).
34. Bowden GD, Pichler BJ, Maurer A. A Design of Experiments (DoE) Approach Accelerates the Optimization of Copper-Mediated (18)F-Fluorination Reactions of Arylstannanes. *Scientific reports*. 2019;9(1):11370-. doi: 10.1038/s41598-019-47846-6. PubMed PMID: 31388076.
35. Ekpenyong MG, Antai SP, Asitok AD, Ekpo BO. Plackett-Burman Design and Response Surface Optimization of Medium Trace Nutrients for Glycolipopeptide

Biosurfactant Production. Iran Biomed J. 2017;21(4):249-60. Epub 2017/04/23. doi: 10.18869/acadpub.ibj.21.4.249. PubMed PMID: 28433004.

36. Kumar A, Prasad B, Mishra IM. Optimization of process parameters for acrylonitrile removal by a low-cost adsorbent using Box-Behnken design. J Hazard Mater. 2008;150(1):174-82. Epub 2007/11/06. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.09.043. PubMed PMID: 17977651.

37. Tanhauser SM, Jewell DA, Tu CK, Silverman DN, Laipis PJ. A T7 expression vector optimized for site-directed mutagenesis using oligodeoxyribonucleotide cassettes. Gene. 1992;117(1):113-7. Epub 1992/08/01. doi: 10.1016/0378-1119(92)90498-e. PubMed PMID: 1644301.

38. Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. J Biotechnol. 2007;127(3):335-47. Epub 2006/09/09. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.012. PubMed PMID: 16959350.

39. Zhang Y, Werling U, Edelmann W. SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. Nucleic Acids Res. 2012;40(8):e55. Epub 2012/01/14. doi: 10.1093/nar/gkr1288. PubMed PMID: 22241772; PubMed Central PMCID: PMC3333860.

40. Zhang Y, Werling U, Edelmann W. Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) cloning method. Methods Mol Biol. 2014;1116:235-44. Epub 2014/01/08. doi: 10.1007/978-1-62703-764-8_16. PubMed PMID: 24395368; PubMed Central PMCID: PMC3333860.

41. Sousa R, Mukherjee S. T7 RNA Polymerase. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 73: Academic Press; 2003. p. 1-41.

42. Soboleski MR, Oaks J, Halford WP. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. FASEB J. 2005;19(3):440-2. Epub 2005/01/07. doi: 10.1096/fj.04-3180fje. PubMed PMID: 15640280.

43. Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, Webber H, Phillips GJ. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in Escherichia coli. J Bacteriol. 2000;182(14):4068-76. doi: 10.1128/jb.182.14.4068-4076.2000. PubMed PMID: 10869087.

44. Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5 α -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. PLoS One. 2015;10(9):e0137466-e. doi: 10.1371/journal.pone.0137466. PubMed PMID: 26348330.

45. Sawitzke JA, Costantino N, Li X-T, Thomason LC, Bubunenko M, Court C, et al. Probing cellular processes with oligo-mediated recombination and using the knowledge gained to optimize recombineering. J Mol Biol. 2011;407(1):45-59. Epub 2011/01/19. doi: 10.1016/j.jmb.2011.01.030. PubMed PMID: 21256136.

46. Hara KY, Araki M, Okai N, Wakai S, Hasunuma T, Kondo A. Development of bio-based fine chemical production through synthetic bioengineering. *Microb Cell Fact.* 2014;13:173-. doi: 10.1186/s12934-014-0173-5. PubMed PMID: 25494636.
47. Nielsen KL, Godfrey PA, Stegger M, Andersen PS, Feldgarden M, Frimodt-Møller N. Selection of unique *Escherichia coli* clones by random amplified polymorphic DNA (RAPD): Evaluation by whole genome sequencing. *J Microbiol Methods.* 2014;103:101-3. Epub 2014/06/06. doi: 10.1016/j.mimet.2014.05.018. PubMed PMID: 24912108.



EKLER



EK 2: DH5A VE HME63 FENOTİPİK HETEROJENİTE DENEY MATRİSİ

Suk										Çalışan				V =				karamisin							
tampon	baselMedium	glycerol	ıptg	ethanol	cam	OXT	kan	cell	Tampon baselMedium	glycerol	ıptg	ethanol	cam	oxt											
10 x	180.00 µl	50.00 %	420.00 mM	100.00 %	10.000.00 µg/ml	20.000.00 µg/ml	25.000.00 µg/ml	1.50 C1.17	1.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00	20.00 50.00 0.04	C1.17	1.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47
								C1.18	1.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		C1.18	1.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47
								C1.5	1.00	1200	0.00 2.00	0.00 2.00		C1.5	1.00	10000	6667	0.00	4.76	0.00	0.20	1.00	2.00	1100	814.37
								C1.6	1.00	3600	0.00 2.00	0.00 32.00		C1.6	1.00	10000	20000	0.00	4.76	0.00	3.20	1.00	2.00	1100	678.04
								C1.16	1.00	3600	8.00 2.00	3.00 32.00		C1.16	1.00	10000	20000	160.00	4.76	30.00	3.20	1.00	2.00	1100	488.04
								C1.13	1.00	1200	0.00 2.00	3.00 32.00		C1.13	1.00	10000	6667	0.00	4.76	30.00	3.20	1.00	2.00	1100	781.37
								C1.8	1.00	3600	8.00 2.00	0.00 2.00		C1.8	1.00	10000	20000	160.00	4.76	0.00	0.20	1.00	2.00	1100	521.04
								C1.7	1.00	1200	8.00 2.00	0.00 32.00		C1.7	1.00	10000	6667	160.00	4.76	0.00	3.20	1.00	2.00	1100	651.37
								C1.12	1.00	3600	8.00 0.10	3.00 2.00		C1.12	1.00	10000	20000	160.00	0.24	30.00	0.20	1.00	2.00	1100	495.56
								C1.4	1.00	3600	8.00 0.10	0.00 32.00		C1.4	1.00	10000	20000	160.00	0.24	0.00	3.20	1.00	2.00	1100	522.56
								C1.19	1.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		C1.19	1.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47
								C1.1	1.00	1200	0.00 0.10	0.00 32.00		C1.1	1.00	10000	6667	0.00	0.24	0.00	3.20	1.00	2.00	1100	815.90
								C1.3	1.00	1200	8.00 0.10	0.00 2.00		C1.3	1.00	10000	6667	160.00	0.24	0.00	0.20	1.00	2.00	1100	658.90
								C1.9	1.00	1200	0.00 0.10	3.00 2.00		C1.9	1.00	10000	6667	0.00	0.24	30.00	0.20	1.00	2.00	1100	788.90
								C1.14	1.00	3600	0.00 2.00	3.00 2.00		C1.14	1.00	10000	20000	0.00	4.76	30.00	0.20	1.00	2.00	1100	651.04
								C1.11	1.00	1200	8.00 0.10	3.00 32.00		C1.11	1.00	10000	6667	160.00	0.24	30.00	3.20	1.00	2.00	1100	625.90
								C1.2	1.00	3600	0.00 0.10	0.00 2.00		C1.2	1.00	10000	20000	0.00	0.24	0.00	0.20	1.00	2.00	1100	685.56
								C1.10	1.00	3600	0.00 0.10	3.00 32.00		C1.10	1.00	10000	20000	0.00	0.24	30.00	3.20	1.00	2.00	1100	652.56
								C1.15	1.00	1200	8.00 2.00	3.00 2.00		C1.15	1.00	10000	6667	160.00	4.76	30.00	0.20	1.00	2.00	1100	624.37
								C1.20	1.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		C1.20	1.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47
							C1.21	1.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		C1.21	1.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47	
							S2.3	2.00	2400	0.00 1.05	1.50 17.00		S2.3	2.00	10000	13333	0.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	733.47	
							S2.4	2.00	2400	8.00 1.05	1.50 17.00		S2.4	2.00	10000	13333	160.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	573.47	
							S2.2	2.00	3600	4.00 1.05	1.50 17.00		S2.2	2.00	10000	20000	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	586.80	
							S2.14	2.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		S2.14	2.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47	
							S2.10	2.00	2400	4.00 1.05	1.50 32.00		S2.10	2.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	3.20	1.00	2.00	1100	651.97	
							S2.5	2.00	2400	4.00 0.10	1.50 17.00		S2.5	2.00	10000	13333	80.00	0.24	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	655.73	
							S2.12	2.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		S2.12	2.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47	
							S2.8	2.00	2400	4.00 1.05	3.00 17.00		S2.8	2.00	10000	13333	80.00	2.50	30.00	1.70	1.00	2.00	1100	688.47	
							S2.1	2.00	1200	4.00 1.05	1.50 17.00		S2.1	2.00	10000	6667	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	720.13	
							S2.11	2.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		S2.11	2.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47	
							S2.15	2.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		S2.15	2.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47	
							S2.6	2.00	2400	4.00 2.00	1.50 17.00		S2.6	2.00	10000	13333	80.00	4.76	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	651.20	
							S2.13	2.00	2400	4.00 1.05	1.50 17.00		S2.13	2.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	1.70	1.00	2.00	1100	653.47	
							S2.7	2.00	2400	4.00 1.05	0.00 17.00		S2.7	2.00	10000	13333	80.00	2.50	0.00	1.70	1.00	2.00	1100	688.47	
							S2.9	2.00	2400	4.00 1.05	1.50 2.00		S2.9	2.00	10000	13333	80.00	2.50	15.00	0.20	1.00	2.00	1100	654.97	

EK 3: KULLANILAN MAKİNE-TEÇHİZAT LİSTESİ

Thermo IEC MicroCL 17R	Santrifüj
Beckman Coulter Microfuge 18	Santrifüj
Beckman Coulter X-15R	Santrifüj
TECAN Infinite 200 PRO	Mikroplaka Okuyucu
Shel Lab	Çalkalayıcılı inkübatör
Nanodrop ND-1000	Spektrofotometre
Agileny Technologies UV-visible spectrofotometer	UV-Spektrofotometre
Biorad Versadoc Model 1000	Görüntüleme sistemi
Biorad T100 Thermal Cyclor	Thermocycler
Labnet VX100	Vorteks
Biorad PowerPac Basic	Güç kaynağı
Thomas Scientific Owl	Yatay elektroforez tankı
Perkin Elmer Victor 3V	Miroplaka Okuyucu
Carl Zeiss Axio Imager M1	Floresan mikroskobu

EK 4: DH5A DENEY MATRİSİNDE ÜREME EĞRİSİ HAM VERİLERİ

	sample	growth plateau min	growth plateau max	mean growth plateau	std growth plateau	min peak growth rate t	max peak growth rate t	mean peak growth rate t	std peak growth rate t	min shortest doubling time	max shortest doubling time	mean shortest doubling time	std shortest doubling time
0	C17	0.393522	0.401580	0.397651	0.003293	378.787879	393.939394	383.838384	7.142493e+00	108.778902	125.559447	115.662352	7.174769
1	C18	0.373165	0.394958	0.384161	0.008898	378.787879	378.787879	378.787879	0.000000e+00	110.805860	111.951023	111.339899	0.470742
2	C5	0.377321	0.392798	0.384567	0.008357	212.121212	227.272727	217.171717	7.142493e+00	177.222637	186.785894	181.594578	3.946940
3	C6	0.471034	0.483777	0.475915	0.005613	348.484848	348.484848	348.484848	0.000000e+00	144.271105	145.862320	145.221098	0.685321
4	C16	0.228867	0.240442	0.235215	0.004897	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	88.121331	110.721185	103.007809	10.528504
5	C13	0.253625	0.279603	0.263225	0.011838	348.484848	363.636364	353.535354	7.142493e+00	154.430029	177.668973	169.177654	10.467988
6	C8	0.407728	0.420849	0.413561	0.005350	409.090909	409.090909	409.090909	5.684342e-14	73.320281	75.641385	74.602732	0.963140
7	C7	0.221298	0.227335	0.224737	0.002535	393.939394	409.090909	398.989899	7.142493e+00	112.136475	128.492475	118.675770	7.068038
8	C12	0.292358	0.302454	0.297928	0.004187	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	72.458462	79.267721	76.641573	2.989939
9	C4	0.307859	0.312456	0.309407	0.002156	409.090909	409.090909	409.090909	5.684342e-14	88.208713	93.892295	91.294889	2.291029
10	C19	0.391549	0.402922	0.397145	0.004645	363.636364	378.787879	373.737374	7.142493e+00	118.206077	125.805446	121.280836	3.276506
11	C1	0.189170	0.205227	0.195622	0.006924	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	61.493245	72.497204	66.073245	4.677743
12	C3	0.256561	0.266201	0.260864	0.004003	393.939394	393.939394	393.939394	0.000000e+00	100.363305	104.124470	102.616677	1.623475
13	C9	0.310119	0.331754	0.319879	0.009010	363.636364	378.787879	373.737374	7.142493e+00	120.450080	124.977735	123.116371	1.934086
14	C14	0.453728	0.466800	0.459977	0.005262	409.090909	409.090909	409.090909	5.684342e-14	77.023149	81.279964	79.024619	1.747085
15	C11	0.181457	0.191852	0.187625	0.004480	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	80.647027	91.948086	86.949600	4.704380
16	C2	0.473835	0.533626	0.504416	0.024428	287.878788	303.030303	297.979798	7.142493e+00	167.666310	190.730175	175.847152	10.541186
17	C10	0.380650	0.405549	0.390179	0.010972	393.939394	409.090909	404.040404	7.142493e+00	93.156774	98.510912	96.488294	2.373691
18	C15	0.241550	0.249720	0.246621	0.003615	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	77.520292	82.852496	80.662274	2.278521
19	C20	0.360634	0.390236	0.375264	0.012088	378.787879	378.787879	378.787879	0.000000e+00	111.910825	124.416813	118.112144	5.106071
20	C21	0.392994	0.407918	0.400620	0.006093	378.787879	378.787879	378.787879	0.000000e+00	118.370482	125.505622	121.173002	3.107353
21	S3	0.403787	0.438053	0.422321	0.014129	333.333333	333.333333	333.333333	0.000000e+00	155.265313	161.440656	157.843259	2.622108
22	S4	0.287550	0.300497	0.294243	0.005295	409.090909	409.090909	409.090909	5.684342e-14	89.099218	99.781925	94.258473	4.368794
23	S2	0.395598	0.411125	0.403167	0.006345	393.939394	409.090909	398.989899	7.142493e+00	95.004117	101.513191	98.249628	2.657349
24	S14	0.378960	0.397279	0.385877	0.008123	378.787879	378.787879	378.787879	0.000000e+00	114.081917	119.404800	117.297991	2.310285
25	S10	0.326990	0.344309	0.337771	0.007680	378.787879	378.787879	378.787879	0.000000e+00	126.850177	136.803896	130.961791	4.243825
26	S5	0.359773	0.376216	0.369975	0.007274	378.787879	378.787879	378.787879	0.000000e+00	116.358306	124.388489	120.927183	3.370558
27	S12	0.362596	0.376234	0.371030	0.006018	378.787879	378.787879	378.787879	0.000000e+00	122.997689	130.088330	127.084255	2.993805
28	S8	0.372761	0.375214	0.373902	0.001008	409.090909	409.090909	409.090909	5.684342e-14	81.750688	84.209948	82.651590	1.106400
29	S1	0.252244	0.261241	0.257493	0.003823	348.484848	363.636364	358.585859	7.142493e+00	172.222916	180.310845	177.152770	3.531577
30	S11	0.373343	0.387703	0.381296	0.005963	378.787879	378.787879	378.787879	0.000000e+00	121.249925	122.436343	121.984172	0.523814
31	S15	0.379683	0.387498	0.383255	0.003226	363.636364	378.787879	368.686869	7.142493e+00	119.219615	134.515885	128.884684	6.865277
32	S6	0.355044	0.372112	0.365338	0.007399	363.636364	363.636364	363.636364	5.684342e-14	132.861989	144.335841	136.995249	5.204328
33	S13	0.371242	0.392336	0.379402	0.009249	363.636364	363.636364	363.636364	5.684342e-14	125.573497	139.797434	133.709269	5.984682
34	S7	0.417151	0.418753	0.417955	0.000654	363.636364	363.636364	363.636364	5.684342e-14	122.082055	125.717599	123.347750	1.677033
35	S9	0.419590	0.442459	0.432018	0.009441	363.636364	378.787879	368.686869	7.142493e+00	114.827301	119.333244	116.820507	1.875867

EK 5: HME63 DENEY MATRİSİNDE ÜREME EĞRİSİ HAM VERİLERİ

	sample	growth plateau min	growth plateau max	mean growth plateau	std growth plateau	min peak growth rate t	max peak growth rate t	mean peak growth rate t	std peak growth rate t	min shortest doubling time	max shortest doubling time	mean shortest doubling time	std shortest doubling time
0	C17	0.462103	0.485750	0.473732	0.009658	257.575758	318.181818	292.929293	2.575262e+01	150.506395	216.916749	178.721987	28.015135
1	C18	0.512025	0.581507	0.537420	0.031294	272.727273	272.727273	272.727273	0.000000e+00	150.038050	178.155665	162.172783	11.797075
2	C5	1.484298	1.538158	1.503008	0.024872	108.080808	121.212121	118.161616	7.142493e+00	128.436090	142.681927	135.818485	5.816446
3	C6	1.568039	1.817243	1.595873	0.021744	151.515152	196.969697	171.717172	1.889726e+01	176.344643	188.709410	182.004402	5.101717
4	C16	1.522115	1.577366	1.541803	0.025195	318.181818	378.787879	348.484848	2.474232e+01	193.134916	219.086140	209.716544	11.758020
5	C13	1.327689	1.442900	1.375653	0.048971	257.575758	318.181818	282.828283	2.575262e+01	168.288542	203.220092	182.805462	14.858006
6	C8	0.583689	0.802899	0.590615	0.008711	393.939394	393.939394	393.939394	0.000000e+00	52.304237	55.913542	54.155353	1.474957
7	C7	0.287110	0.307155	0.295323	0.008574	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	47.272244	52.873815	49.874156	2.303984
8	C12	0.500055	0.514914	0.505883	0.008475	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	35.534567	43.129777	38.831521	3.180540
9	C4	0.501763	0.544722	0.518267	0.018897	409.090909	409.090909	409.090909	5.684342e-14	42.029549	48.631204	45.233884	2.698567
10	C19	0.498339	0.551981	0.523207	0.022073	272.727273	303.030303	287.878788	1.237116e+01	151.895717	182.544118	158.193837	4.580166
11	C1	1.463907	1.506682	1.483193	0.017714	138.363636	181.818182	158.565657	1.889726e+01	114.800478	128.246774	122.297978	5.597593
12	C3	0.339922	0.374347	0.361065	0.015114	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	41.824080	46.039191	44.103312	1.737855
13	C9	1.282875	1.325022	1.298270	0.018989	212.121212	272.727273	247.474747	2.575262e+01	186.625178	193.805298	190.582347	2.925189
14	C14	1.262671	1.471144	1.364242	0.085192	212.121212	242.424242	222.222222	1.428499e+01	215.229979	222.968492	220.233519	3.543157
15	C11	0.290158	0.358907	0.318081	0.029512	424.242424	424.242424	424.242424	0.000000e+00	37.410871	45.906880	40.841993	3.655811
16	C2	1.522600	1.602118	1.564661	0.032626	45.454545	60.606061	55.555556	7.142493e+00	135.944186	143.574807	140.474562	3.275215
17	C10	1.443054	1.543512	1.476743	0.047214	242.424242	272.727273	262.626263	1.428499e+01	200.754487	212.263627	206.984139	4.746380
18	C15	0.416362	0.505240	0.453586	0.037892	409.090909	424.242424	414.141414	7.142493e+00	31.658293	39.414056	36.006868	3.235493
19	C20	0.487063	0.507026	0.498246	0.008325	181.818182	393.939394	323.232323	9.999490e+01	55.312726	185.325330	101.339997	59.477896
20	C21	0.491692	0.556415	0.525686	0.026524	168.666667	393.939394	318.181818	1.071374e+02	49.751513	196.967270	103.383694	66.408881
21	S3	0.545319	0.688965	0.614103	0.058801	108.080808	272.727273	188.868687	6.813504e+01	139.602162	153.372824	145.812821	5.702241
22	S4	0.076411	0.335319	0.214015	0.106326	151.515152	424.242424	333.333333	1.285649e+02	52.151871	2224.553254	777.567232	1023.174832
23	S2	0.408747	0.481092	0.443116	0.029644	409.090909	424.242424	419.191919	7.142493e+00	32.799175	47.502282	39.031519	6.207696
24	S14	0.495681	0.499259	0.497937	0.001803	227.272727	272.727273	257.575758	2.142748e+01	180.964194	202.023104	176.578509	18.146337
25	S10	0.441753	0.484441	0.466274	0.017997	151.515152	409.090909	313.131313	1.149475e+02	45.464879	182.680913	101.459073	58.789940
26	S5	0.285279	0.516068	0.394166	0.094668	409.090909	424.242424	419.191919	7.142493e+00	40.021073	55.484735	50.295935	7.265546
27	S12	0.475321	0.491680	0.485171	0.007084	393.939394	409.090909	404.040404	7.142493e+00	42.297440	68.941937	55.789914	10.880234
28	S8	0.409722	0.473428	0.442584	0.026047	409.090909	424.242424	414.141414	7.142493e+00	38.086194	65.824747	49.509972	11.840558
29	S1	1.479395	1.496602	1.490652	0.007984	257.575758	287.878788	272.727273	1.237116e+01	236.989738	248.367209	243.726609	4.875618
30	S11	0.425955	0.471836	0.454779	0.020495	333.333333	424.242424	388.888889	3.976772e+01	37.172491	206.063037	99.074219	75.963317
31	S15	0.436307	0.492980	0.466933	0.023362	363.636364	424.242424	404.040404	2.856997e+01	34.101598	110.683201	59.999911	35.841380
32	S6	0.460441	0.467080	0.464479	0.002895	227.272727	409.090909	343.434343	8.237124e+01	44.207364	196.511672	103.914809	66.384918
33	S13	0.440731	0.499416	0.463014	0.025955	333.333333	424.242424	388.888889	3.976772e+01	34.613929	141.758030	76.882839	46.589465
34	S7	0.479293	0.523058	0.504292	0.018403	272.727273	409.090909	353.535354	5.846382e+01	47.097232	197.672183	107.943755	64.775638
35	S9	0.491658	0.517135	0.500492	0.011776	363.636364	424.242424	393.939394	2.474232e+01	29.465045	104.650928	69.253521	30.851152

EK 6: PASAJLANAN HÜCRELERDE ÜREME EĞRİSİ HAM VERİLERİ

Pasaj 1

	t	D1.0	D1.1	D1.2	D2.3	D2.4	D2.5	H1.6	H1.7	H1.8	H2.9	H2.10	H2.11
0	0.0	0.1573	0.1472	0.1448	0.1072	0.1275	0.1420	0.1685	0.1737	0.1832	0.1579	0.1554	0.1588
1	54.0	0.1589	0.1480	0.1444	0.1065	0.1250	0.1374	0.1665	0.1709	0.1781	0.1597	0.1537	0.1572
2	407.0	0.2270	0.2189	0.2169	0.1214	0.1676	0.1869	0.3617	0.3681	0.3783	0.3243	0.3224	0.3167
3	1497.0	0.6669	0.6672	0.6738	0.3753	0.4420	0.4429	0.8042	0.7746	0.7802	0.6565	0.6361	0.6200

Pasaj 2

	t	D1.0	D1.1	D1.2	D2.3	D2.4	D2.5	H1.6	H1.7	H1.8	H2.9	H2.10	H2.11
0	0.0	0.1436	0.1417	0.1419	0.1149	0.1174	0.1150	0.1345	0.1356	0.1378	0.1200	0.1173	0.1160
1	40.0	0.2082	0.2022	0.1719	0.1368	0.1624	0.1540	0.2309	0.2231	0.2336	0.1650	0.1588	0.1634
2	350.0	0.2089	0.2028	0.1760	0.1339	0.1618	0.1538	0.2335	0.2252	0.2351	0.1637	0.1527	0.1638
3	1420.0	0.6910	0.6568	0.7142	0.5665	0.5911	0.6176	0.7535	0.7502	0.7788	0.6611	0.6000	0.6408

Pasaj 3

	t	D1.0	D1.1	D1.2	D2.3	D2.4	D2.5	H1.6	H1.7	H1.8	H2.9	H2.10	H2.11
0	0.0	0.1689	0.1627	0.1689	0.1287	0.1241	0.1305	0.2708	0.1692	0.1655	0.1423	0.1323	0.1234
1	100.0	0.1878	0.1770	0.1851	0.1400	0.1319	0.1374	0.3612	0.1862	0.1784	0.1600	0.1412	0.1287
2	413.0	0.3481	0.3061	0.3108	0.3168	0.2493	0.2400	0.7200	0.4399	0.3510	0.4021	0.2688	0.2286
3	1456.0	0.8555	0.8750	0.8165	0.7080	0.7052	0.7001	0.9178	0.8709	0.8385	0.7012	0.6692	0.6417

Pasaj 4

	t	D1.0	D1.1	D1.2	D2.3	D2.4	D2.5	H1.6	H1.7	H1.8	H2.9	H2.10	H2.11
0	0.0	0.2369	0.2439	0.2389	0.1806	0.1855	0.1793	0.2389	0.2328	0.2373	0.0690	0.0776	0.0746
1	104.0	0.2527	0.2567	0.2501	0.2011	0.2005	0.1914	0.2674	0.2492	0.2528	0.0699	0.0742	0.0760
2	156.0	0.2818	0.2821	0.2747	0.2208	0.2181	0.2093	0.3116	0.2738	0.2766	0.0724	0.0757	0.0784
3	1424.0	0.9336	0.9548	0.9625	0.7823	0.7989	0.7594	0.9328	0.9288	0.9137	0.4802	0.5832	0.5673

EK 7: DENEY MATRİSİNDE ELDE EDİLEN FENOTİPİK ÇEŞİTLİLİK HAM VERİLERİ

DH-GP1

name	V_ch	pixels
C17	10380.000012	773479
C18	7710.000025	693920
C5	15555.000020	686315
C6	1125.000002	787054
C16	8460.000001	868240
C13	29070.000009	827272
C8	3825.000010	832073
C7	34050.000026	674654
C12	37725.000015	777627
C4	17220.000007	763155
C19	1440.000003	976388
C1	17100.000026	733370
C3	24210.000018	598467
C9	10650.000037	692349
C14	10860.000001	785454
C11	17160.000021	665202
C2	25875.000004	815863
C10	15030.000036	707729
C15	13005.000024	570095
C20	22290.000030	673073
C21	8535.000006	842164
S3	35025.000023	734347
S4	19230.000013	742188
S2	16155.000009	768289
S14	25860.000014	713147
S10	15810.000013	748564
S5	15030.000021	678619
S12	11460.000012	847191
S8	8925.000042	654752
S1	17355.000016	609530
S11	18870.000024	709965
S15	1845.000005	859498
S6	18870.000028	810024
S13	13410.000018	812583
S7	675.000001	767057
S9	35025.000026	701419

HM-GP1

name	V_ch	pixels
C17	10650.000025	575108
C18	8265.000033	664612
C5	26880.000030	616587
C6	7590.000028	741251
C16	12240.000011	727177
C13	10545.000024	740426
C8	16215.000022	623946
C7	22260.000013	617672
C12	1170.000002	786789
C4	26070.000031	747414
C19	25950.000018	682147
C1	26670.000039	532641
C3	11280.000023	502427
C9	11400.000010	753959
C14	9555.000026	608946
C11	20025.000032	563163
C2	16710.000023	677648
C10	12705.000019	661964
C15	8925.000018	512623
C20	10545.000025	530596
C21	5400.000011	714260
S3	15555.000014	687187
S4	7380.000015	647945
S2	10545.000029	715115
S14	8055.000028	548305
S10	22815.000022	716028
S5	10980.000023	699167
S12	22590.000026	654000
S8	33750.000021	720650
S1	9330.000022	652549
S11	18870.000020	556144
S15	15555.000024	621368
S6	111180.000059	690394
S13	6690.000033	469217
S7	16155.000020	567277
S9	8925.000014	738238

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Seniha Gözde Ertüzün

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce (Advanced)

Eğitim Durumu

Lise: Özel Ted Konya Koleji (2007-2011)

Lisans: Montana Devlet Üniversitesi-Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji (UOLP) 2011-2016)

Yayınlar ve Bildiriler

İş Tecrübesi

Kurumu: Polimed İlaç ve Tavukçuluk

Görevi: Moleküler Aplikasyon Uzmanı

Yılları: 2019-2020

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Engin D, Ertuzun G, Soydemir E. 4. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Bildiri Kitabı
Antalya, Türkiye: Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği; 2017.

PS-109
ERİYİK YIĞMA MODELLEME İLE ÜRETİLMİŞ MALZEMELERİN OZON GAZI İLE STERİLİZASYONU

Doruk Evren Engin, Gözde Ertüzün, Ege Soydemir
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji AD

Eriyik yığma modelleme ("fused deposition modelling - FDM"), ya da daha yaygın bilinen adı ile üç boyutlu baskı, hızlı prototiplemede olduğu kadar üretimde de yaygın şekilde kullanılan bir teknoloji haline gelmiştir. Ancak, FDM ile biyomedikal kullanım için üretilen malzemelerin sterilizasyonu, hala önemli bir sorun oluşturmaktadır. Kullanılan termoplastik elastomerlerin hemen hepsinin cam transizyon sıcaklık eşikleri, ısı ile sterilizasyon işlemleri için önerilen sıcaklıkların altında kalmaktadır. Etilen oksit ve gamma ışınları ile sterilizasyon ise özel tesis ya da sarf malzemeleri gerektirmektedir. Çeşitli yöntemler ile kolayca elde edilebilen ozon gazının sterilizasyon amaçlı kullanımı ise giderek önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, ozon gazının FDM ile üretilmiş materyallerin sterilizasyonundaki etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada kullandığımız ozon sterilizasyon düzeneğinin donanım ve yazılımı laboratuvarımızda geliştirilmiştir. Bu amaçla, 1:45 oranlı bir trafo ile şebeke akımından 10,000V üretilmiş, bu akım, izolasyon levhasının her iki yüzünde yer alan 100cm² alana sahip alüminyum ağırlarda korona deşarjı oluşturmak için kullanılmıştır. Sterilizatörün iki litrelik hacminde üretilen ozon ile elde edilen konsantrasyon, mikrokontrolör kartına bağlı MQ131 sensörü ile algılanmış, yüksek gerilim trafosuna giden akımın uygun döngülerle açılıp kapanması, böylece ozon konsantrasyonunun 1 ppm düzeyinde tutulması sağlanmıştır. Sterilize edilecek test materyali olarak her biri 1 cm² alana sahip kuyucuklardan oluşan plakalar tasarlanmış, Color-Fab nGen filamenti kullanılarak 0.4 mm'lik baskı ucu ile 200 µm katman kalınlığında baskı gerçekleştirilmiştir. Test bakterileri Escherichia coli K12 (Ec) ve Pseudomonas aeruginosa PAO1 (Pa), bir gece boyunca LB buyyonda üretilmiş, kuyucuklara 6 replika 10², 10⁴ ve 10⁶ cfu/cm² olacak şekilde eklenmiştir. Belirtilen dilüsyonlarda inoküle edilen test plakları, geliştirdiğimiz sterilizatöre yerleştirilerek 180 dakika boyunca 1 ppm ozon gazına maruz bırakılmıştır. Sürenin sonunda kuyucuklar LB besiyeri ile yıkanarak Columbia agar besiyerine ekim yapılmıştır. Bir gecelik inkübasyon sonunda plaklarda oluşan koloniler sayılarak sterilizasyon öncesi Ec ve Pa inokulum örneklerinde sırası ile 10², 10⁴ ve 10⁶ cfu/50µl mertebesinde bakteri yükü olduğu saptanmıştır. Sterilizasyon test materyalinden yapılan ekimlerde koloni oluşumu gözlenmemiştir. Bu ön çalışma, ozon gazı ile sterilizasyonun, FDM ile üretilen parçaların sterilizasyonunda önemli bir alternatif olabileceğine işaret etmektedir. Çalışma, gram pozitif ve negatif patojenler, sporlu bakteriler, mikobakteriler, küf ve mayalar ile kontamine FDM materyalleri kullanılarak genişletilecektir.

Anahtar Kelimeler: FDM, eriyik yığma modelleme, ozon, sterilizasyon



4. ULUSAL KLİNİK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ

08 -12 KASIM 2017

RIXOS SUNGATE KONGRE MERKEZİ
ANTALYA

BİLDİRİ KİTABI

www.klimud2017.org

